

Heteroantagonismo entre estirpes de *Enterobacter agglomerans* isoladas de urubu (*Coragyps atratus*) como produtoras e *Pseudomonas aeruginosa* como reveladoras

[Evaluation of the heteroantagonism between *Enterobacter agglomerans* strains isolated from vulture (*Coragyps atratus*) for production and *Pseudomonas aeruginosa* as developed]

L.A. Lima¹, C.D.L.C. Lima^{1*}, L.R. Carvalho², M.E.B. Margutti-Pinto¹

¹Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biológicas - UFMG
Campus da UFMG - Belo Horizonte, MG

²Departamento de Bacteriologia - Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro, RJ

RESUMO

Avaliou-se o heteroantagonismo entre *Enterobacter agglomerans* isolada do trato gastrointestinal de urubu (*Coragyps atratus*) e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas do ambiente hospitalar. Foram utilizados o método de sobrecamada ou lento e a técnica direta ou de poços. Pelo método da sobrecamada, de 196 testes realizados para pesquisa da atividade antagonista, foi detectada a presença de halos de inibição relacionados ao fenômeno de heteroantagonismo em 118 deles (60,2%). Pelo método de poços, obtiveram-se resultados semelhantes. As sete amostras de *E. agglomerans* foram capazes de realizar heteroantagonismo nas condições testadas, que foram detectados pela formação de halos claros de inibição. O extrato de levedura adicionado a 1% no meio de cultura foi um suplemento adequado para a demonstração do antagonismo.

Palavras-chave: heteroantagonismo, cultura, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

The heteroantagonism between *Enterobacter agglomerans*, isolated from the gastrointestinal tract of American vulture *Coragyps atratus*, and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a hospital environment was evaluated. The slow (layer) and the wells (direct) techniques were tested, using agar and soy tryptone broth pH 7.3 at 37°C. Through the slow method from 196 tests, inhibition growth halos, related heteroantagonism phenomenon observed in 118, corresponding to 60.2% positive results. Equivalent positive results were detected using wells (direct) methodology. The seven samples of *E. agglomerans* tested were capable of revealing heteroantagonism in the experimental conditions; antagonism revealed by the presence of a clear growth inhibition halo. The added 1% yeast extract to media was adequate for revealing antagonisms best.

Keywords: heteroantagonism, culture, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*

INTRODUÇÃO

O urubu (*Coragyps atratus*) é uma ave intimamente associada à atividade humana e amplamente distribuída nas Américas, com exceção das regiões frias desse continente. Seus hábitos necrófagos os tornam interessantes sob o ponto de vista microbiológico, uma vez que sua saúde parece não ser afetada pela ingestão de alimentos altamente contaminados por bactérias,

inclusive patogênicas e toxigênicas. Em 1998, estudos microbiológicos realizados a partir do trato gastrointestinal de *C. atratus*, em Minas Gerais, revelaram a ocorrência de uma microbiota dominante variada, com predominância de enterobactérias e cocos Gram positivos. Algumas amostras, como *Escherichia fergusonii*, *Actinomyces bovis* e *Enterobacter agglomerans*, apresentavam a capacidade de inibir o crescimento de bactérias como

Recebido em 6 de dezembro de 2010

Aceito em 6 de abril de 2011

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: carlalascasas@yahoo.com.br

Staphylococcus saprophyticus, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente, evidenciando que um fenômeno de antagonismo poderia estar envolvido nos mecanismos de resistência apresentados por essa ave (Silva 1999; Carvalho et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que estirpes de *E. agglomerans* são capazes de antagonizar fungos de importância em fitopatologia, sugerindo sua utilização no controle biológico de pragas fúngicas como *Botrytis allii*, *Fusarium moniliforme* (*Giberella fujikuroi*) e *Phytophthora capsici*, entre outras (Park e Kim, 1989; Hebbar et al., 1992; Peach et al., 1994). Há também relatos na literatura da produção de fenóis antifúngicos e seletivamente bactericidas por *E. agglomerans* nos intestinos de *Schistocerca gregaria*, o que sugere o papel desse microrganismo na defesa do hospedeiro contra microrganismos patogênicos e sua importância na composição da microbiota intestinal desse inseto (Dillon e Charnley, 1995).

Moujir (1992) relatou o antagonismo entre *E. agglomerans* e *Pseudomonas aeruginosa* devido à produção de uma substância extracelular pelo *E. agglomerans*, que se acumulava no meio de cultura. Essa substância também foi tóxica para *E. coli* e *Streptococcus epidermidis*.

Levando-se em consideração o potencial da *E. agglomerans* quanto à ação inibitória sobre bactérias patogênicas, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de produção de substâncias antagonistas por estirpes de *E. agglomerans* isoladas do trato digestivo de *C. atratus* utilizando-se *P. aeruginosa* como reveladora.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se sete estirpes de *E. agglomerans* isoladas do trato digestivo de seis urubus, sendo uma recuperada do intestino proximal, quatro do intestino médio e duas do intestino distal. Como reveladoras utilizaram-se estirpes de *P. aeruginosa* da coleção de culturas do Laboratório de Bactérias Aeróbias, do Departamento de Microbiologia do ICB – UFMG, oriundas de ambiente hospitalar. As estirpes foram conservadas em meio de cultura de Tryptic Soy Broth (TSB) (DIFCO, Detroit, USA), acrescido de 10% de glicerol, estocadas em freezer (-

20°C), em tubos de vidro com rolha de borracha. Utilizaram-se sete estirpes de *E. agglomerans* como produtoras e 28 estirpes de *P. aeruginosa* como reveladoras. O heteroantagonismo resultante da produção de substâncias antagonistas foi avaliado por dois procedimentos: o bioensaio em meio sólido, denominado método de sobrecamada ou lento (Kelner, 1948) modificado, e a técnica direta ou de poços (Tagg et al., 1976). No método da sobrecamada, as culturas de bactérias foram inoculadas em caldo triptona por 24h, e posteriormente 10 estirpes foram semeadas em ágar triptona de soja, ambos os meios apresentando pH 7,3 a 37°C. Na técnica de poços, as estirpes foram inoculadas em caldo suplementado peptona com 1% de extrato de levedura ou 5% de NaCl nos pH 5,6 e 7,4, por 24h.

Em seguida, 10 estirpes foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (OXOID, Basingstoke, Inglaterra) e incubadas a 37°C.

Esses métodos consistem em confrontar uma estirpe bacteriana-teste, tomada como produtora de substâncias antagonistas, contra uma ou mais amostras, possivelmente sensíveis, denominadas como reveladoras ou indicadoras. As leituras foram realizadas analisando-se as placas quanto à presença ou ausência de antagonismo pela observação ou não de halos de inibição do crescimento da bactéria reveladora em torno do inóculo das bactérias-teste. Os halos obtidos foram medidos com auxílio de um paquímetro (MAUB, Varsóvia, Polónia), considerando-se a distância entre a borda dos testes ou dos poços e a borda dos halos.

Para eliminar a possibilidade do aparecimento de halos de inibição devido à presença de bacteriófagos, foi utilizada a técnica de “sanduíche” (Hechard et al., 1990), de forma semelhante à sobrecamada, utilizando as mesmas estirpes.

Para verificar as propriedades inibitórias de preparações livres de células bacterianas (atividade inibitória indireta) e eliminar a possibilidade de halos de inibição provocados por acidificação do meio de cultura pelas amostras-teste, foi utilizado o método modificado de preparação e análise do extrato (Daniels, 1965). A estirpe de *E. agglomerans* foi

inoculada em caldo Sabouraud dextrose e incubada em agitador por 72h a 37°C. Essa cultura foi centrifugada, e o sobrenadante teve seu pH ajustado até que se atingisse o valor de $6,8 \pm 0,1$. O sobrenadante, filtrado em membrana GS em éster de celulose com poro de $0,22 \mu\text{m}$ e diâmetro de 25mm, foi congelado em frasco tipo penicilina com rolha de borracha fenestrada a -40°C por 24h. O sobrenadante congelado foi liofilizado e posteriormente homogeneizado em solução tampão-fosfato 4mM pH 7,0 (20 μL por amostra). Para o teste de difusão em ágar, 1mL de cultura da estirpe reveladora (*P. aeruginosa*), crescida a partir do caldo Sabouraud dextrose incubado a 37°C por 24h, foi, então, avaliado pela técnica direta ou de poços (Tagg *et al.*, 1976).

Os dados foram submetidos à análise de variância, seguida pelo teste t, para comparar as médias dos halos de inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O heteroantagonismo da *E. agglomerans* contra *P. aeruginosa*, avaliado pelo método da sobrecamada, observado a partir de 196 testes, revelou a presença de halos de inibição em 118 testes (60,2%). Os halos apresentaram valor de $4,04 \pm 0,5\text{mm}$, em média. Resultados semelhantes foram obtidos pelo método de poços, verificando-se 60,2% de positivos.

Em caldo de peptona suplementado com 1% de extrato de levedura no pH 5,6, obtiveram-se 114 resultados positivos (58,2%) e halos de $4,37 \pm 0,50\text{mm}$, em média, e, em pH 7,4, 104 (53,1%), com halos de $5,20 \pm 1,07\text{mm}$, em média. O tamanho dos halos em pH 5,6 e 7,4 não diferiram entre si ($P = 0,9$).

Em caldo de peptona suplementado com 5% de cloreto de sódio no pH 5,6, observaram-se 114 resultados positivos (58,2%), e, no pH 7,4, 96 (49,0%). Em cada pH, os halos de inibição avaliados foram de $5,02 \pm 0,87\text{mm}$ e $3,86 \pm 1,08\text{mm}$, respectivamente, significativamente diferentes ($P = 0,5$).

Ao se observar atividade inibitória indireta, de *E. agglomerans* como produtoras e *P. aeruginosa* como reveladoras, observaram-se 47 resultados

positivos (24,0%) com halos de 2,45mm, em média.

Ao se realizarem os testes pelo método de poços, utilizando o caldo à base de peptona suplementado com 1% de extrato de levedura, o pH 7,4 foi mais favorável à detecção de antagonismo, exceto para uma das sete estirpes testadas, embora este resultado não tenha sido estatisticamente significativo ($P = 0,09$). Em caldo suplementado com 5% de NaCl, os resultados mais favoráveis foram observados em pH 5,6 ($P < 0,05$), exceto para duas das estirpes testadas.

Os resultados sugerem que a composição do meio de cultivo utilizado foi capaz de influenciar as estirpes bacterianas testadas e que o pH pode alterar o resultado. Assim, a condição ideal de pH para o estímulo da atividade antagonista das amostras de *E. agglomerans* variou conforme o suplemento adicionado ao meio de cultura, o que impede a indicação de um pH mais adequado, de uma forma generalizada.

Com o método de poços, observou-se que o extrato de levedura na concentração de 1% parece ter estimulado a ocorrência do antagonismo (média dos halos), superior ao observado em suplementação com 5% de NaCl. Estes resultados demonstram também que não foi a alta concentração de sal (5% de NaCl) que inibiu as amostras reveladoras, pois, no meio com baixa concentração de sal, também houve a formação de halos de inibição.

Tanto pelo método de sobrecamada quanto pelo método de "sanduíche", observaram-se as mesmas relações de heteroantagonismo, o que indica que a inibição realizada pelas amostras de *E. agglomerans* testadas não foi proporcionada por bacteriófagos.

Na avaliação da atividade inibitória indireta (confronto de *E. agglomerans* contra *P. aeruginosa*), observou-se persistência da capacidade de inibição, embora tenha ocorrido queda tanto do número de halos de inibição observados quanto do raio destes. Estes resultados indicam que a inibição exercida por *E. agglomerans* não se deveu apenas à produção de ácido, pois a técnica inclui a correção do pH do sobrenadante para um valor neutro (pH 7). A redução observada nos resultados positivos pode

ter ocorrido em função da degradação da substância antagonista devido aos procedimentos utilizados, ou mesmo pela eliminação da acidez, que poderia estar atuando como um estimulador da atividade inibitória.

Os procedimentos dos métodos de antagonismo lento são semelhantes àqueles do antagonismo simultâneo, sendo que as diferenças consistem basicamente na incubação preliminar da estirpe produtora na técnica de antagonismo lento. O método de antagonismo lento, realizado pelo teste da sobrecamada com inoculação das amostras produtoras em pontos, possui a vantagem de permitir a variação de tempo/temperatura de incubação das culturas produtoras e reveladoras. Esse método é considerado por alguns autores como sendo o mais adequado, quando comparado com o de inoculação em estrias e com o de antagonismo simultâneo por inoculação em poços, devido à sua melhor reprodutibilidade e facilidade de execução.

Segundo Tagg e McGiven (1971), o método de inoculação em poços apresenta a vantagem da padronização dos inóculos, o que possibilita a comparação direta entre os diferentes tamanhos dos halos de inibição e as quantidades de bacteriocinas produzidas por diferentes culturas. Contudo, a difusão da bacteriocina é limitada pelo tamanho da molécula, pela taxa de difusão das bacteriocinas no ágar e pelo volume que pode ser aplicado em cada poço.

Benkerroum e Sadine (1998) avaliaram o método de antagonismo simultâneo por inoculação em poços de Tagg e McGiven (1971) e compararam com os métodos de antagonismo lento por inoculação em forma de pontos e de estrias para demonstrar a atividade das bacteriocinas. Observaram que os halos de inibição eram detectados após três horas de incubação na técnica de inoculação em poços, enquanto 48 horas foram necessárias para as de pontos e estrias.

Da mesma forma, Moreno *et al.* (2000), com o intuito de testar a produção de bacteriocinas por *Lactococcus*, verificaram que o método de antagonismo simultâneo por inoculação em poços permitiu a formação de halos de inibição maiores e mais consistentes. Esse método mostrou ser mais sensível aos métodos de

inoculação em forma de pontos e de estrias, pela possibilidade de comparação da concentração de bacteriocinas produzidas pelas diferentes linhagens examinadas. Nos testes, observou-se que a técnica de antagonismo simultâneo (método de poços) foi mais adequada devido, justamente, à rapidez na obtenção de resultados. Além disso, esse método mostrou-se bastante eficiente em relação à reprodutibilidade.

Do ponto de vista ecológico, alguns autores sugerem que alguns tipos de antagonismo podem beneficiar as bactérias somente quando elas se encontram fora do ambiente intestinal, entretanto testes para demonstrar a vantagem seletiva de estirpes fora de seu ambiente natural nunca forneceram resultados conclusivos. Ao contrário, estudos da evolução molecular de plasmídios de substâncias antagonistas, como as colicinas, demonstraram que amostras de *E. coli*, que realizam o antagonismo, têm vantagem seletiva em seu próprio ambiente natural, os intestinos (Konisky, 1978; van Der Wal *et al.*, 1995).

Estes dados demonstram que todas as estirpes de *E. agglomerans* isoladas do trato gastrointestinal de *C. atratus* apresentaram *in vitro* a capacidade de inibir a proliferação de diversas estirpes de *P. aeruginosa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, L.R.; FARIAS, L.M.; NICOLI, J.R. *et al.* Dominant culturable bacterial microbiota in the digestive tract of American Black Vulture (*Coragyps atratus* Bechstein 1793) and search for antagonistic substances. *Braz. J. Microbiol.*, v.34, p.218-224, 2003.
- BENKERROUM, N.; SANDINE, W.E. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.*, v.71, p.3237-3245, 1998.
- DANIELS Jr., F. A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds. *J. Invest. Dermat.*, v.44, p.259-263, 1965.
- DILLON, R.J.; CHARNLEY, A.K. Chemical barriers to gut infection in the desert locust: in vivo production of antimicrobial phenols by the bacterium *Enterobacter agglomerans*. *J. Invert. Pathol.*, v.6, p.72-75, 1995.

Heteroantagonismo entre estirpes...

- HEBBAR, K.P.; DAVEY, A.G.; DART, P.J. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: colonization of rhizosphere and roots. *Soil Biol. Biochem.*, v.24, p.989-997, 1992.
- HÉCHARD, Y.; DHERBOMEZ, M.; CENATIEMPO, Y. *et al.* Antagonism of lactic acid bacteria from goat's milk against pathogenic strains assessed by sandwich method. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.11, p.185-188, 1990.
- KELNER, A. A method for investigating large microbial population for antibiotic activity. *J. Bacteriol.*, v.56, p.157-162, 1948.
- KONISKY, J. Bacteriocin. In: ORNSTON, L.N.; SOKATCH, J.R. *The bacteria*. London: Academic, 1978. v.6, cap.2, p.71-136.
- MOUJIR, L. Isolation of a *Enterobacter agglomerans* strains with inhibitory activity on *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios.*, v.70, p.209-213, 1992.
- MORENO, I.; LERAYER, A.L.S.; BALDINI, V.L.S. *et al.* Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus Lactis* strains. *Braz. J. Microbiol.*, v.31, p.183-191, 2000.
- PARK, J.H.; KIM, H.K. Biological control of *Phytophthora* crown and root rot greenhouse pepper with *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter agglomerans* by improved method application. *Kor. Plant Pathol.*, v.5, p.1-12, 1989.
- PEACH, L.; MANDE, R.B.; PETCH, G.M. *et al.* Biocontrol of seed borne *Botrytis allii* using an antagonistic bacterium: seed treatment, progress and prospects. In: SYMPOSIUM OF THE UNIVERSITY OF KENT, 1994, Canterbury. *Proceedings...* Farnham: BCPC, 1994. p.345-350.
- SILVA, M.C.F. *Avaliação da capacidade de produção de substâncias antagonistas por amostras de escherichia coli isoladas do intestino de Coragyps atratus (Urubu-Comum)*. 1999. 31f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas - Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WAMAMAKER, L.W. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, v.40, p.722-756, 1976.
- TAGG, J.R.; MCGIVEN A.R. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.*, v.21, p.943, 1971.
- VAN DER WAL, F.; LUIRINK, J.; OUDEGA, B. Bacteriocin release proteins: mode of action, structure, and biotechnological application. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 17, p.381, 1995.