

Elaboração de um meio semi-seletivo com base na resistência múltipla constitutiva de *Pseudomonas putida* (UFV-0073) a antibióticos

Hélvio Gledson Maciel Ferraz¹, Adriana Neves de Souza¹, Flávio Augusto de Oliveira Garcia² e Reginaldo da Silva Romeiro¹

Resumo – O isolado UFV-0073 de *Pseudomonas putida*, autóctone do filoplano de tomateiro, foi selecionado para o controle biológico de doenças da parte aérea da cultura. No presente trabalho, foi elaborado um meio semi-seletivo para que no futuro seja estudada a dinâmica populacional desse agente de biocontrole na superfície das folhas, depois da dispensa nas plantas por pulverização, na tentativa de determinar como muitas vezes o agente de biocontrole, deve ser aplicado ao longo do ciclo da cultura. Vários passos foram seguidos para a construção de um meio seletivo com base na resistência múltipla constitutiva (RMC) do isolado UFV-0073 a antibióticos. Primeiramente foram feitos antibiogramas com 52 discos de impregnados com antibióticos e o isolado UFV-0073 foi insensível a nove. Desses, três antibióticos foram utilizados para futura investigação. Em segundo lugar, diferentes diluições dos três antibióticos escolhidos foram testadas, e o isolado UFV-0073 foi insensível até a concentração de 2500 µg.mL⁻¹. Além disso, os três antibióticos foram incorporados juntos ao meio de cultura padrão até 64 µg.mL⁻¹, tornando o meio semi-seletivo. Diluições seriadas do lavado de folhas do tomateiro, foram cultivadas no meio semi-seletivo, indicando que o meio não era repressivo ao agente de biocontrole alvo mas altamente repressivo aos outros microrganismos que vivem na superfície das folhas do tomateiro.

Palavras-chave: Controle biológico, antibiograma, residente de filoplano.

Construction of a semi-selective medium for *Pseudomonas putida* (UFV-0073) based on its constitutive resistance against antibiotics

Abstract – The isolate UFV-0073 of *Pseudomonas putida*, a phylloplane resident autochthonous in tomato, was previously selected as a biocontrol agent for aerial part diseases of the culture. This paper aimed construction of a semi-selective medium in order to future study the population dynamics of the this biocontrol agent in leaf surfaces after its deliver to plants by spraying, in a attempt to determine how many times the biocontrol agent ought to be delivered along the culture cycle. In a first step, antibiograms were run with 52 available antibiotics and isolate UFV-0073 was insensitive to nine of them and three out of nine were further investigated. Secondly, different dilutions of the same antibiotic were tested and isolate UFV-0073 was insensitive to them up to 2500 µg.mL⁻¹. Therefore the three antibiotics were incorporated to the standard culture medium at 64 µg.mL⁻¹, giving rise to the semi-selective medium. Serial dilutions from tomato leaf washes when plated in the semi-selective medium indicated that it is not repressive to the target biocontrol agent but highly suppressive to other microorganisms living in the tomato leaf surface.

Keywords: Biological control, antibiograms, phylloplane residents.

INTRODUÇÃO

O isolado de *Pseudomonas putida* (UFV-0073) foi parcialmente investigado quanto ao biocontrole de fitopatógenos exercido em condições laboratoriais e de campo (Halfeld-Vieira, 2002). Espécies de *Pseudomonas* destacam-se pela grande capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, tais como sideróforos (Glick & Bashan, 1997).

O monitoramento da população de bactérias no filoplano requer métodos específicos de detecção e quantificação. Existem os métodos moleculares, como as sondas moleculares e técnicas de hibridização que são satisfatórias para a detecção, mas limitadas quando o interesse é a quantificação (Hirsch, 1996; Holben et al., 1998). Microrganismos modificados geneticamente e marcadores de resistência a antibióticos constituem uma alternativa simples para detecção e quantificação (Bull et al., 1991; Bloemberg et al., 1997). Existem também os métodos clássicos para o monitoramento de bactérias residentes do filoplano, por seleção de mutantes resistentes a antibióticos (Theodoro & Maringoni, 2002) e o desenvolvimento de meio semi-seletivo (Dhingra &

Recebido em 10 de agosto de 2009 e aceito para publicação em 15 de janeiro de 2010

¹ Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Fitopatologia, CEP 36570-000, Viçosa, MG. E-mail: hgmferraz@yahoo.com.br.

² Jari celulose S.A., Vila Munguba S/N, CEP 68.240-000, Monte Dourado- PA. E-mail: fagarcia@jari.com.br.

Sinclair, 1985; Fahy & Persley, 1983).

Com o desenvolvimento de um meio semi-seletivo foi possível estudar a sobrevivência do mutante patog nico MAN 2763-D de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* resistente ao sulfato de estreptomicina, em manipueira (Theodoro & Maringoni, 2002). Outra possibilidade de utilização de um meio semi-seletivo associado a antibióticos para o estudo da sobrevivência de um determinado microrganismo,   tirando partido da resistência múltipla constitutiva (RMC) de bactérias a antibióticos (Romeiro et al., 1998).

Resistência múltipla constitutiva a antibióticos é quando vários isolados de uma determinada espécie bacteriana são resistentes a diversos antibióticos diferentes e ao mesmo tempo (Romeiro, 2005). Os primeiros relatos de bactérias possuindo RMC a antibióticos foram na medicina humana. Em hospitais de Tóquio em 1955 e de Londres em 1962, vários isolados da bactéria *Shigella dysenteriae*, causadora de desint rias em humanos, revelaram-se naturalmente resistentes a vários antibióticos (Watanabe, 1963). Na bacteriologia de plantas foram testadas várias espécies de fitobactérias contra diversos antibióticos e se mostraram resistentes aos mesmos compostos, evidenciando a presença de RMC das bactérias testadas a antibióticos (Romeiro et al., 1998). Esses autores observaram, que os mais de 50 isolados de *Ralstonia solanacearum* obtidos de várias regiões do Brasil e do exterior, foram resistentes aos mesmos antibióticos incorporados em um meio de cultura semi-seletivo que se mostrou totalmente supressivo a fungos e bactérias, possuindo baixa repressividade a *R. solanacearum*. Os autores concl  ram que o meio semi-seletivo pode ser utilizado para a detecção e quantificação da bactéria em tecido vegetal e solos, entre outros.

Objetivou-se no presente trabalho desenvolver e testar um meio semi-seletivo para validar a RMC a antibióticos do isolado UFV-0073, para futuramente estudar a dinâmica populacional do agente de biocontrole no filoplano de tomateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem, cultivo e preservação do isolado UFV-0073

O agente de biocontrole UFV-0073 (*Pseudomonas putida*)   um procarioto autóctone do filoplano de tomateiro e foi previamente selecionado para o biocontrole de doenças da parte aérea da cultura (Halfeld Vieira, 2002). Foi cultivado em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) e preservado por três métodos: 1- em água destilada esterilizada (Klement & Sands, 1990; Romeiro, 2007); 2- emulsificação em glicerina a 15% (Gerhardt, 1994) com posterior armazenamento em ultra-freezer a -80 C; 3- em óleo mineral recobrimdo a cultura bacteriana (Tuite, 1969).

Antibiogramas qualitativos

Com o objetivo de verificar a quais antibióticos *P. putida* (UFV-0073) mostrar-se-ia insensível, foram realizados os antibiogramas qualitativos, utilizando discos de papel impregnados com antibióticos (Bionalyse ) (Romeiro, 2005).

O antagonista foi cultivado em 30 mL de meio líquido 523 contido em Erlemeyers com 50 mL de capacidade por 24 h a 28 C, sob agitação constante a 120 rpm. Após 24 h, foi pipetada uma alíquota de 10  L de suspensão bacteriana, para cada 10 mL do meio 523 semi-sólido (0,8% de Agar) fundente (Romeiro, 2007). Em placas de Petri com 9 cm de diâmetro foram depositados cerca de 5 mL do meio de cultura contendo a suspensão bacteriana. Após a solidificação, foram alocados equidistantemente quatro discos impregnados com antibióticos nas concentrações comerciais abaixo (Bionalyse ), por placa de Petri.

As placas foram mantidas em B.O.D. a 28 C por 24 h, onde foi avaliada a sensibilidade ou insensibilidade da bactéria aos antibióticos testados, devido ao surgimento perceptível de halo de inibição ou não. A presença de halo de inibição indicou que o agente de biocontrole foi sensível ao antibiótico, impedindo ou reduzindo o seu crescimento normal. A ausência do halo de inibição indicou que a bactéria foi insensível ao antibiótico, crescendo normalmente ou muito próximo de seu crescimento normal.

Os antibióticos testados foram: 1- ceftriaxona 30µg, 2- cefepima 30µg, 3- cefoperazona 75µg, 4- lincomicina 2µg, 5- imipenem 10µg, 6- cefalexina 30µg, 7- neomicina 30µg, 8- ceftazidima 30µg, 9- eritromicina 15µg, 10- ácido nalidíxico 30µg, 11- doxiciclina 1µg, 12- ampicilina 2µg, 13- colistina 10µg, 14- aztreonam 30µg, 15-rifampicina 30µg, 16-piperacilina 100µg, 17-pefloxacina 5µg, 18-estreptomicina 10µg, 19- polimixina b 300 UI, 20- nitrofurantona 300µg, 21- netilmicina 30µg, 22- clindamicina 2µg, 23- tetraciclina 30µg, 24- cefuroxima 30µg, 25- trimetoprima + sulfametoxazole 85µg (75 + 10), 26- cefaclor 30µg, 27- meropenem 10µg, 28- fosfomicina 50µg, 29- norfloxacin 10µg, 30- cefadroxil 30µg, 31- azitromicina 15µg, 32- teicoplanina 30µg, 33- amoxicilina 30µg, 34- oxaciclina 1µg, 35- amicacina 30µg, 36- cloranfenicol 10µg, 37- tobramicina 10µg, 38- vancomicina 30µg, 39- canamicina 30µg, 40- levofloxacin 5µg, 41- gentamicina 120µg, 42- carbecilina 100µg, 43- penicilina 2 UI, 44- ticarcilina + cido clavulnico 85µg (75+10), 45- sulbactam + ampicilina 20µg (10+10), 46- amoxicilina + ácido clavulânico 30µg (20+10), 47- ácido pipemídico 20µg, 48- cefotaxima 30µg, 49- cefazolina 30µg, 50- cefoxitina 30µg, 51- novobiocina 30µg, 52- ciprofloxacina 5µg.

Antibiogramas quantitativos

Foram escolhidos três antibióticos: novobiocina, ampicilina e lincomicina aos quais *P. putida* mostrou-se insensível nos antibiogramas qualitativos. Os antibióticos escolhidos foram testados nas seguintes concentrações: 2500; 1250; 625; 312.5; 156.25; 78.125 e 39.0625 µg/mL.

Primeiro foi aplicada uma camada de ágar- água (2%) em placas de Petri 9cm de diâmetro, após o resfriamento dessa primeira camada, foi vertida uma segunda camada contendo o meio 523 (Kado & Heskett, 1970) semi-sólido contendo propágulos do agente de biocontrole. O isolado UFV-0073 foi cultivado por 24 h a 28°C e a cultura vertida dentro do Erlenmeyer contendo o meio 523, na proporção de 10 µL de suspensão bacteriana para cada 10 mL de meio.

Em cada placa de Petri, foram realizados seis furos de 1 cm de diâmetro, com o auxílio de um furador e depois o recorte foi sugado por uma bomba de vácuo com uma ponteira de pipeta (P 100) na extremidade da mangueira, para proporcionar uma cavidade uniforme. Em cada cavidade foi depositada uma alíquota de 50 µL de cada uma das concentrações dos antibióticos. Após a adição dos antibióticos as placas foram levadas a geladeira por 12 h, para uma melhor difusão dos antibióticos no meio de cultura. Posteriormente, as placas foram mantidas por 24 h a 28°C, onde se observou a presença ou ausência de halo de inibição em volta das cavidades. Cada tratamento foi representado por uma concentração dos antibióticos com três repetições e como controle foi utilizado água esterilizada na cavidade.

Teste de Repressividade

Para a realização do ensaio de repressividade com *P. putida*, procedeu-se a representação cartesiana dos dados da curva de crescimento do antagonista com os três antibióticos: Lincomicina, Novobiocina e Ampicilina, adicionados juntos ao meio de cultura, para verificar se o crescimento do isolado bacteriano seria reprimido. A cada duas horas eram aferidas a turbidez dos frascos ("side arm flask"), contendo os tratamentos descritos abaixo, em espectrofotmetro.

Pseudomonas putida foi cultivada em meio líquido (Kado & Heskett, 1970) por 24h sob agitação a 120 rpm. Em quatro "side-arm flasks" com capacidade de 250 mL, foram colocados 100 mL de meio líquido, esterilizado a 120°C/20 min. Em dois "side-arm flasks" foram adicionados, com o auxílio de uma pipeta, alíquotas dos antibióticos, de modo que a concentração final atingisse 30 µg/L em um "side arm" e 60 µg/L no outro, e também foi adicionado cicloheximida, resultando em uma concentração final 150 µg/L em ambos os "side-arm flasks".

Posteriormente, a três dos quatro "side-arm flasks" foram pipetados 100 µL da cultura do antagonista cultivado em meio 523 líquido por 24 h a 28°C. O "side-arm flask" contendo o meio de cultura e a bactéria, foi o controle; já que aquele contendo apenas o meio serviu para zerar o espectrofotmetro.

Teste de Supressividade

Em um Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 200 mL de solução salina (0,85%) e 200 L Tween 80 (0,05%) esterilizados; foram adicionados 20 g de folhas de tomateiro coletados em plantação de tomate orgânico, e posteriormente, submetidos a banho de ultra-som por 25 minutos para melhor recuperação dos microrganismos do filoplano.

Alíquotas de 1 mL do lavado foram transferidas para tubo de ensaio contendo solução salina (0,85%) + Tween 80. Diluições (fator 1/10) foram obtidas até 10^{-10} .

De cada fator de diluição foram retiradas quatro alíquotas de 100  L, sendo duas alíquotas semeadas em duas placas de Petri contendo 5 mL de meio 523, e as outras duas alíquotas semeadas em duas placas de Petri com 5 mL de meio 523 contendo os três antibióticos a 60  g/L + cicloheximida a 150  g/L. Em seguida as placas foram mantidas por 48h a 28 C. As col nias foram contadas e as unidades de unidades formadoras de col nia foram estimadas (UFC/g de tecido foliar).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos antibiogramas qualitativos (Figura 1) o antagonista *P. putida* (UFV-0073) revelou-se resistente a nove (ampicilina, amoxicilina, cefazolina, cefepima, cefoxitina, cefuroxima, lincomicina, trimetopima + sulfametoxazol e novobiocina) dos 52 antibióticos testados.

Desses antibióticos ao qual o isolado revelou ser insensível, três deles foram escolhidos: ampicilina, novobiocina e lincomicina. Estes antibióticos foram escolhidos devido ao amplo espectro de a  o, pois; ampicilina e novobiocina têm ação contra bactérias gram positivas e gram negativas e lincomicina têm espectro de a  o contra bactérias gram positivas (Fiocruz, 2008). Esses antibióticos foram testados em diferentes concentrações por meio de antibiogramas quantitativos, e em todas as concentrações testadas, o agente de controle biológico foi insensível (Figura 2). O isolado de *P. putida* foi resistente aos três antibióticos quando adicionados separadamente, a cavidades feitas no meio de cultura. Foi verificada uma insensibilidade da bactéria aos antibióticos testados, até a concentração 2500  g/mL, indicando que o isolado possui uma alta resistência a lincomicina, novobiocina e ampicilina.

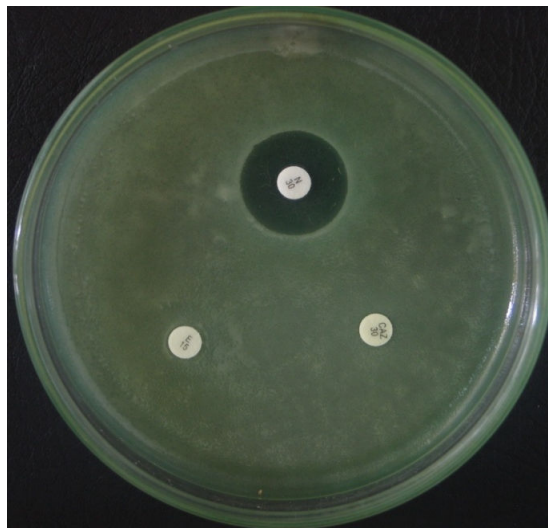


Figura 1. Antibiograma qualitativo realizado com o antagonista *Pseudomonas putida*. A ausência de halo em torno do disco de papel impregnado antibiótico indica resistência da bactéria.

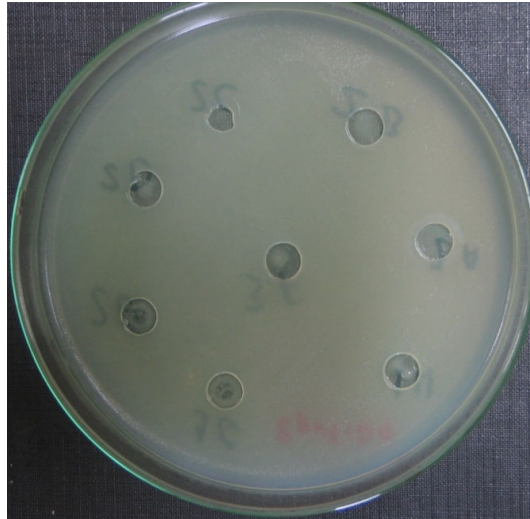


Figura 2. Antibiograma quantitativo realizado com o antagonista *Pseudomonas putida* isolado UFV-0073. Nenhuma das concentrações testadas: 2500; 1250; 625; 312.5; 156.25; 78.125 e 39.0625 $\mu\text{g/mL}$ dos antibióticos Lincomicina, Novobiocina e Ampicilina inibiu o crescimento bacteriano.

No teste de repressividade (Figura 3) foi avaliado se o isolado UFV-0073 permanecia insensível aos três antibióticos quando adicionados ao meio de cultura conjuntamente, até a concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$. Nesse estudo, verificou-se que a curva de crescimento bacteriano em meio de cultura livre de antibiótico (testemunha) foi equivalente a dos outros dois tratamentos, antibióticos adicionados ao meio de cultura nas concentrações 30 $\mu\text{g/mL}$ e a 60 $\mu\text{g/mL}$. As curvas de crescimento apresentaram um mesmo padrão, podendo-se depreender que o meio semi-seletivo idealizado foi pouco repressivo ou mesmo não repressivo ao antagonista. Quando uma população de microrganismo é resistente a vários antibióticos diferentes e, ao mesmo tempo essa população é dita possuidora de RMC a antibióticos, como evidenciados em outros trabalhos (Romeiro et al., 1998). Dessa forma, pode-se depreender que o isolado UFV-0073 possui RMC a antibióticos, pois é resistente a ampicilina, lincomicina e novobiocina, quando adicionados juntos ao meio de cultura.

O meio semi-seletivo, com base na RMC, revelou ser supressivo aos demais procariotos residentes do filoplano de tomateiro, mas houve eventual crescimento fúngico. Visando sanar essa aparente deficiência do meio semi-seletivo foi adicionado a esse meio cicloheximida (150 $\mu\text{g/mL}$, concentração final do meio), um potente inibidor da síntese protéica em organismos eucariotos. Com a adição desse composto, o meio tornou-se altamente supressivo a toda microbiota do filoplano do tomateiro (Figura 4) mas sem ser supressivo a *P. putida* (UFV-0073) (Figura 5). Assim, o meio pode ser empregado para o estudo da dinâmica populacional de *P. putida* quando pulverizada no filoplano.

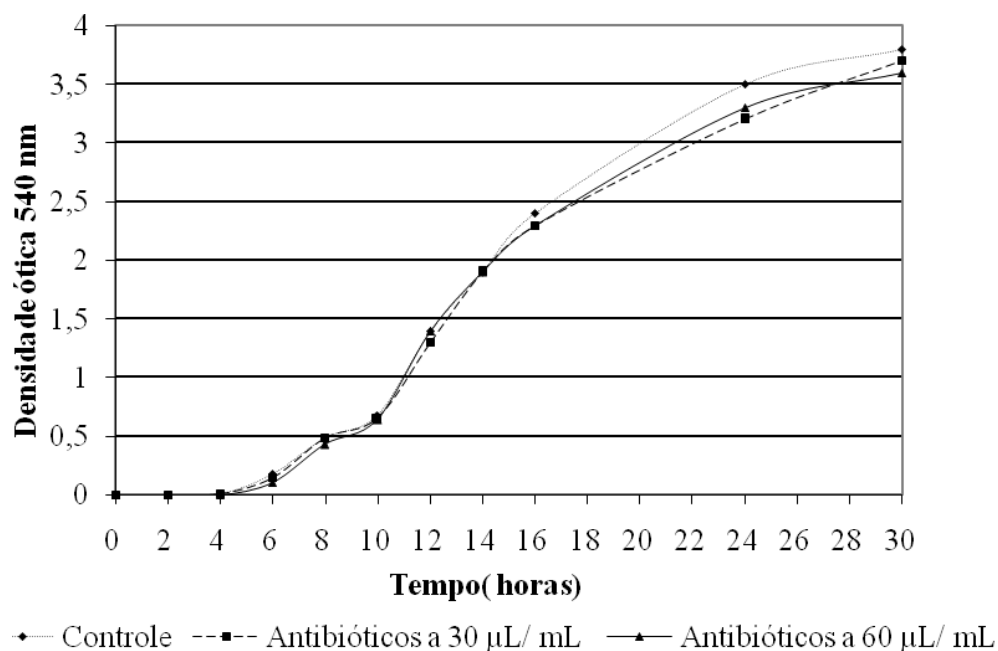


Figura 3. Curvas de crescimento de *Pseudomonas putida* no meio semi-seletivo, contendo ampicilina, novobiocina e lincomicina nas concentrações finais de 30 µg/mL e 60 µg/mL. No controle não foi adicionado antibióticos.

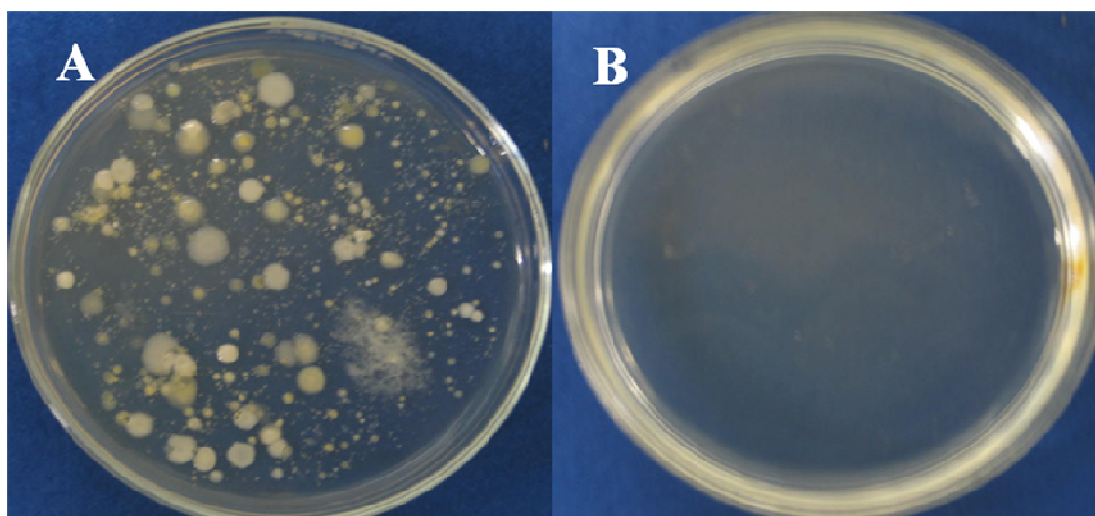


Figura 4. Crescimento dos microrganismos residentes do filoplano do tomateiro em meio 523. A- Meio sem adição dos antibióticos e de cicloheximida; e B- Meio semi-seletivo contendo cicloheximida e os antibióticos ampicilina, lincomicina e novobiocina.

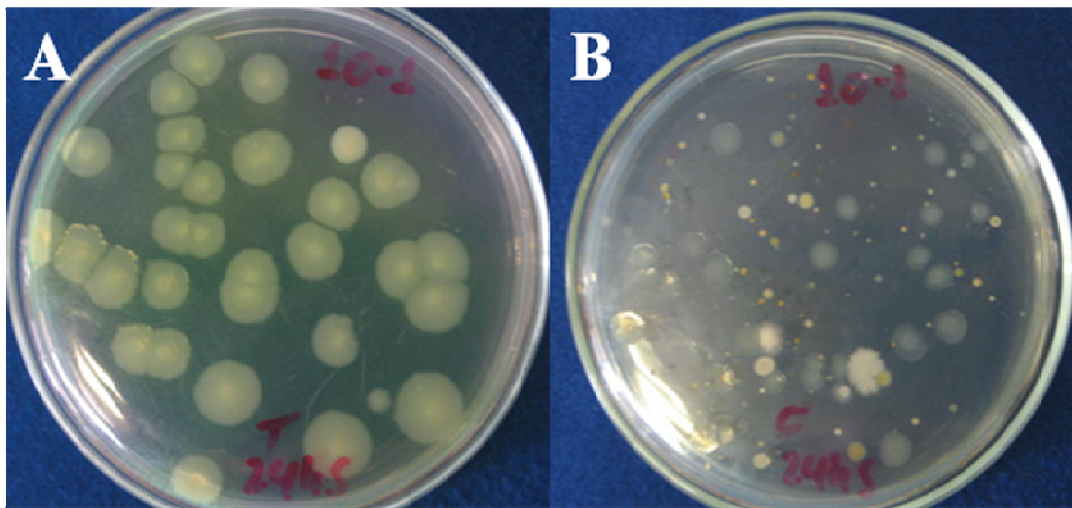


Figura 5. Plantas de tomate foram pulverizadas com *Pseudomonas putida*, posteriormente obteve-se um lavado das folhas. A- Meio semi-seletivo contendo ampicilina, lincomicina, novobiocina e cicloheximida, apenas com o crescimento do agente de biocontrole; e B- Meio sem adição dos antibióticos e cicloheximida, com o crescimento de *P. putida* e dos residentes do filoplano obtidos da suspensão de lavado de folhas de tomate pulverizados com a bactéria.

CONCLUSÕES

O meio semi-seletivo idealizado com base na resistência múltipla constitutiva do isolado UFV-0073 a antibióticos   supressivo aos microrganismos habitantes do filoplano do tomateiro e não   repressivo a *P. putida*, podendo esse meio ser empregado para o estudo da dinâmica populacional do isolado UFV-0073 quando pulverizado no filoplano do tomateiro.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão de bolsas de estudos e de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- BLOEMBERG, V. G.; O'TOOLE, G. A.; LUGTENBERG, B. J. J.; KOLTER, R. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4543-4551, 1997.
- BULL, C. T.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Relationships between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. **Phytopathology**, v.81, 1991, p.954-959.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton: CRC Press. 1985. 355 p.
- FAHY, P. C.; PERSLEY, G. J. **Plant Bacterial Diseases - A Diagnostic Guide**. Sidney: Academic Press, v.1. 1983. 393 p.
- FIOCRUZ. **Fundação Oswaldo Cruz**. <http://bvsfiocruz.fiocruz.br>. Acesso em 06 de outubro de 2008.
- GERHARDT, P. E. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology. 1994. 791 p.
- GLICK, B. R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, p.353-378, 1997.

- HALFELD VIEIRA, B.A. **Bactéria residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura**. 2002. 108p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-Minas Gerais.
- HIRSCH, P. R. Detection of microbial DNA sequences by colonization. In: AKKERMANS, A. D. L.; VAN ELSAS, J. D.; DE BRUIJN, F. J. (Ed.). **Molecular Microbial Ecology Manual**. the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. p.1–12
- HOLBEN, W. E.; JANSSON, J. K.; CHELM, B. K.; TIEDJE, J. M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacteria community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, 1998, p.3491–3498.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, 1970, p.969-976.
- KLEMENT, Z.; RODOLPH, K.; SANDS, D. C. **Methods in Phytobacteriology**. Budapest: Akad miai Kiad . 1990. 568 p.
- ROMEIRO, R. S. **Bact rias Fitopatog nicas**. Viçosa: Editora UFV. 2005. 417 p.
- ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de plantas: fundamentos**. Viçosa: UFV. 2007. 269 p.
- ROMEIRO, R. S.; MOURA, A. B.; OLIVEIRA, J. R.; SILVA, G. S. A.; BARBOSA, L. S.; SOARES, F. M. P.; PERES, F. Evidences of constitutive multiple resistance to antibiotics in some plant pathogenic bacteria. **Summa Phytopathologica**, v.24, 1998, p.213-218.
- THEODORO, G. D.; MARINGONI, A. C. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in "manipueira" under environmental conditions. **Pesquisa Agropecu ria Brasileira**, v.37, 2002, p.945-953.
- TUITE, J. **Plant pathological methods**. Minneapolis: Burgess. 1969. 70 p.
- WATANABE, T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. **Bacteriology Reviews**, v.27, 1963, p.87-115.