

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE *Burkholderia* sp. ASSOCIADOS AO ANTAGONISMO A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Silvia Arikita Umezaki¹; Aline Aparecida Camargo Neves², Wellington Luiz de Araújo³

Estudante do Curso de Ciência Biomédicas: e-mail: sil_umezaki@hotmail.com¹

Mestre pela Universidade de Mogi das Cruzes: e-mail: aacn.bio@gmail.com²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes: e-mail: wellingtonluiz@umc.br³

Área do Conhecimento: Genética de Microrganismos e Ecologia Microbiana.

Palavras-chave: antibiose, antimicrobianos, endofíticos.

INTRODUÇÃO

No decorrer dos anos, diante do surgimento de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos houve um crescente interesse na descoberta de novos compostos antimicrobianos. Esses compostos, em geral, são substâncias orgânicas de baixo peso molecular, produzidos e excretados por microrganismos e que em pequenas concentrações são capazes de destruir ou inibir o crescimento ou a atividade metabólica de outros microrganismos (GRIFFIN, 1994; BAKER & COOK, 1974).

Dentre os microrganismos, os endófitos têm sido intensamente estudados, principalmente pelo fato de habitarem o interior das plantas sem causar nenhum dano aparente aos seus hospedeiros, podendo ainda trazer alguns benefícios como capacidade de fixação de nitrogênio, promoção de crescimento a planta e principalmente a produção de compostos antimicrobianos (HALLMANN *et al.*, 1997; BALDANI *et al.*, 1997; PARKE *et al.*, 2001). Espécies do gênero *Burkholderia* apresentam grande potencial para o biocontrole e biorremediação, por meio da produção de metabólitos antimicrobianos.

OBJETIVOS

Avaliar *Burkholderia* sp. quanto a capacidade de inibir *in vitro* *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e *Candida albicans*; Identificar a presença do transposon TN5 por meio da técnica de PCR; Caracterizar uma biblioteca de mutantes TN5 obtidos em projeto anterior (Proc. FAPESP: 2008/52407-9) e identificar genes de *Burkholderia* sp. envolvidos na inibição destes microrganismos patogênicos.

METODOLOGIA

Foi avaliada a capacidade da *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3, isolada de raiz de cana-de-açúcar, em inibir o crescimento *in vitro* das bactérias *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e do fungo leveduriforme *Candida albicans*. Em seguida foi feita uma triagem de uma biblioteca de mutantes TN5 por meio de testes de antibiose. Os mutantes selecionados foram avaliados quanto ao crescimento para verificar se a falta de inibição não estaria associada ao um menor crescimento. O DNA dos mutantes defectivos foram extraídos e a região associada ao TN5 foi clonada, sequenciada, alinhada e comparadas por meio de ferramenta BLASTn oferecida pelo NCBI na busca de similaridade com genes conhecidos.

RESULTADO/DISCUSSÃO

O isolado TC3.4.2R 3foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* de *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, porém não foi capaz de inibir o crescimento do fungo leveduriforme *Candida albicans*. Este isolado foi utilizado para a geração de uma biblioteca de mutantes contendo 1300 clones. Desta biblioteca, cerca de 900 clones já foram avaliados quanto à perda da capacidade de inibição das bactérias *E. aerogenes*, *E. coli* e *S. aureus*. Foi observado que 24 mutantes apresentaram redução significativa no halo de inibição. Destes, 5 mutantes foram selecionados através da realização de uma curva de crescimento para clonagem, seqüenciamento e identificação dos genes. A análise destes mutantes mostrou que genes que codificam glutamato sintase, glutamato desidrogenase, piruvato flavodoxina (ferredoxina) oxireductase e histidina quinase estão associados com esta síntese de antibióticos.

A glutamato sintase é enzima encontrada em diversas plantas e bactérias, e está envolvida em diversos processos, como o metabolismo do glutamato, aspartato e alanina; o metabolismo do nitrogênio principalmente em bactérias fixadoras de nitrogênio; entre outras rotas metabólicas (MENARD *et al.*, 2007).

A glutamato desidrogenase apresenta duas isoformas, uma mitocondrial e outra citoplasmática. Esta enzima participa na biossíntese de aminoácidos ao incorporar amônia a alfa-cetoglutarato gerando glutamato. Em bactérias, o glutamato não é somente precursor de outros aminoácidos, mas também está envolvido em outros processos biológicos, como a osmorregulação, fonte de grupos aminos para produção de antibióticos, e em alguns casos, como precursor da biossíntese de ferro, como substrato de proteínas carreadoras de acila (ACP) (MILLER & WOOD, 1996). A enzima piruvato flavodoxina (ferredoxina) oxireductase atua sobre o transporte de elétrons, na quebra do piruvato, originando ATP (adenosina trifosfato), H₂ e CO₂ (JAY, 1994; FRANCO & LANDGRAF, 1996). Através desse mecanismo a ausência dessa enzima pode debilitar a produção de energia para a célula, proporcionando déficits no seu metabolismo habitual apresentando dificuldades na produção de compostos antimicrobianos.

A proteína histidina quinase participa de uma das principais vias de transdução de sinal, através do sistema de dois componentes, o qual permite a percepção de estresse osmótico e a geração de uma resposta transcricional para a adaptação das células (WHITE, 2000). Sem a detecção dessa irregularidade o microrganismo pode deixar de apresentar o sistema de adaptação sofrendo danos.

CONCLUSÕES

O mecanismo de produção de antibióticos por *Burkholderia* sp. deve envolver diversas vias metabólicas ou mesmo interações de vias gênicas, visto que genes de vias metabólicas distintas estão envolvidos com a perda da capacidade de inibir as bactérias de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R. and DOBEREINER, J. Recent advance in BNF with non-legume plant. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 911–922, 1997.

BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological Control of Plant Pathogens**. San Francisco: W. H. Freeman, p. 433, 1974.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 182, 1996.

GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. 2.ed. New York: Wiley-Liss, p. 523, 1994.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza (España): Editorial Acribia S.A., p.804, 1994.

MENARD, A.; MONNEZ, C.; SANTOS, P.E.; SEGONDS, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; LIPUMA, J.J.; CHABANON, G.; COURNOVER, B. Selection of Nitrogenfixing Deficient *Burkholderia vietnamensis* Strains by Cystic Fibrosis Patients: Involvement of nif Gene Deletions and Auxotrophic Mutations. **Environmental Microbiology**, v.9, n.5, p.1176-1185, 2007.

MILLER, K.J.; WOOD, J.M. Osmoadaptation by Rhizosphere Bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v.50, p.101-136, 1996.

PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacea* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 39, p. 225-258, 2001.

WHITE, D. **The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes**. Second Edition, Oxford University Press, New York, 2000.