

PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS POR SALMONELAS ISOLADAS DE GALINHAS E PERUS¹

EDIR NEPOMUCENO DA SILVA², DIÓGENES SANTIAGO SANTOS³ E OSMANE HIPÓLITO²

ABSTRACT.- Silva E.N., Santos D.S. & Hipólito O. 1985. [Production of bacteriocins by *Salmonella* isolated from chickens and turkeys.] Produção de bacteriocinas por salmonelas isoladas de galinhas e perus. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 5(4): 143-144. Fac. Med. Vet. Zootec., USP, Av. Corifeu de Azevedo Marques 2720, São Paulo, SP 05340, Brazil.

Production of bacteriocins was investigated in 24 strains of *Salmonella* isolated from two flocks of birds: one of breeder turkeys and another of breeder chickens, both apparently healthy. Eleven strains of *S. typhimurium*, two of *S. saintpaul*, two of *S. eimsbuettel* and nine of *S. arizonae* were used in this experiment. All strains but *S. arizonae* produced bacteriocins. As far as bacteriocinogenicity was concerned, the strains tested apparently belonged to two groups.

INDEX TERMS: Bacteriocins, *Salmonella*, chickens, turkeys.

SINOPSE.- Investigou-se a produção de bacteriocinas de 24 amostras de salmonela isoladas de dois lotes de aves: um de perus e outro de galinhas reprodutoras, aparentemente normais. Foram testadas onze amostras de *Salmonella typhimurium*, duas de *S. saintpaul*, duas amostras de *S. eimsbuettel* e nove *S. arizonae*. Todas as amostras, com exceção de *S. arizonae*, produziram bacteriocinas. Neste estudo, houve formação de dois grupos do ponto de vista de bacteriocinogenicidade.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Bacteriocinas, salmonela, galinhas, perus.

INTRODUÇÃO

Um dos problemas que os bacteriologistas encontram para o rastreamento epidemiológico de um determinado microrganismo é a ausência de elementos que possibilitem esta caracterização. Uma saída, tem sido procurada, com a determinação da produção de bacteriocinas, que são substâncias bactericidas de natureza protéica. Em algumas bactérias gram-negativas estão associadas com lipopolissacárides. São sintetizadas por certas amostras e agem sobre a mesma espécie ou espécie relacionada. Sabe-se que a produção de algumas bacteriocinas é determinada por fatores citoplasmáticos os quais também conferem à célula produtora, resistência à sua ação (Nomura 1967, Reeves 1965). São denominadas de arizonacinas quando produzidas por amostras de *Salmonella arizonae* (Reeves 1965).

Arizonacinas foram detectadas em 33 entre 220 (15%) amostras testadas (Hamon & Perón 1963). Jakovina et al. (1973) testaram a produção de bacteriocinas de 65 amostras

de salmonelas pertencentes a vários sorotipos isolados de aves e de ração e observaram que apenas algumas amostras de salmonelas do sorogrupo B produziram bacteriocinas.

Neste experimento, investigou-se a produção de bacteriocinas de 24 amostras de salmonelas isoladas, num período de seis meses, de dois lotes de aves: um de perus e outro de galinhas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 24 amostras de salmonela isoladas de dois lotes de aves: um de perus e outro de galinhas reprodutoras aparentemente normais. As amostras estavam distribuídas da seguinte maneira: onze amostras de *Salmonella typhimurium*, sendo seis e quatro isoladas de fezes cecais de galinhas e perus, respectivamente; e uma amostra isolada de embrião de galinhas. Duas amostras de *S. saintpaul* isoladas, uma de cada, de fezes cecais de galinhas e perus. Duas de *S. eimsbuettel* e nove *S. arizonae* (Ar. 7:1,7,8:-) isoladas de embriões de perus.

Para a determinação da produção de bacteriocinas das amostras de salmonela isoladas, utilizou-se as amostras *Escherichia coli* K12 711 F⁻ resistente ao ácido nalidíxico e sensível às bacteriocinas e, como controle da produção de bacteriocina, a amostra *E. coli* K12 JC 411 produtora de colicina em função do plasmídeo col E₁.

Os seguintes meios de cultura foram utilizados: meio TSB - Tryptic Soy Broth (Difco) acrescido de timina 10 µg/ml do meio) e vitaminas B₁ (10 µg/ml do meio) distribuídos em tubos de ensaio de 16x160 mm; meio TSA - Tryptic Soy Agar (Difco) acrescido de 20 µg/ml de ácido nalidíxico (solução a 5 mg/ml) distribuído em placas de Petri de 10 cm de diâmetro contendo 20 ml por placa; Top agar - TSB adicionado de 0,75% de agar, mais 20 µg/ml de ácido nalidíxico (solução a 0,5 mg/ml).

As amostras a serem testadas foram semeadas em tubos contendo 5 ml de TSB e incubados a 37°C por 24 horas sob agitação constante. Após o período de incubação, 1 ml do crescimento em TSB era transferido para tubo de ensaio de 10 x 100 mm e centrifugado a 3.500 rpm por 20 minutos em centrífuga refrigerada à 20°C. Após centrifugação, o sobrenadante de cada amostra era semeado na superfície do agar da placa de Petri, utilizando-se alça de platina calibrada para conter 10 µg. As placas eram incubadas a 37°C e a leitura feita após 24 horas.

As placas de Petri eram preparadas e, após solidificação, era adicionada uma nova camada de 2 ml de Top agar pelo método de "pour-plate" contendo 0,2 ml da amostra de *E. coli* K12 sensível às

¹ Aceito para publicação em 23 de setembro de 1985.

² Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Corifeu de Azevedo Marques 2720, São Paulo, SP 05340.

³ Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu 862, São Paulo, SP 04023.

bacteriocinas cultivada em TSB por 24 horas a 37°C sob constante agitação.

As amostras produtoras de bacteriocinas eram reveladas pela formação de um halo de inibição do crescimento no local da semeadura após o período de incubação.

Em cada placa foram testadas 11 amostras de salmonela e um controle constituído por uma amostra de *E. coli* K12 produtora de colicina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Quadro 1 apresenta os resultados da produção de bacteriocinas pelas amostras de salmonela testadas frente à amostra sensível de *Escherichia coli*. Todas as amostras, com exceção de *Salmonella arizonae*, produziram bacteriocinas.

A determinação da produção de bacteriocinas tem sido testada como maneira adicional no rastreamento epidemiológico de determinados microrganismos, à semelhança da fagotipagem. Abbott & Shannon (1958) trabalhando com *Shigella sonnei*, observaram que a determinação da produção de colicinas é tecnicamente mais simples, de resultados reprodutíveis além de reduzir o número de amostras não típicas quando comparada à fagotipagem. Embora tenhamos dividido as amostras de salmonela estudadas em dois grandes grupos do simples ponto de vista de produção de bacteriocinas, estes resultados não permitem tirar conclusões com relação ao rastreamento epidemiológico. Mesmo trabalhando com 150 amostras de *Salmonella dublin* onde Wray & Clarke (1974) encontraram 19 padrões estáveis e reprodutíveis de sensibilidade às bacteriocinas, esta propriedade mostrou-se de pouco valor prático como marcador epidemiológico, porque 130 destas amostras foram resistentes às bacteriocinas empregadas. Este fato também se repetiu nos trabalhos de Madureira et al. (1982) onde apenas 39 amostras (15%) de *S. agona* mostraram-se colicinogênicas entre 250 testadas. Também, Madureira et al. (1983) não conseguiram estabelecer relação entre um dado sorotipo de salmonela e a colicina produzida, uma vez que encontraram num mesmo sorotipo diferentes padrões de produção de colicinas e, sorotipos diferentes com igual tipagem colicinogênica. Na verdade, a propriedade bacteriocinogênica é relativamente comum entre sorotipos de salmonela do grupo B, particularmente *S. typhimurium* e, rara entre outros sorogrupos de salmonela (Hamon & Perón 1966, Jakovina et al. 1973).

Nas amostras examinadas, apenas as de *S. arizonae*, na sua totalidade, não se mostraram bacteriocinogênicas. Sabe-se que

as bacteriocinas sintetizadas pelas salmonelas são diferentes na sensibilidade a agentes físicos, químicos e biológicos das colicinas e também das pneumocinas, aerocinas e marcecinas, mas são estritamente relacionadas às bacteriocinas de *S. arizonae* (Hamon & Perón 1966). Nos estudos de Hamon & Perón (1963) as bacteriocinas produzidas por *S. arizonae* apresentaram propriedades nitidamente diferentes das colicinas.

Quadro 1. Produção de bacteriocinas por salmonelas isoladas de galinhas e perus

Sorotipo	Origem	Ave	Nº de amostras	Produção de bacteriocinas
<i>S. typhimurium</i>	Fezes cecais	perus	4	positivo
		galinha	6	positivo
<i>S. saintpaul</i>	Fezes cecais	galinha	1	positivo
		perus	1	positivo
<i>S. eimsbuettel</i>	Embriões	galinha	1	positivo
		perus	2	positivo
<i>S. arizonae</i>	Embriões	perus	9	negativo

REFERÊNCIAS

- Abbott J.D. & Shannon R. 1958. A method for typing *Shigella sonnei* using colicine production as a marker. J. Clin. Path. 11: 71-77.
- Hamon M.Y. & Perón Y. 1963. Individualisation des quelques nouvelles familles d'entérobactériocines. C. R. Acad. Sci., Paris, 257: 309-311.
- Hamon M.Y. & Perón Y. 1966. La propriété bactériocinogène dans la tribu des *Salmonellae*. I. Les bactériocines des *Salmonella*. Ann. Inst. Pasteur 110: 389-402.
- Jakovina M., Milakovic-Novak L. & Topolko S. 1973. Colicin production isolated from fowl and from feeds for their nutrition. Vet. Archiv., Zagreb, 43: 76-80.
- Madureira A.C.P.V., Hofer E., Solari C.A. & Almeida D.F. 1982. Colicinogenia em *Salmonella agona*, p. 726. Anais 34ª Reunião Anual Soc. Bras. Progresso da Ciência, Campinas, S. Paulo. (Resumo)
- Madureira A.C.P.V., Dias J.C.A.R. & Hofer E. 1983. Estudo colicinogênico em *Salmonella*, p. 95. Anais 9º Congr. Lat.-Am. Microbiol. e 12º Congr. Bras. Microbiologia, São Paulo, SP. (Resumo)
- Nomura M. 1967. Colicins and related bacteriocins. Ann. Rev. Microbiol. 21: 257-284.
- Reeves P. 1965. The bacteriocins. Bact. Rev. 29: 24-45.
- Wray C. & Clarke J. 1974. The bacteriogenicity and bacteriocin sensitivity of *Salmonella dublin*. Res. Vet. Sci. 17: 411-412.