

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA BACTÉRIA *BURKHOLDERIA BRASILENSIS* A ANTIBIÓTICOS

SILVA, Charles Rodrigues¹

charlesmoni@ig.com.br

Faculdades Integradas Maria Imaculada

SOUZA, Carlos Eduardo Ribeiro²

carlos.eduardo_souza@syngenta.com

Faculdades Integradas Maria Imaculada

PAULA, Flávia de Mello Santos Franco³

flaviafimi@hotmail.com

Faculdades Integradas Maria Imaculada

MARINI, Danyelle Cristine⁴

farmacia@mariaimacualda.br

Faculdades Integradas Maria Imaculada

RESUMO

No interior do tecido vegetal as bactérias quimiossintetizantes contribuem efetivamente para a fixação biológica de nitrogênio possibilitando o desenvolvimento da planta. Entre as bactérias encontra-se a *Burkholderia brasiliensis*, pertencente ao gênero

¹ Licenciado em Ciências com habilitação em Biologia pelas Faculdades Integradas Maria Imaculada – Mogi Guaçu/SP (2010) e Pós graduação Lato Sensu em Educação Ambiental e Cidadania pela UNICID - Universidade Cidade de São Paulo (2012). Professor no Instituto Educacional Educar Sistema Anglo Mogi Guaçu/SP, no Colégio Deltha Objetivo Aguai/SP e no Centro Paula Souza ETEC Aguai/SP nas disciplinas de Biologia e Microbiologia.

² Graduado em Ciências com habilitação em Biologia pelas Faculdades Integradas Maria Imaculada.

³ Farmacêutica e Bioquímica graduada em 1989 pela Uniararas, mestranda e especialista em Análises Clínicas, bioquímica no Hospital Municipal Dr. Tabajara Ramos e professora nas Faculdades Integradas Maria Imaculada e Unipinhal com grande atuação em Microbiologia e Imunologia básica e clínica.

⁴ Doutoranda em Educação pela UNIMEP, Mestre em Biologia Celular e Molecular pela UNESP, Especialista em Docência Superior pela Gama Filho, Especialista em Cosmetologia e Dermatologia pela UNIMEP, Habilitada em Bioquímica pela UNIMEP e Graduada em Farmácia pela UNIMEP. Professora e Coordenadora do Curso de Farmácia das FIMI, e Coordenadora da Comissão de Educação do CRF-SP.

Burkholderia com alta incidência de crescimento em meio de micropropagação de plantas. O cultivo *in vitro* de uma determinada cultura pode ocasionar o stress físico e químico gerando a contaminação desses microrganismos que teriam a função de fixação de nitrogênio em um ambiente natural. Em virtude dessas ações o uso de antibióticos no controle biológico da cultura tem se tornado uma prática comum. Como controle da contaminação dos meios de cultura de meristema utiliza-se descontroladamente antibióticos, aos quais podem proporcionar resistência microbiana, e essa tem trazido à tona um futuro incerto sobre seu controle na utilização de antibióticos. Dessa forma, tornam-se de extrema importância as pesquisas realizadas no melhoramento de sua aplicação e entendimento dos mecanismos genéticos da resistência microbiana. O objetivo do presente trabalho foi determinar o perfil de resistência da bactéria *Burkholderia brasilensis* quando submetido à aplicação de antibióticos com intuito de analisar ganhos qualitativos no processo de micropropagação *in vitro* de meristema de cana de açúcar. Foram analisados 20 antibióticos em forma de disco em três séries de três repetições, sendo cinco antibióticos eficazes no controle da micropropagação *in vitro*.

Palavras-chave: *Burkholderia brasilensis*. Resistência. Antibiograma. Antibióticos.

1 INTRODUÇÃO

Um dos fatores que possibilitam o crescimento da planta é a capacidade de algumas bactérias quimiossintetizantes contribuírem na capacitação e absorção de nutrientes, minerais e água (BARRETI, 2008). Os gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Burkholderia* e *Azoarcus* estão incluídos entre as bactérias quimiossintetizantes mais estudadas (NERONI, 2006).

Uma das bactérias fixadoras de nitrogênio mais encontradas em cultura de meristema em gramíneas tem sido a espécie *Burkholderia brasilensis* apresentando as seguintes características de crescimento em meio JMV semissólido sem nitrogênio com pH de 4,0 à 5,5 e temperatura de 28 à 32 °C. Estas características favorecem seu desenvolvimento e fixação de nitrogênio formando película grossa na superfície entre 3 e 5 dias (BALDANI, 1997).

O gênero *Burkholderia* tem sido uma das mais frequentes bactérias

contaminantes observadas no meio de micropropagação de cana de açúcar conforme pode ser observado pela indicação da frequência dos organismos contaminantes na micropropagação de cana de açúcar indicado na **Tabela 1** (TOLEDO, 2009).

Tabela 1: Frequência dos organismos contaminantes na micropropagação de cana de açúcar

Gênero	Frequência	Gênero	Frequência
<i>Acetobacter</i>	10%	<i>Gluconobacter</i>	2%
<i>Achromobacter</i>	4%	<i>Herbaspirillum</i>	1%
<i>Acidisoma</i>	1%	<i>Klebsiella</i>	3%
<i>Acidomonas</i>	1%	<i>Lactobacillus</i>	1%
<i>Acinetobacter</i>	1%	<i>Leuconostoc</i>	1%
<i>Alicyclobacillus</i>	7%	<i>Stenotrophomonas</i>	1%
<i>Bacillus</i>	3%	<i>Pantoea</i>	2%
<i>Bacterium</i>	6%	<i>Pseudomonas</i>	6%
<i>Burkholderia</i>	10%	<i>Ralstonia</i>	1%
<i>Enterobacter</i>	5%	<i>Rhizobium</i>	3%
<i>Gluconacetobacter</i>	1%	Não há resultados encontrados	30%

Fonte: TOLEDO, 2009

O uso descontrolado de antibióticos tem proporcionado a resistência microbiana por meio da seleção daquelas que apresentam características genéticas de adquirir e transmitir resistência a suas proles (LOGUERCIO, 2005).

A resistência microbiana tem trazido à tona um futuro incerto sobre seu controle na utilização de antibióticos e, portanto, são de extrema importância as pesquisas realizadas no melhoramento de sua aplicação e entendimento do funcionamento dos mecanismos genéticos da resistência microbiana (LOGUERCIO, 2005).

A resistência microbiana aos diversos antibióticos sofre variações dependendo da localidade, entretanto algumas espécies demonstram resistência em todo o mundo como, por exemplo, o *Staphylococcus aureus*. (TAVARES, 2000).

A avaliação *in vitro* para demonstrar a sensibilidade ou resistência dos microrganismos a antibióticos e possível e estes bioensaios são denominados antibiogramas (ROMERO, 2010).

Os antibiogramas podem ser realizados em diversas técnicas entre elas pode-se citar a bioeletroforese, difusão em gel, cromatografia em papel e disco de papel de filtro ocorrendo variação nas tangentes ao grau de sensibilidade (ROMERO, 2010). O presente trabalho utilizou o bioensaio em disco de papel de filtro pela vantagem na rapidez do diagnóstico, os quais foram saturados com uma quantidade conhecida de antibióticos.

Nos bioensaios em disco de papel de filtro há necessidade de controlar vários fatores, dentre eles, o tamanho do inóculo, a distribuição do inóculo na placa, o tempo de incubação, profundidade do ágar, a taxa de difusão (apresenta problemas com substâncias que não difundem no meio de cultura) e a concentração da substância teste (KRUGER; MOURA, 2003).

Torna-se, assim, o objetivo desse trabalho definir o padrão de resistência da bactéria *Burkholderia brasiliensis* que contamina o meio de cultura de meristema, com intuito de proporcionar subsídios para o uso racional dos antibióticos.

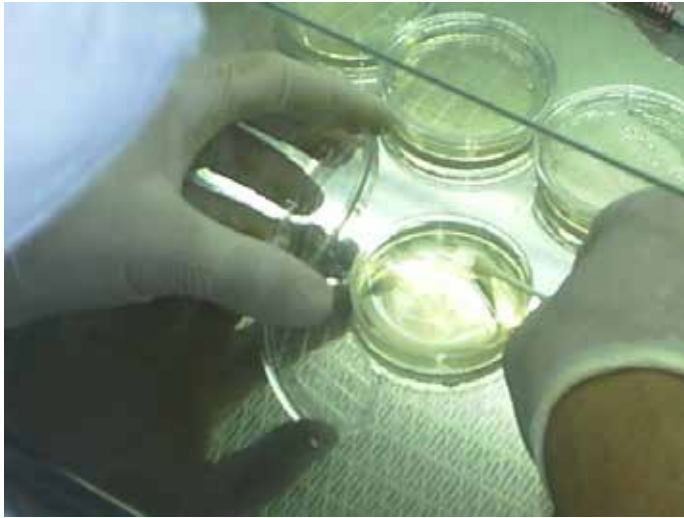
2 METODOLOGIA

2.1 Meio de cultura

A bactéria *Burkholderia brasiliensis* utilizada no experimento foi fornecida pela empresa Canavialis S. A. Inicialmente foi inoculada essa bactéria em meio líquido J.M.V. Esse meio tem a seguinte composição por litro: 5g Manitol; 0,6g KH_2PO_4 ; 0,2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1g NaCl; 0,2g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2,0ml azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH); 2,0ml solução de micronutrientes (0,04g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1,2g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,4g H_3BO_3 ; 1,0g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,175g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); 1,0ml solução de vitaminas (100mg biotina; 200mg piridoxol-HCl); 4,0 ml FeEDTA (solução 1,64%) foi ajustado o pH para 4.0 a 4.5 (BALDANI, 1997). O experimento foi realizado em capela de fluxo laminar.

O pré-inoculado JMV líquido contaminado foi incubado a 28°C por 72 horas, após este período de incubação foi ajustado em espectrofotômetro (marca/modelo) com leitura em 560 nm para uma suspensão bacteriana na concentração de 10^9 de transmitância. Em seguida, foi inoculada em meio sólido de JMV como descrito anteriormente com acréscimo de 20 g de agar e 50 mg de extrato de levedura para o preparo do meio sólido (BALDANI, 1997).

Figura 1 - Esfregaço com Swab da bactéria *B. brasilensis* em meio JMV



Fonte: Autores 2011

2.2. Testes dos antibióticos em discos com bactérias *Burkholderia brasilensis* contaminante no meio de cultura

Partindo de isolados da bactéria *Burkholderia brasilensis* responsável pela contaminação do meio de cultura foi avaliado o seu perfil de resistência.

Foram utilizados 20 tipos de antibióticos para esta avaliação seguindo três séries de três repetições em forma de disco, adquiridos do fornecedor Décio Camargo - Produtos e Equipamentos Laboratoriais Ltda. Estes discos foram colocados preferencialmente na região central do meio J.M.V. pré-inoculado com uma suspensão bacteriana na concentração 10^9 de transmitância. Estas placas foram incubadas a 28°C 72 horas. Sendo, após este período determinado o diâmetro do halo de inibição do antibiótico em milímetro (mm) (**Figura 2**) e interpretada em comparação à tabela de resistência CECON - Centro de Controle de Produtos para Diagnósticos LTDA.

Nos antibiogramas foram utilizados os seguintes antibióticos: ampicilina, amoxicilina, kanamicina, estreptomicina, gentamicina, amicacina, neomicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, polimixina, vancomicina, rifampicina, cefuroxina, novobiocina, norfloxacin, cefoxitina, cefalotina, lincomicina e oxacilina.

Figura 2- Medição do halo do antibiótico Neomicina em disco de papel



Fonte: Autores, 2011.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 antibiograma para avaliação da resistência da bactéria *Burkholderia brasiliensis*

Foram analisados 20 antibióticos em três séries de três repetições e em todas as etapas foram medidas os halos. Como extremos, foi observado que com tratamento com gentamicina ocorreu alto grau de resistência da bactéria *Burkholderia brasiliensis* por não apresentar halo de inibição e com cefuroxima foi observado um halo médio de 13,6mm comprovando a sua resistência. A relação entre o tamanho do halo e a resistência bacteriana foi realizada comparando o valor médio dos experimentos versus os dados de referência do CECON. Os valores para todos os antibióticos e apresentado no compilado apresentado a seguir, conforme **Tabela 2**.

Tabela 2: Resistência da bactéria *Burkholderia brasilensis* frente aos antibióticos.

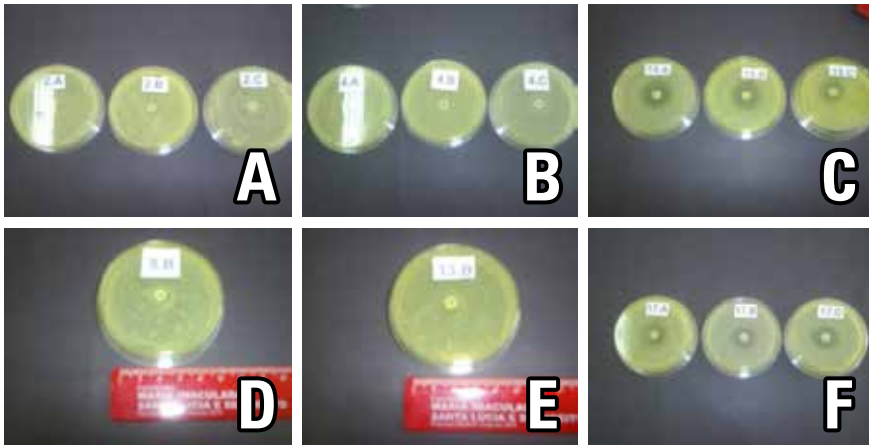
Antibióticos	Exp. 1 (mm)	Exp.2 (mm)	Exp. 3 (mm)	Média dos Exp. (mm)	Valor de referência CECON(mm)			Resultado
					R	I	S	
amicacina	22	25	26	24,33	≤ 14	15 - 16	≥ 17	S
amoxicilina	0	0	0	0	≤ 19	19 - 25	≥ 20	R
ampicilina	20	25	20	21,67	≤ 18	19 - 25	≥ 26	I
cefalotina	0	0	0	0	≤ 14	15 - 17	≥ 18	R
cefoxitina	0	0	0	0	≤ 14	15 - 17	≥ 18	R
cefuroxima	15	13	13	13,67	≤ 14	15 - 17	≥ 18	R
cloranfenicol	15	15	17	15,67	≤ 12	13 - 17	≥ 18	I
eritromicina	15	13	17	15	≤ 13	14 - 22	≥ 23	I
estreptomicina	8	10	10	9,33	≤ 11	12 - 14	≥ 15	R
gentamicina	0	0	0	0	≤ 12	13 - 14	≥ 15	R
kanamicina	28	27	28	27,67	≤ 13	14 - 17	≥ 18	S
lincomicina	0	0	0	0	≤ 14	15 - 16	≥ 17	R
neomicina	13	11	12	12	≤ 12	13 - 16	≥ 17	R
norfloxacina	17	20	19	18,67	≤ 12	13 - 16	≥ 17	S
novobiocina	0	0	0	0	≤ 17	18 - 21	≥ 22	R
oxacilina	0	0	0	0	≤ 10	11 - 12	≥ 13	R
polimixina	15	17	15	15,67	≤ 8	9 - 11	≥ 12	S
rifampicina	17	15	17	16,33	≤ 16	17 - 19	≥ 20	I
tetraciclina	23	22	25	23,33	≤ 14	15 - 18	≥ 19	S
vancomicina	0	0	0	0	≤ 14	15 - 16	≥ 17	R

Fonte: CECON-CENTRO DE CONTROLE E PRODUTOS PARA DIAGNÓSTICOS LTDA.

R = Resistência; I = Intermediária; S = Sensibilidade.

O pesquisador Loguercio (2005) realizou o tratamento com antibióticos juntamente com hidro-alcoólico de folhas de jambolão no qual foram testados em bactérias gram positiva e negativa. Os microrganismos estudados foram sensíveis aos antibióticos norfloxacina e amicacina. O mesmo ocorreu com a bactéria *B. brasilensis*, a qual apresenta sensibilidade a estes antibióticos, contudo demonstra resistência aos fármacos gentamicina, lincomicina, cefalotina e oxacilina (**Figura 3**).

Figura 3: Antibiogramas realizados com a bactéria *B. brasiliensis*. A-gentamicina, B-lincomicina e C-norfloxacina D-oxacilina E-cefalotina F-amicacina



Fonte: Autores, 2011

Os resultados no presente estudo comprovam que os antibióticos kanamicina e tetraciclina foram eficazes para o impedimento do crescimento da bactéria *B. brasiliensis*, fato também constatado no experimento realizado por Baldani (1997). Contudo o antibiótico estreptomicina não conseguiu promover o impedimento do crescimento bacteriano, o que demonstra que essa bactéria é resistente a este fármaco (**Figura 4**).

Figura 4: Antibiogramas realizados com a bactéria *B. brasiliensis*. A-tetraciclina, B-kanamicina e C-estreptomicina.

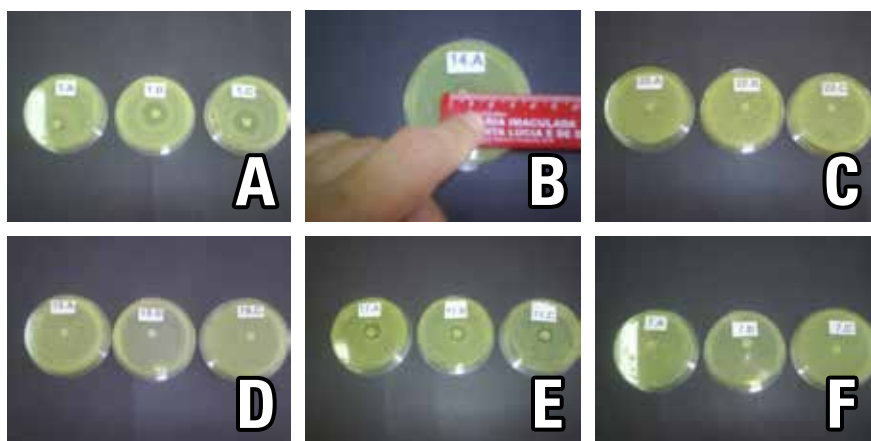


Fonte: Autores, 2011

Em testes com antibióticos em bactérias fixadoras em meristema de batata, Pereira (2003) em sua metodologia comprovava a eficácia

do antibiótico que apresentava o halo de inibição acima de 8 mm, no entanto, no presente trabalho a metodologia aplicada foi embasado na tabela CECON. Contudo, os resultados obtidos por meio dos bioensaios pode-se comprovar a inibição do crescimento da bactéria *B. brasilensis* na utilização dos antibióticos ampicilina, cloranfenicol e houve a resistência a novobiocina, vancomicina, cefuroxina e cefoxitina em respectivas aplicações (**Figura 5**).

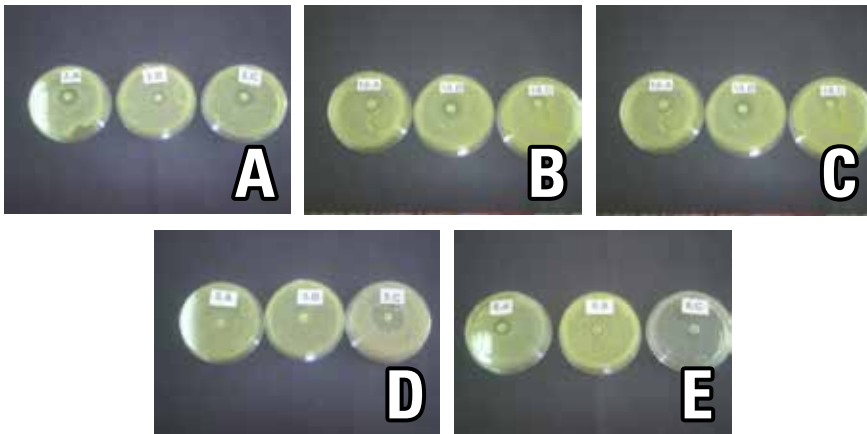
Figura 5: Antibiogramas realizados com a bactéria *B. brasilensis*. A-ampicilina, B-cloranfenicol e C-novobiocina D-cefoxitina E-cefuroxina F-vancomicina



Fonte: Autores, 2011

Na cultura de meristema de cana de açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos, a amoxicilina apresentou eficiência no controle crescimento de certos microrganismos (DONATO, 2005), no entanto, isso não ocorre com a bactéria *B. brasilensis in vitro* o mesmo verificado com o uso de neomicina. Contudo, notou-se a sensibilidade a polimixina e resistência intermediária a rifamicina e eritromicina (**Figura 6**).

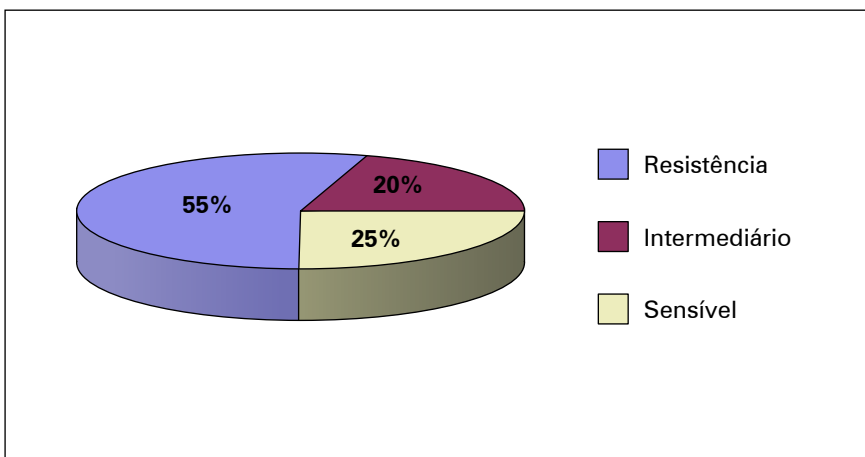
Figura 6 Antibiogramas realizados com a bactéria *B. brasiliensis*. A-polimixina B-rifampicina C-eritromicina D-amoxicilina E-neomicina



Fonte: Autores, 2011

A bactéria *Burkholderia brasiliensis* foi testada e o seu perfil de resistência frente a 20 antibióticos no período de março a maio de 2010 foi definido, permitindo uma média de 55% (11 antibióticos) não foram eficientes pela resistência do microrganismos (**Figura 7**).

Figura 7 - Perfil de resistência da bactéria *Burkholderia brasiliensis*



Fonte: Autores, 2011

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bactéria *B. brasilensis* apresentou alta resistência aos antibióticos Gentamicina, Lincomicina, Amoxicilina, Vancomicina, Oxacilina, Cefalotina, Cefoxitina e Novobiocina por não apresentar halo de inibição.

Aos antibióticos Ampicilina, Cloranfenicol, Rifampicina e Eritromicina apresentaram resistência intermediária.

Os antibióticos Polimixina, Tetraciclina, Kanamicina, Amicacina e Norfloxacin mostraram eficiência no controle da micropropagação contaminante *in vitro*.

Considerando que pode haver esse impacto, um próximo passo é a determinação de concentrações mínimas a serem utilizadas no tratamento de uma cultura para ganhos qualitativos e quantitativos de um lote final com consequente lucro ao empreendedor e evitando o surgimento de espécies de bactérias resistentes.

Por fim, conclui-se que o uso de antibióticos sem referências científicas quanto à eficiência pode ocasionar a maior proliferação de espécies resistentes comprometendo o tratamento gerando prejuízos financeiros e biológicos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.

BALDANI, V.L.D.; et al. *Burkholderia brasilensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 69, nº 1, p. 116, Maio.1997.

BARRETTI, P. B; et al. Aumento da eficiência nutricional de tomateiros inoculados com bactérias endofíticas promotoras de crescimento. **Revista Brasileira Solo**, Viçosa, v. 32, nº 4, p. 1541-1548, jul-ago.2008.

DONATO, V. M. T. S.; et. al. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciências agrotecnologia**. Lavras, v. 29, nº 1, p. 134-141, jan./fev. 2005.

KRUGER, R.H.; MOURA, M.A.O. Antibiograma – método de Kirby-Bauer. In: MILLER. R.N.G.; CAPDEVILLE, G.; KRUGER, R.H. **Manual de práticas laboratoriais em microbiologia**. Brasília: Universa, 2003. p. 99-101.

LOGUERCIO, A. P.; et. al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria-RS v. 35, nº 2, mar-abr, 2005.

NERONI, R. F.; et. al. OCORRÊNCIA E DENSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM FLORESTAS DE *Araucaria angustifolia* EM CAMPOS DO JORDÃO, SP. **Fertbio**. Bonito-MS, 2006.

PEREIRA, J. E. S; et al. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, nº 7, p. 827-834, jul. 2003.

ROMEIRO, R, da S. Antibióticos e seu emprego em pesquisa com bactérias fitopatogênicas. **Universidade Federal De Viçosa Departamento De Fitopatologia**. Viçosa. 2010.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 33, nº 3, mai. Jun., 2000.

TOLEDO, C. P.; et. al. Identificação de contaminantes bacterianos no processo de micropropagação de cana de açúcar. In **Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 25, Porto de Galinha. Pernambuco: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2009