

EFEITO DE ANTIMICROBIANOS NO CRESCIMENTO DE *Bradyrhizobium japonicum*

RODRIGUES, L. P.¹, MARQUES, R. Z.¹, GOMES, M. P.¹.

¹Laboratório de Fisiologia de Plantas sob Estresse, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Autor correspondente: marcelo.gomes@ufpr.br

RESUMO

Os efeitos dos antimicrobianos enrofloxacino, gentamicina e sulfametoxazol no crescimento da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* foram investigados através de testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Verificou-se atividade bacteriostática e bactericida dos fármacos em concentrações de $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Os microrganismos foram mais sensíveis ao enrofloxacino que apresentou o menor valor de CIM ($0,61 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), seguido por sulfametoxazol ($19,52 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e gentamicina ($70,32 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). No entanto, essas concentrações se mostram muito superiores às encontradas em solos agrícolas ($0-0,028 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Dessa forma, pode-se afirmar que o crescimento da bactéria não é impedido pela presença desses antimicrobianos nas concentrações ambientais.

Palavras-chave: Antibióticos; *Bradyrhizobium japonicum*; solo.

INTRODUÇÃO

Embora seja um elemento essencial, no ambiente terrestre, o nitrogênio (N) encontra-se majoritariamente em sua forma molecular (N_2), não assimilável pela maior parte dos seres vivos. Apenas uma pequena parcela de seres procarióticos apresenta a enzima nitrogenase, capaz de reduzir o N molecular à sua forma inorgânica, tornando-o, assim, assimilável. Alguns desses organismos estabelecem relações associativas, endofíticas ou simbióticas com as plantas, sendo um dos principais provedores de N necessário para o crescimento e desenvolvimento vegetal (CAMPO et al, 2001). Dentre estes organismos, a bactéria Gram-negativa *Bradyrhizobium japonicum*, se destaca pelo seu papel nodulador em raízes de soja, reduzindo o gasto com fertilizantes nitrogenados para a produção agrícola. Entretanto, assim como para outros microrganismos do solo, essas bactérias estão sujeitas a fatores físico-químicos e a contaminantes do solo, como antimicrobianos, que podem afetar o seu crescimento e metabolismo (EMBRAPA, 2009). O excessivo uso de antimicrobianos na produção animal acaba por contaminar solos agrícolas e águas usadas na irrigação de culturas, acarretando na exposição de microrganismos do solo a esses fármacos. Neste contexto, a presença de antimicrobianos pode reduzir a eficiência da inoculação de culturas de soja com *B. japonicum* caso a bactéria seja sensível aos fármacos. O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de antimicrobianos presentes em solos agrícolas no crescimento de uma estirpe comercial de *B. japonicum*. Além de sua contribuição no aspecto fundamental da ciência, o estudo apresenta relevância econômica e visa alertar para a contaminação das matrizes ambientais por antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Concentração inibitória mínima (CIM)

Obtenção e preparo do inóculo

O inóculo de *Bradyrhizobium japonicum* (estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080) foi fornecido pela empresa Biotrop (Curitiba, Paraná, Brasil) na forma de seu produto comercial Total Nitro Metabolic HC (7×10^9 UFC/ml). Anteriormente ao preparo do inóculo, a viabilidade dos microrganismos foi assegurada ao constatar-se o crescimento de colônias em placas de Petri contendo meio YEM (yeast extract manitol) ágar, com inoculação da suspensão de bactérias pelo método de estriamento com alça. O inóculo foi preparado pela diluição do produto comercial em solução NaCl 0,9% m/v estéril, resultando em uma suspensão salina de $1,5 \times 10^8$ células/mL. A suspensão salina foi então diluída em meio YEM autoclavado, para a obtenção de uma concentração de 5×10^6 células/mL, utilizada nos testes de CIM, de acordo com Lima (2019).

Soluções de antibióticos

Os antimicrobianos enrofloxacino (fluoroquinolona), gentamicina (aminoglicosídeo) e sulfametoxazol (sulfonamida) foram selecionados devido à sua ocorrência em solos agrícolas (LEAL; REGITANO 2010). Padrões grau HPLC dos antimicrobianos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). Inicialmente, os antimicrobianos foram preparados nas concentrações de 25 mg enrofloxacino /ml, 12,5 mg gentamicina /ml e 10 mg sulfametoxazol /ml e então diluídos em caldo YEM, para a obtenção da concentração final de 10 mg/mL.

Montagem das placas

O ensaio foi conduzido em microplacas estéreis de 96 poços, com o uso de 100 µL do inóculo. Através de micro diluições sucessivas, o inóculo foi exposto a concentrações variando de $2,98 \times 10^{-4}$ µg/ml a 5 mg/ml de enrofloxacino, $5,37 \times 10^{-4}$ µg/ml a 4,5 mg/ml de gentamicina e $2,98 \times 10^{-4}$ µg/ml a 5 mg/ml de sulfametoxazol. Todas as concentrações foram testadas em triplicata. O controle dos testes se deu pelo uso de controle positivo do caldo (90 µl de caldo YEM e 10 µl do inóculo), controle negativo do caldo (100 µl de caldo YEM), controle salino (90 µl de caldo YEM e 10 µl de NaCl 0,9%) e controle do antibiótico (90 µl do caldo YEM e 10 µl da solução de antibiótico). As placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D. a 30°C por 48h. Após esse período, as placas foram inspecionadas visualmente para a validação dos controles e verificação do crescimento visível das colônias de *B. japonicum*. A CIM foi determinada como a menor concentração do antibiótico na qual não se observou crescimento bacteriano.

Concentração bactericida mínima (CBM)

O teste de CBM foi conduzido após o CIM, utilizando-se alíquotas de 10µl do primeiro poço opticamente livre de crescimento (CIM) e das duas concentrações acima do CIM. O espalhamento em placas de Petri com meio YEM sólido foi feito pelo método de *spread plate* com alça de Drigalski. As placas foram armazenadas por 48h em câmara tipo B.O.D. a 30°C e

verificou-se o crescimento. Como controle, utilizou-se 10µl do inóculo utilizado no CIM. O CBM foi identificado como a menor concentração que não propiciou o crescimento bacteriano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A CIM da enrofloxacino foi de 0,61 µg/ml e a CBM foi de 1,56 µg/ml. O enrofloxacino é um antimicrobiano que age através da inibição da DNA girase, enzima essencial na síntese de DNA na bactéria. Em solos agrícolas, esse xenobionte é geralmente encontrado em concentrações de até 22,93 ppb (LEAL, 2012), muito inferiores às encontradas para o CIM e CBM neste trabalho. Dessa forma, observa-se que em concentrações ambientalmente relevantes o enrofloxacino não afeta o crescimento de *B. japonicum*. Entretanto, com a persistência desse antibiótico no solo pode acumular chegando a uma concentração de 61,38 ppm (Parente et al, 2019) sendo quase 5x maior que o CBM da bactéria.

A CIM da gentamicina foi de 70,32 µg/ml e a CBM foi de 140,63 µg/ml. Esse antimicrobiano age se ligando à fração 30S do ribossomo, inibindo a síntese de proteína ou produzindo proteínas defeituosas. A gentamicina é encontrada em esterco suíno e de aves em concentrações de 4 e 10 ppb, respectivamente, não excedendo essas concentrações em solos agrícolas (TIECHER, 2017). Semelhantemente ao enrofloxacino, os resultados observados nesse trabalho indicam que em concentrações ambientais, a gentamicina não afeta o crescimento de *B. japonicum*.

Para o sulfametoxazol a CIM encontrada foi de 19,52 µg/ml e a CBM de 39,04 µg/ml. O mecanismo de ação desse antimicrobiano se dá pela interferência na produção de ácido fólico, necessário para a produção de ácidos nucleicos, inibindo, assim, a síntese de DNA/RNA. Nos solos esse antimicrobiano é encontrado em concentrações de até 20 µg/kg (ppm), correspondente à 0,025 µg/ml, e em águas superficiais é observado em concentrações de 0,03-1,02 µg/l (BASTOS, 2012) (LEAL; REGITANO, 2010). Dessa forma, em concentrações ambientais, o antimicrobiano não afeta o crescimento da *B. japonicum*.

Dos três antibióticos testados, a bactéria se mostrou mais sensível ao enrofloxacino, o qual apresentou a menor concentração necessária para inibir e impedir o crescimento da bactéria. Isso provavelmente se deve ao seu mecanismo de ação que, comparado aos outros antibióticos, é mais eficiente sendo inclusive capaz de eliminar cepas resistentes aos mecanismos mais comuns como inibição da síntese de parede celular ou rompimento da membrana plasmática (ANVISA).

Sabendo que antimicrobianos são compostos complexos de difícil decomposição e que persistem na natureza durante um longo tempo (PENÊDA, 2016) devemos considerar que o acúmulo dessas moléculas no solo pode atingir o CIM para *B. japonicum*, inibindo então seu crescimento. Apesar de em concentrações ambientais não afetarem o crescimento da estirpe bacteriana testada, avaliações dos efeitos dos antimicrobianos na capacidade de infecção, nodulação e fixação de N serão necessárias para atestar a tolerância bem como a eficiência da *B. japonicum* aos antimicrobianos bem como definir se em concentrações ambientais esses xenobiontes podem acarretar perdas econômicas ao agronegócio.

LITERATURA CITADA

ANVISA, **Antimicrobianos - principais grupos disponíveis para uso clínico**, Disponível em <https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/aminoglicosideos2.htm> Acesso em: 12/04/2021.

BASTOS, R. V., **Estudo da degradação do antibiótico sulfametoxazol em solução aquosa por fotólise**, Tese (Mestrado em engenharia química), Universidade de São Paulo, Escola politécnica, Departamento de Engenharia Química, São Paulo, 2012.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M.; MENDES, I. C., **Fixação Biológica de Nitrogênio na Cultura de Soja**, Embrapa Soja, Londrina, 2001.

EMBRAPA, **Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia**, Embrapa Agrobiologia, 16 p., Embrapa Agrobiologia Pesquisa e Desenvolvimento, 49, 2009.

LEAL, R. M. P.; REGITANO, J. B., **Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira**, Revista Brasileira de Ciências do Solo, vol.34, no.3, Viçosa, 2010.

LEAL, R., **Resíduos de antibiótico veterinário atingem o solo**, Agência USP, Publicado em 06/11/2012, Disponível em: <<http://www.fiepr.org.br/observatorios/biotecnologia-animal/residuos-de-antibiotico-veterinario-atingem-o-solo-1-21755-198256.shtml>> Acesso em: 12/04/2021.

PARENTE, C. E. T.; AZEREDO, A.; VOLLÚ, R. E.; ZONTA, E.; AZEVEDO-SILVA, C. E.; BRITO, E. M. S.; SELDIN, L.; TORRES, J. P. M.; MEIRE, R. O.; MALM, O., **Fluoroquinolones in agricultural soils: Multi-temporal variation and risks in Rio de Janeiro upland region**, Chemosphere 219, p. 409-417, 2019.

PENÊDA, P. A. B. F., **Ocorrência e Persistência dos antibióticos nos solos**, Tese (mestrado em engenharia do ambiente), Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2016.

TIECHER, T. **Manejo e conservação do solo e da água em pequenas propriedades rurais no sul do Brasil: impacto das atividades agropecuárias na contaminação do solo e da água**, Frederico Westphalen: RS: URI – Frederico Westph., 2017, 181 p.