



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

RESISTÊNCIA DE DIFERENTES CEPAS DE *Bacillus* spp. A ANTIBIÓTICOS

Thiago Costa Ferreira¹, Davi Peres Silva², Wagner Bettiol³.

¹Programa de Pós-graduação em Agronomia/ Proteção de Plantas, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP. ferreira_uepb@hotmail.com

²Centro Universitário Hermínio Ometto, UNIARARAS, Araras-SP. daviperezsilva@gmail.com

³Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna- SP. wagner.bettiol@embrapa.br

RESUMO – A resistência de diversos isolados de *Bacillus* spp. foi testada contra diferentes antibióticos. Para isto, doze diferentes isolados de *Bacillus* spp. [AP 03, AP 12, AP 61, AP 85, AP 88, AP 106, AP 115, AP 117, AP 165, AP 210, AP 240, e AP 512] foram cultivados em TSB, homogeneizados e misturados em meio de cultura semissólido (TSB+Ágar). Este produto foi vertido em placas de Petri previamente preenchidas com meio de cultura sólido (TSA) acrescido de discos de papel impregnado com antibióticos [Azitromicina – AZI (15 mcg); Bactracina – BAC (10mcg); Cefalexina - CEF (30mcg); Cefaclor – CER (30 mcg); Ciprofloxacina - CIP (5 mcg); Gentamicina – GEN (10mcg); Rifamicina – RIF (30mcg); Tetraciclina - TET (30 mcg) e Vancomicina – VAN (30mcg)]. Estes foram acondicionadas em BOD por 28±2°C por dois dias. Após este período foi identificada a formação de halos em redor dos discos de papel acusando a inibição do isolado por um determinado antibiótico. O isolado AP 165 apresentou melhor resultado dentre os demais e foi resistente a oito diferentes antibióticos (88,88% do total) nas condições trabalhadas neste ensaio.

Palavras-chave: Agente de biocontrole, controle alternativo, antibiograma.

INTRODUÇÃO

A busca por uma agricultura mais sustentável tem sido cada vez mais trabalhada visando a diminuição da dependência produtos sintéticos pela utilização de metodologias alternativas a estes, como por exemplo, o uso de microrganismos como agentes de biocontrole de doenças e promoção de crescimento em vegetais (NODARI & GUERRA, 2015; SHARMA et al., 2015).

Dentre os inúmeros microrganismos pesquisados atualmente, podem ser citadas as espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* como microrganismos com diversas funções biológicas, inclusive características benéficas aos vegetais. Estes microrganismos podem ser veiculados em uma determinada área agrícola por meio da utilização de produtos formulados a base de células vivas ou metabolitos destes isolados bacterianos (ONGENA et al., 2002).



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

As formulações à base de isolados de *Bacillus* spp. apresentam diversas vantagens, pois por sua constituição podem conservar melhor os compostos produzidos durante o processo de produção da formulação por um tempo maior (BRANDI, 2015; KLEIN et al., 2016).

Tais formulações podem ser produzidas com a adição de fontes diferentes de nutrientes, fermentadas em meio líquido ou sólido, em diferentes temperaturas, dentre outras características. Porém, a pureza desta formulação é uma importante característica básica que pode ser conseguida por meio de diversas técnicas, dentre elas a utilização de antibióticos que não afetam os organismos de interesse para a formulação, sendo estes, portanto, resistentes à ação destes compostos químicos (ROMEIRO, 2001; CARDOSO & ARAÚJO, 2011; KLEIN et al., 2016). Portanto, o foco deste trabalho é descrever a resistência de diferentes isolados de *Bacillus* spp. contra antibióticos diversos.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de *Bacillus* spp. [AP 03, AP 12, AP 61, AP 85, AP 88, AP 106, AP 115, AP 117, AP 165, AP 210, AP 240, e AP 512], depositados na coleção interna da QUALIBIO [Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP)], foram recuperados pelo método de esgotamento em placas de petri vertidas com BDA (24hrs, 28±2°C). Após este período, foi retirada uma alça de cada colônia bacteriana com o uso da Alça em “O”, esta foi colocada em frascos tipos Elermeyer, previamente preenchido em TSB e estes foram postos em agitadores de mesa por 24hrs, em ambiente controlado a 28±2°C e com 120 RPM de rotação. A metodologia utilizada neste trabalho consiste na técnica denominada de antibiograma, sendo que esta foi adaptada por Romeiro (2001).

Paralelamente foram vertidas placas de Petri (9 cm de diâmetro) cerca de 10 ml de TSA, deixou-se gelificar em ambiente estéril. Após o endurecimento do meio de cultura foram colocados discos de papel previamente impregnados com os seguintes antibióticos e concentrações: Azitromicina – AZI (15 mcg); Bactracina – BAC (10mcg); Cefalexina - CEF (30mcg); Cefaclor – CER (30 mcg); Ciprofloxacina - CIP (5 mcg); Gentamicina – GEN (10mcg); Rifamicina – RIF (30mcg); Tetraciclina - TET (30 mcg) e Vancomicina – VAN (30mcg) .

Em cada placa foram colocados quatro discos de papel, um disco de papel autoclavado (controle) e discos com três diferentes antibióticos. Logo foram montadas três diferentes



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

placas de acordo com o seguinte esquema: i) Controle, Azitromicina, Bactracina e Cefalexina; ii) Controle, Cefalor, Ciprofloxacina e Gentamicina e iii) Controle, Rifamicina, Tetraciclina e Vancomicina. Foram montadas três repetições para cada conjunto.

Então após as 24 horas de incubação, o conteúdo do crescimento bacteriano em TSB foi misturado por três vezes em Vortex e foi adicionado 0,5 mL do crescimento bacteriano de cada isolado em tubos de ensaio contendo meio semissólido em temperatura próxima a $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ (TSB acrescido de 10g de ágar por litro). Esta solução foi agitada novamente em Vortex e em seguida vertida sobre o meio de cultura sólido descrito anteriormente.

As placas foram acondicionadas em BOD por $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por dois dias. Após este período foi identificada a formação de halos em redor dos discos de papel acusando a inibição por um determinado antibiótico (ROMEIRO, 2001). Foi realizada uma análise quantitativa dos dados apresentados, com a contagem dos halos de inibição formados pela interação dos isolados com os antibióticos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com respeito a resistência dos isolados selecionados a diferentes antibióticos foi obtido o seguinte resultado: o isolado AP-165 foi resistente a oito diferentes antibióticos (88,88% do total); os isolados AP-61 e AP-115 foram resistentes a sete antibióticos (77,77% do total); já os isolados AP-85, AP-88, AP-161, AP-210 e AP-240 foram resistentes a seis antibióticos (66,66% do total); os isolados AP-3 e o AP-12 foram resistentes a cinco antibióticos (55,55 % do total) e o AP-512 somente a três diferentes antibióticos (33,33% do total) (Tabela 1).



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Tabela 1. Caracterização de isolados de *Bacillus* spp. quanto a resistência a diferentes antibióticos por meio da técnica de antibiograma modificado.

ISOLADO	ANTIBIÓTICOS								
	AZI ¹	BAC	CEF	CER	CIP	GEN	RIF	TET	VAN
AP 03	+	+	+	+	-	+	-	-	-
AP 12	-	+	-	+	-	+	+	-	+
AP 61	-	+	+	+	+	+	+	-	+
AP 85	-	+	+	+	+	+	-	-	+
AP 88	-	+	+	+	+	-	+	-	+
AP 115	+	+	+	+	-	+	+	-	+
AP 117	-	+	-	+	+	+	+	-	-
AP 161	-	+	+	+	+	-	+	-	+
AP 165	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AP 210	-	+	+	+	+	-	+	-	+
AP 240	-	+	+	+	+	-	+	-	+
AP 512	-	+	-	+	-	-	+	-	-

Legenda: ¹ Azitromicina – AZI (15 mcg); Bacitracina – BAC (10mcg); Cefalexina - CEF (30mcg); Cefaclor – CER (30 mcg); Ciprofloxacina - CIP (5 mcg); Gentamicina – GEN (10mcg); Rifamicina – RIF (30mcg); Tetraciclina - TET (30 mcg) e Vancomicina – VAN (30mcg).

Klein et al. (2016) e Cardoso e Araujo (2011) ao formularem seus respectivos bioprodutos a base de diferentes cepas de *Bacillus* spp., também utilizaram técnicas de purificação de seus produtos, permitindo assim que no instante final da produção e na vida de prateleira destes houvesse uma qualidade satisfatória e assim suas características naturais estariam conservadas.

A diversidade de comportamento fisiológico exemplificada pelos resultados obtidos neste trabalho é interessante para poder descrever que caminhos diferenciados podem ser tomados para que possa ser produzido algum produto biológico com estas cepas. Permitindo que se possa utilizar um ou mais antibióticos no processo de produção de bioprodutos a base das cepas estudadas neste trabalho (ROMEIRO 2001; CARDOSO & ARAÚJO, 2011; SHARMA et al., 2015; KLEIN et al., 2016).

CONCLUSÃO

Os doze diferentes isolados de *Bacillus* spp. apresentaram diferentes resultados quanto a resistência a antibióticos. Podendo ser destacado dentre os resultados que o isolado AP-165



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA **Instituto Agrônômico - Campinas, SP**

7 a 9 de Fevereiro de 2017

apresentou melhor resultado dentre os demais e foi resistente a oito diferentes antibióticos (88,88% do total) nas condições trabalhadas neste ensaio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANDI, F. Formulações comerciais de *Bacillus* spp. no controle de podridão abacaxi da cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2015. 53 f

CARDOZO, R.B.; ARAUJO, F.F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.15, n.12, p.1283–1288, 2011.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. A agroecologia: estratégias de pesquisa e valores. Estudos Avançados. v. 83, n. 3, 2015.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology, v.16, n.3, 2009.

ROMEIRO, R.S. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV, 2001.

SHARMA, K.K.; SINGH, U.S.; SHARMA, P.; KUMAE, A. SHARMA, L. Seed treatments for sustainable agriculture-A review. Journal of Applied and Natural Science. n.7, vol. 1, págs. 521 – 539, 2015.

KLEIN, M.N.; SILVA, A.C.; KUPPER, K.C. *Bacillus subtilis* based-formulation for the control of postbloom fruit drop of citrus. World J Microbiol Biotechnol, v.32, n. 205, 2016. DOI 10.1007/s11274-016-2157-6