ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS TOLERANTES A HERBICIDAS E RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS DE HÁBITAT AQUÁTICO

Gabriela Bussi de Oliveira, Amanda Flávia Silva Rovida, Caroline Rosa Silva, Juliane Gabriele Martins, Marcos Pileggi, e-mail: pileggimarcos@gmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Área: Microbiologia; Subárea do conhecimento: Microbiologia Aplicada.

Palavras-chave: Sistema de respostas, xenobióticos, *Pseudomonas*.

Resumo

A resistência a antibióticos pode estar associada a estruturas bacterianas em comum que também permitem a tolerância a xenobióticos. Neste trabalho foram utilizados isolados de *Pseudomonas,* obtidos de habitat aquático dulcícola, com o objetivo de se investigar a interferência de respostas a antibióticos e herbicidas. Também procuramos analisar o potencial de degradação de herbicidas, comparando isolados e combinações dos mesmos. Foi possível observar que alguns isolados da coleção de bactérias do rio Verde, Ponta Grossa, PR, são tolerantes a diferentes doses dos herbicidas estudados neste trabalho, sendo que um combinado de bactérias isoladas do rio Verde apresentou uma taxa de degradação do herbicida Saflufenacil de 15,46%. Também se apresentaram resistentes aos antibióticos testados. Nossos resultados mostraram que o contato prévio dos herbicidas não interferiu na resistência aos antibióticos. Contudo, a seleção de bactérias degradadoras de xenobióticos e resistentes a antibióticos em um ambiente dulcícola demonstra o potencial biotecnológico e evolutivo destas linhagens bacterianas, mas também traz um alerta ecológico que merece ser investigado.

Introdução

A evolução da resistência levou ao surgimento e disseminação global de muitas bactérias tolerantes. Este fenômeno é uma consequência do processo de seleção natural em microrganismos promovido, principalmente, pelas atividades humanas nos últimos 70 anos da era dos antibióticos (LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015).

O mesmo pode ocorrer com os herbicidas, cuja ampla utilização acarretou melhorias na produção agrícola. Entretanto, seu uso indiscriminado pode levar a altos níveis de toxicidade em solo e água e modificação do microbioma local (OLCHANHESKI et al., 2014). Além disso, os herbicidas podem alterar a concentração inibitória mínima (CIM) de diferentes antibióticos, permitindo que bactérias presentes no ambiente sejam selecionadas para resistência aos mesmos, a taxas mais rápidas do que as em condição de laboratório (KURENBACH et al., 2018).

O gênero *Pseudomonas* é composto por bacilos gram-negativos que apresentam grande capacidade de tolerância a antibióticos (CABOT et al., 2016). Bactérias desse gênero também estão associadas com a degradação de vários compostos xenobióticos (CASTRO, 2015).

O uso contínuo de antibióticos, assim como de herbicidas, merece preocupação, uma vez que apresenta um grande risco ao selecionar bactérias cada vez mais resistentes (WANNMACHER, 2004). Devido à grande quantidade de xenobióticos contaminantes que são lançados diariamente no ambiente, torna-se necessário a realização de

estudos que consigam diminuir os impactos causados por esses compostos. Uma alternativa para tentar controlar este problema seria por meio da biorremediação (MALLA et al., 2018). Por essa razão, muitos microrganismos já foram isolados dos ambientes poluídos e testados para sua capacidade degradadora. Porém, esses microrganismos não são encontrados formando monoculturas no ambiente, mas com diferentes espécies em associações metabólicas e estruturais entre si, o que faz com que elas exibam um desempenho superior na biodegradação (LIU et al., 2017).
Para viabilizar o estudo de interferência entre mecanismos de resistência a antibióticos e mecanismos de tolerância a herbicidas, assim como mecanismos de degradação de linhagens bacterianas isoladas e em combinações, foi utilizada a coleção de bactérias de água doce (rio Verde) do Laboratório de Microbiologia Ambiental da UEPG.

Material e Métodos

Seleção de *Pseudomonas*: Os isolados bacterianos foram inoculados em placas contendo Ágar Cetrimide (20 g/L peptona pancreática de gelatina; 0,3 g/L cetrimida; 1,4 g/L cloreto de magnésio; 10 g/L sulfato de potássio; 15 g/L ágar bacteriológico), meio seletivo e diferencial para *Pseudomonas*. As placas foram incubadas a 30 °C, durante 24h.
Tolerância de Herbicidas: Os isolados foram inoculados em placas contendo Ágar Luria (LB – 10 g/L triptona; 5 g/L NaCl; 5 g/L extrato de levedura) com diferentes concentrações dos herbicidas 2,4-D, sulfentrazone, glifosato, dicamba e saflufenacil. As placas foram incubadas a 30 °C, durante 24h.
Resistência a Antibióticos: Os isolados bacterianos foram inoculados em placas contendo Ágar Luria (LB – 10 g/L triptona; 5 g/L NaCl; 5 g/L extrato de levedura) com diferentes concentrações dos antibióticos (cloranfenicol (CLO), ciprofloxacina (CIP), ampicilina (AMP), tetracilina (TET), nitrofurantoína (NIT) e canamicina (CAN). As placas foram incubadas a 30 °C, durante 24h e posteriormente houve a análise dos halos de crescimento.
Degradação de herbicidas por linhagem isolada e combinações microbianas: O isolado e as combinações bacterianas selecionadas por sua alta capacidade tolerante e pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foram incubadas em meio LB e LB com a dose de campo dos herbicidas sulfentrazone e saflufenacil à 30 °C durante 24h. Após esse período, foi realizada a coleta de 1 mL de meio de cultura, o qual foi centrifugado a 13.000 g durante 5 min. Em seguida foi coletado 900 µL do sobrenadante e colocado em um tubo de microcentrífuga novo. Esse foi levado para leitura no equipamento UPLC.

Resultados e Discussão

O estoque com bactérias coletadas do Rio Verde consiste em 40 isolados que foram selecionados no Ágar Cetrimide a fim de eleger bactérias do gênero *Pseudomonas*. Os 23 isolados que obtiveram crescimento foram testados em meio contendo a concentração de 50x a dose de campo dos herbicidas 2,4-D, sulfentrazone, glifosato, dicamba e saflufenacil. Treze tiveram um crescimento com uma D.O. de 0,5nm, e três deles crescimento superior a 0,7. Ou seja, foi possível observar diferentes graus de tolerância.
Como a linhagem 6 foi a que obteve melhores resultados de tolerância, foram realizados novos testes nas mesmas concentrações já citadas, porém os herbicidas separadamente. O isolado 6 foi tolerante a todas as concentrações testadas e obteve maiores taxas de crescimento em altas concentrações de saflufenacil, o que poderia

ISSN 1676-0093

sugerir que este herbicida possa ser utilizado como fonte de nutrientes para este isolado.

De modo a testar a interferência dos herbicidas sobre a resistência aos antibióticos, foi realizado um experimento envolvendo os 5 herbicidas, além de antibióticos cloranfenicol (CLO), ciprofloxacina (CIP), ampicilina (AMP), tetracilina (TET), nitrofurantoína (NIT) e canamicina (CAN), sendo medido o tamanho dos halos de inibição.

Não houve diferenças no antibiograma na presença e na ausência dos herbicidas. Deste modo, conclui-se que não há interferência dos herbicidas na tolerância aos antibióticos nos isolados avaliados.

Os isolados do estoque consistem em bactérias isoladas da água do rio Verde, localizado no município de Ponta Grossa-PR, as quais apresentaram capacidade de tolerância aos herbicidas e antibióticos testados. Tal fato possivelmente se deve a contaminações das águas deste rio, que podem ter ocorrido devido ao agronegócio local, além de diversos outros insumos, incluindo antibióticos utilizados em pecuária, que podem ter sido lançados no mesmo. A presença de xenobióticos nas águas do rio pode ter induzido uma seleção de bactérias mais resistentes.

Foram conduzidos estudos de degradação de herbicidas para avaliar diferenças nas taxas de metabolização entre isolados e conjuntos de isolados, sendo que os resultados mais expressivos até o momento foram para o isolado 6, e as combinações A (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,22) e B (23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34) em relação aos herbicidas sulfentrazone e saflufenacil (Tab. 1).

Tabela 1 – Porcentagem de degradação dos herbicidas saflufenacil (pelas combinações A e B e isolado 6) e sulfentrazone (pelas combinações A e B). Dados obtidos em UPLC.

	% Degradação
Combinação A- Saflufenacil	15,46153134
Combinação B- Saflufenacil	-4,74507138
Isolado 6- Saflufenacil	-7,400722022
Combinação A- Sulfentrazone	6,879113383
Combinação B- Sulfentrazone	6,953971344

A combinação A apresentou taxas de degradação de 15,46% para o saflufenacil e 6,88% para sulfentrazone em 24 h de incubação. A combinação B só apresentou taxas de degradação para o sulfentrazone, de 6,95%. Interessantemente, o isolado 6 não apresentou taxas de degradação para o saflufenacil (a análise para sulfentrazone foi não conclusiva para esta linhagem e está em andamento), mesmo fazendo parte da combinação A e de ter sido caracterizado como o mais tolerante do estoque. Portanto, não há relação direta entre tolerância e degradação. Possíveis relações metabólicas de degradação deverão ser analisadas em novas combinações destes isolados.

Conclusões

A ampla utilização de antibióticos, assim como de herbicidas, tem favorecido o aumento da resistência e da tolerância dos microrganismos a estas substâncias, devido à pressão seletiva exercida. É possível que muitos corpos d'água estejam contaminados, o que pode exercer influência na seleção de bactérias resistentes a antibióticos e tolerantes a herbicidas no ambiente, como a que encontramos no rio Verde, em Ponta Grossa, PR. Deste modo, torna-se necessário a busca por produtos

biotecnológicos capazes de degradar esses compostos no ambiente. A atual pesquisa permitiu encontrar isolados que em conjunto são capazes de degradar os herbicidas saflufenacil e sulfentrazone. Até agora não foi encontrado artigos sobre degradação destes herbicidas a partir de microrganismos identificados.

Agradecimentos
Ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.
Ao meu orientador Marcos Pileggi.
Aos meus colegas de laboratório que colaboraram com este estudo e me ensinaram todas as técnicas necessárias para a elaboração deste projeto.

Referências

OLCHANHESKI, Luiz R. et al. Mechanisms of Tolerance and High Degradation Capacity of the Herbicide Mesotrione by Escherichia coli Strain DH5-α. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.1-8, 12 jun. 2014. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0099960

LI, Xian-zhi; PLÉSIAT, Patrick; NIKAIDO, Hiroshi. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.337-418, 18 mar. 2015. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00117-14

KARAMI, Solmaz et al. Biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by bacteria with highly antibiotic-resistant pattern isolated from wheat field soils in Kurdistan, Iran. **Environmental Monitoring And Assessment**, [s.l.], v. 188, n. 12, p.1-7, 10 nov. 2016. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1007/s10661-016-5673-9

CABOT, Gabriel et al. Evolution of Pseudomonas aeruginosa Antimicrobial Resistance and Fitness under Low and High Mutation Rates. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 60, n. 3, p.1767-1778, 4 jan. 2016. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/aac.02676-15

DREIER, Jürg; RUGGERONE, Paolo. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 6, p.1-21, 8 jul. 2015. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00660

CASTRO, Diogo Pereira de. **Caracterização do potencial de degradação de um isolado bacteriano oriundo da região Amazônica**. 2015. 163 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015. WANNMACHER L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida?.**Rev. Uso Racional de medicamentos**: temas selecionados. 2004 mar; 1(4): 1-6.

MALLA, Muneer A. et al. Understanding and Designing the Strategies for the MicrobeMediated Remediation of Environmental Contaminants Using Omics Approaches. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 9, p.1-18, 4 jun. 2018. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01132

LIU, Zubi et al. PH Stress-Induced Cooperation between Rhodococcus ruber YYL and Bacillus cereus MLY1 in Biodegradation of Tetrahydrofuran. Frontiers In Microbiology, [s.l.], v. 8, p.1-11, 21 nov. 2017. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02297KURENBACH, Brigitta et al. Agrichemicals and antibiotics in combination increase antibiotic resistance evolution. **Peerj**, [s.l.], v. 6, p.1-20, 12 out. 2018. PeerJ. http://dx.doi.org/10.7717/peerj.5801