

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE ZOOTECNIA**

PEDRO HENRIQUE DOS REIS VIANA

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Bacillus subtilis* EM FORMA
ESPORULADA E GERMINATIVA**

**UBERLÂNDIA – MG
2022**

PEDRO HENRIQUE DOS REIS VIANA

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Bacillus subtilis* EM FORMA
ESPORULADA E GERMINATIVA**

Trabalho apresentado à coordenação do curso de Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2.
Orientadora: Profa. Dra. Bechiolina Beatriz Fonseca

UBERLÂNDIA

2022

PEDRO HENRIQUE DOS REIS VIANA

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Bacillus subtilis* EM FORMA
ESPORULADA E GERMINATIVA**

Trabalho apresentado à coordenação do curso de Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2.

Uberlândia, 16 de agosto de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Belchiorina Beatriz Fonseca
FAMEV - UFU

Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi
FAMEV - UFU

MV. MSc. Paula Fernanda de Sousa Braga
FAMEV - UFU

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela minha vida, e principalmente, por me permitir chegar bem até aqui, acompanhado de toda minha família e amigos, sendo um grande privilégio, devido a tudo que ocorreu durante esses últimos anos. Diante disso, agradeço aos meus pais, Paulo e Edineia, pela criação e todos os ensinamentos que me fizeram ser o que sou hoje. Sou muito grato, também, à minha orientadora, Profa. Bia Fonseca, por me auxiliar nesse projeto, mesmo com todos os imprevistos que fazem parte da ciência. Agradeço muito à equipe do LADOC UFU, e em especial, MV. MSc Simone Sommerfeld, por me acompanhar em todas as etapas desse trabalho, sempre disposta a tirar as dúvidas que surgiram nesse processo bem desafiador, mas sua ajuda fez com que fosse possível finalizar esse experimento. Sendo assim, sou muito grato por todas as pessoas que fizeram parte dessa etapa da minha vida, e que seja apenas o começo de muitas conquistas que estão por vir.

RESUMO

Uma das estratégias de manejo para aumentar a eficiência alimentar em animais de produção é o uso dos probióticos, que são micro-organismos não patogênicos usados como aditivos alimentares e que desencadeiam efeitos benéficos no trato gastrointestinal desses animais, sendo *Bacillus subtilis* uma das espécies mais utilizadas. Apesar de inócuos, é necessário manter vigilância sobre a resistência antimicrobiana nos probióticos para evitar transferência horizontal de genes de resistência para agentes patogênicos. Nesse sentido, o presente trabalho objetivou avaliar a resistência antimicrobiana da cepa G de *B. subtilis* e comparar com uma cepa já inserida no mercado (DSM). As bactérias foram crescidas em ágar nutriente. Em seguida realizou-se teste de sensibilidade antimicrobiana por disco-difusão utilizando amoxicilina + clavulanato, ceftiofur, enrofloxacina, gentamicina, sulfametoxazol + trimetoprim e tetraciclina. O mesmo teste foi realizado com as bactérias em agar nutriente acrescido de metais que forcem a esporulação. Mas nesse caso, ainda foi testado os antibióticos ceftriaxona, neomicina e norfloxacina. Para as bactérias germinativas, também foi realizado teste de concentração inibitória mínima (MIC) pelo método da microdiluição para gentamicina, eritromicina e tetraciclina, e por teste comercial da empresa Laborclin, para a vancomicina. Os resultados demonstraram que ambas as cepas foram sensíveis a todos os antimicrobianos no teste de disco-difusão em forma germinativa. Já na forma esporulada, ambas as cepas foram resistentes a amoxicilina e sulfametoxazol, além de a cepa DSM ter apresentado resistência total também à tetraciclina a cepa F apresentar resistência intermediária. No MIC, a cepa apresentou resistência total a gentamicina e intermediária a eritromicina, enquanto a cepa G foi intermediária para ambas. Conclui-se que a cepa testada apresenta parâmetros de resistência aceitáveis e pode ser usada como probiótico.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Concentração Inibitória Mínima. Microbiologia. Teste de Sensibilidade Antimicrobiana. Probióticos.

ABSTRACT

One of the strategies used to enhance food efficiency in production animals is the use of probiotics, which are non-pathogenic micro-organisms used as food additives that trigger positive effects over the gastrointestinal tract of such animals, with *Bacillus subtilis* being one of the most used species. Although innocuous, it is necessary to keep vigilance over antimicrobial resistance on probiotics in order to avoid horizontal transfer of resistance genes to pathogenic agents. In this case, the present research aimed to evaluate antimicrobial resistance in *B. subtilis*' G strain and compare it to a commercial strain (DSM) which is in the market already. The bacteria were grown in nutrient agar. Then, an antimicrobial sensibility test by disc-diffusion was conducted, using amoxicillin + clavulanate, ceftiofur, enrofloxacin, gentamicin, sulfametoxazole + trimethoprim and tetracycline. The same test was performed to bacteria grown in nutrient agar added of metals that force bacterial sporulation. In such case, ceftriaxone, neomycin and norfloxacin were also used. To the germinative bacteria, a minimum inhibitory concentration test was also conducted, using microdilution method for gentamicin and erithromycin and a commercial test made by Laborclin company for vancomycin. The results shown that both strains in germinative form were sensible for all antimicrobials in the disc-diffusion test. For the sporulated form, however, both strains were amoxicillin and sulfametoxazole-resistant, while DSM strain showed total resistance for tetracycline and G strain had only intermediary resistance. At the MIC test, DSM strain shown total resistance to gentamicin and intermediary resistance eritromicin, while G strain was intermediary for both antimicrobials. In conclusion, the tested strain presented similar antimicrobial resistance parameters to the commercial strain and is apt to probiotic usage.

Keywords: Antimicrobials. Antimicrobial Sensibility Test. Microbiology. Minimum Inhibitory Concentration. Probiotics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1. Caracterização de <i>Bacillus subtilis</i>	9
2.2. Aplicabilidade de <i>B. subtilis</i> como probiótico	9
2.3. <i>B. subtilis</i> e a resistência antimicrobiana.....	11
2.4. Avaliando a resistência antimicrobiana dos probióticos	12
3. METODOLOGIA.....	13
3.1. Crescimento das bactérias	13
3.2. Antibiograma por difusão em discos.....	13
3.3. Concentração Inibitória Mínima (MIC)	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
5. CONCLUSÃO	19
6. REFERÊNCIAS	20

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, é notório que o Agronegócio exerce um papel fundamental para a economia nacional, movimentando cifras milionárias e criando postos de emprego de norte a sul do país. Em 2021, foi estimado que aproximadamente 21% do Produto Interno Bruto (PIB) foi proveniente da agricultura e da pecuária, além de mais de 40% de toda a exportação nacional, evidenciando o papel estratégico do setor enquanto um dos maiores produtores de proteína animal do mundo (CNA, 2022). A agropecuária também exerce importante papel para o abastecimento nacional, uma vez que responde por mais de 90% da demanda alimentícia interna (ABPA, 2021).

Para sustentar tanto a grande demanda interna quanto manter o alto nível de exportação, é necessário que o setor da pecuária otimize cada vez mais as suas cadeias produtivas, conciliando a qualidade do produto final que chega ao consumidor com a rentabilidade ao produtor, o que faz com que as pesquisas por formas de inovação dentro do setor sejam cruciais para a sua subsistência (SANTOS; ARAÚJO, 2017). Dentro da pecuária, é notório que a alimentação dos animais de produção é um dos custos mais altos da cadeia produtiva, podendo chegar a mais de 60% do custo operacional de um setor, de forma que as pesquisas por estratégias que otimizem a eficiência dos animais em absorver os nutrientes consumidos na dieta e transformá-los em proteína animal é um ponto-chave para otimização desses sistemas (OLIVEIRA et al., 2021).

Para proporcionar a plena absorção dos nutrientes, é necessário garantir a saúde do trato gastrointestinal dos animais de produção, e o estabelecimento de micro-organismos benéficos no intestino tem papel de destaque nesse processo. Nesse sentido, uma estratégia de manejo bastante eficaz é o fornecimento de probióticos, que consistem em micro-organismos não-patogênicos que causam efeitos benéficos ao colonizarem a parede intestinal de seus hospedeiros (PEREIRA; NARCISO; MANSANO, 2021). Há vários micro-organismos, entre fungos e bactérias, descritos como probióticos eficientes para os animais domésticos, incluindo o gênero bacteriano *Bacillus* spp., que apresenta diversas espécies e cepas com conhecido efeito probiótico, sendo a espécie *B. subtilis* uma das mais utilizadas (NAYAK, 2021).

Apesar de os micro-organismos probióticos serem inócuos, tanto para a saúde humana quanto animal, é importante assegurar que tais bactérias sejam

susceptíveis aos antimicrobianos, uma vez que a utilização de micro-organismos resistentes como probióticos pode favorecer a transferência horizontal dos genes de resistência às espécies patogênicas e desencadear graves crises de saúde pública (EFSA, 2012).

Partindo deste cenário, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência aos antimicrobianos de uma cepa de *Bacillus subtilis* (cepa G) e compará-la a uma cepa já inserida no mercado (DSM).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Caracterização de *Bacillus subtilis*

A bactéria *Bacillus subtilis* pertencente a um dos gêneros bacterianos mais numerosos conhecidos na atualidade, foi inicialmente descoberta no ano de 1972, em pesquisas desenvolvidas pelo microbiologista alemão Ferdinand Julius Cohn sobre a composição da microbiota radicular de diversas espécies vegetais. Desde então esta espécie vem sendo utilizada como organismo-modelo para pesquisas relacionadas a bactérias gram-positivas, em decorrência da facilidade de crescimento em laboratório, capacidade inerente de absorção e de integração de DNA exógeno ao seu material genético e por não desencadear doenças em humanos ou animais (NAYAK, 2021).

A partir dos anos 1970, com os avanços das tecnologias de genética molecular, foi possível identificar subdivisões no que inicialmente foi descrito como uma única espécie, sendo descritas quatro espécies diferentes como componentes deste grupo, sendo elas: *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. amylolichefaciens*. Atualmente, já existem diversas subespécies e cepas bem caracterizadas (FAN et al., 2017).

Morfologicamente, *B. subtilis* são micro-organismos gram-positivos, aeróbios, com formato de bastão, flagelados, catalase-positivos, de tamanho aproximado de 1 µm de comprimento. Sua distribuição no ambiente é cosmopolita, e apresenta capacidade de formação de esporos e de biofilme em resposta a condições ambientais adversas (KOVACS, 2019).

Além de sua utilização como organismo modelo, as diferentes cepas destas bactérias também são capazes de produzir uma ampla quantidade de metabólitos farmacologicamente ativos, tais como fatores antitumorais, antimicrobianos, imunossupressores, helmintostáticos, biosurfactantes, entre outros, o que aumenta ainda mais o interesse nas pesquisas envolvendo *B. subtilis* (CAULIER et al., 2019).

2.2. Aplicabilidade de *B. subtilis* como probiótico

Probióticos são os micro-organismos que apresentam a capacidade de colonização de maneira positiva do organismo de seres humanos e animais, sem desencadear mecanismos patológicos, contribuindo positivamente para a saúde do trato gastrointestinal de seus hospedeiros, trazendo benefícios à saúde e aos índices produtivos no caso dos animais domésticos (FAO, 2002).

A ação dos probióticos sobre o organismo dos animais domésticos é um fenômeno multifatorial. Quando estes micro-organismos se instalam na mucosa intestinal de seus hospedeiros, tem início um processo de modulação da microbiota local, fazendo com que haja a proliferação de outros micro-organismos benéficos que colonizam de maneira mais eficiente esse espaço, diminuindo as possibilidades de instalação de patógenos e outros agentes potencialmente prejudiciais à saúde do hospedeiro. Além de formarem uma barreira física contra a penetração de patógenos, os probióticos também podem atuar quimicamente, por meio da liberação de subprodutos de seu metabolismo que exercem ação imunomoduladora sobre o organismo animal, ou antimicrobiana, combatendo os patógenos diretamente (MOLINA, 2019).

Existem numerosos micro-organismos utilizados com sucesso como probióticos, incluindo diversas cepas de *B. subtilis* que apresentam excelentes resultados descritos na literatura. No trabalho desenvolvido por França et al. (2018), por exemplo, foram avaliados os efeitos do tratamento de imagos de rã-touro com *B. subtilis* em três concentrações sobre a taxa de crescimento, sobrevivência, imunocompetência e composição hematológica dos animais adultos. Os autores observaram que houve um discreto aumento de ganho de peso nos animais tratados e, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa, foi sugerido que o aumento da dose administrada poderia contornar esse fator. Os parâmetros hematológicos não sofreram alteração, já os parâmetros imunológicos tiveram melhores resultados no grupo tratado com a maior concentração de probiótico, com aumento de capacidade fagocítica, que favorece o melhor desempenho dos animais caso sejam expostos a patógenos, o que leva à conclusão de que a utilização de *B. subtilis* como probióticos tem potencial para melhorar os índices zootécnicos em rã-touro. No estudo realizado por Peet et al. (2020), um probiótico comercial à base de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* foi adicionado à ração de porcos em fase de engorda, e os autores observaram que os animais tratados com o probiótico apresentaram aumento significativo de conversão alimentar e de ganho diário de peso em relação ao grupo controle. No estudo realizado por Milian et al. (2019), um probiótico à base de três cepas de *B. subtilis* foi utilizado em aves de postura da raça Leghorn L33 e os autores puderam observar aumento significativo de peso vivo, consumo diário, conversão alimentar e produção de ovos, bem como a diminuição de ovos trincados e desqualificados, quando comparados ao grupo controle,

demonstrando os benefícios desta bactéria para os índices produtivos dessas aves. Na pesquisa desenvolvida por Bastos et al. (2020), oito cães adultos foram alimentados com ração adicionada de uma mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis* durante um período de 20 dias, e os autores observaram que, embora a digestibilidade não tenha sido alterada, houve queda significativa de concentração de aminas biogênicas nas fezes dos animais, produtos de fermentação de nitrogênio, resultando em fezes com menos odor, um parâmetro considerado de grande interesse para os animais de companhia.

2.3. *B. subtilis* e a resistência antimicrobiana

Os antimicrobianos foram um dos avanços mais importantes da medicina do século XX, uma vez que permitiram que diversas doenças, antes com prognósticos desfavoráveis e alta taxa de mortalidade, se tornassem facilmente tratáveis. O primeiro princípio ativo descoberto foi a arsfenamina, em 1910, utilizada para o tratamento de sífilis. Em 1929, ocorreu a descoberta da penicilina, que permaneceu sendo estudada apenas em modelos experimentais até a Segunda Guerra mundial, quando as condições políticas e sanitárias excepcionais levaram à liberação da utilização das penicilinas em humanos. Os resultados com o uso humano de penicilina foram bastante positivos e a partir de então o uso desses remédios, então chamados de “antibióticos”, foi amplamente incorporado à prática clínica para saúde humana e também animal (ZAFFIRI; GARDNER; TOLEDO-PEREYRA, 2012).

A incorporação do uso dos antimicrobianos ao cotidiano da população fez com que seu uso fosse feito de maneira pouco criteriosa; como resultado, foi observado o surgimento cada vez mais frequente de micro-organismos para os quais estes fármacos já não surtiam mais efeito, um fenômeno denominado resistência antimicrobiana, que consiste na capacidade adquirida pelos micro-organismos de desenvolver mecanismos para burlar a ação dos antimicrobianos (BEZERRA et al., 2017). O fenômeno da resistência antimicrobiana é um problema sério para a Saúde Pública, considerando-se que a emergência de um número cada vez maior de micro-organismos resistentes pode fazer com que as doenças infectocontagiosas voltem à condição de não-tratáveis que tinham antes do surgimento dos antimicrobianos (QUINN et al., 2018).

As causas envolvidas no surgimento da resistência envolvem uma combinação multifatorial da pressão de seleção decorrente da exposição constante

aos antimicrobianos, especialmente quando os protocolos de tratamento são abandonados antes do final, e também os diversos processos pelos quais as bactérias podem trocar material genético entre si (GUIMARÃES et al., 2017). Os mecanismos pelos quais as bactérias adquirem essa resistência são os mais variados possíveis. Para *B. subtilis* e outras bactérias gram-positivas, o principal mecanismo envolvido na neutralização dos efeitos de antimicrobianos está na produção de proteínas protetoras do ribossomo (RPP's), que realizam a inibição competitiva de sítios de ação de várias classes de antimicrobianos que agem se ligando ao ribossomo para impedir seu funcionamento e com isso levar a morte das bactérias pela inativação de seu metabolismo. Ao ocupar tais sítios, as RPPs impedem a ligação dos princípios ativos antimicrobianos e os ribossomos permanecem em atividade (CROWE-MCAULIFFE et al., 2018).

2.4. Avaliando a resistência antimicrobiana dos probióticos

Apesar de se tratar de bactérias incapazes de desencadear processos infecciosos tanto em humanos quanto em animais, é importante manter vigilância constante sobre o surgimento de resistência antimicrobiana em *Bacillus subtilis* e em outros micro-organismos utilizados como probióticos. Isto se dá pelo fato de que essas bactérias, mesmo inócuas, ainda são capazes de compartilhar material genético com outras bactérias, inclusive as patogênicas. Para evitar esta transferência horizontal de genes de resistência, a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (“*European Food Safety Authority*” – EFSA) estabelece parâmetros específicos para testagem de resistência antimicrobiana em todas as espécies de micro-organismos utilizadas como aditivos alimentares para humanos e animais, por meio do teste de concentração inibitória mínima (MIC) (EFSA, 2012). Desta forma, portanto, considerando a ampla utilização de *B. subtilis* como probiótico, é importante fazer avaliações periódicas da resistência antimicrobiana nas cepas deste micro-organismo.

3. METODOLOGIA

3.1. Crescimento das bactérias

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (LADOC-UFU), localizado na Avenida Ceará, s/n°, bloco 2D, sala 33, *campus* Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais. Foram utilizadas as cepas G de *Bacillus subtilis*, originalmente isolada a partir de penas de galinha, e a cepa controle de mercado DSM, congeladas em caldo infusão cérebro coração (BHI) ou leite e estocadas em freezer a -70°C. Para realizar o crescimento, coletou-se uma alçada de colônias que foram estriadas em meio ágar nutriente para crescimento da forma vegetativa. Como meio de esporulação foi usado ágar nutriente com adição de 10,25mg/mL de magnésio e 3,07mg/mL de manganês para induzir a esporulação das bactérias. As placas foram incubadas por 24 horas a 33°C e em seguida realizou-se a contagem das colônias e o cálculo da concentração bacteriana.

3.2. Antibiograma por difusão em discos

Foi realizado o teste de sensibilidade a antimicrobianos das pelo método Kirby-Bauer de disco-difusão (CLSI, 2021). Para isso, foi coletada uma alçada de bactérias que foi transferida para tubo de ensaio contendo solução salina e em seguida homogeneizada com movimentos leves de agitação. As soluções obtidas foram padronizadas por comparação com padrão de escala de MacFarland a 0,5 e semeadas em placas de petri contendo ágar nutriente modificado adicionado a minerais, em cinco direções diferentes de semeadura por placa. O teste foi realizado em triplicata. Após a semeadura, foram depositados os discos contendo os antimicrobianos. Foram utilizados os antimicrobianos amoxicilina + clavulanato (30µg), ceftiofur (30µg), enrofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), sulfametoxazol + trimetoprim (25µg) e tetraciclina (30µg). na superfície das placas, que foram incubadas a 33°C por 24 horas. Depois desse período, os halos inibitórios formados no entorno de cada disco foram mensurados com auxílio de régua e os valores encontrados foram comparados com a tabela mais recente do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI) para *Staphylococcus* sp. (CLSI, 2021). A utilização de *Staphylococcus* sp. como parâmetro é convencional na literatura científica por não haver medidas específicas de *Bacillus* sp. na tabela CLSI para

disco-difusão; ambos os gêneros bacterianos são gram-positivos e são evolutivamente próximos entre si, o que faz com que seus mecanismos de aquisição de resistência operem de maneira semelhante e confere segurança ao parâmetro (FIEDLER et al., 2020).

As bactérias em forma germinativa foram submetidas ao mesmo procedimento, substituindo-se o ágar de esporulação pelo ágar Müller-Hinton, que é o que permite o crescimento da forma não-esporulada. Os antibióticos utilizados foram amoxicilina + clavulanato (30µg), ceftiofur (30µg), ceftriaxona (30µg), enrofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), neomicina (30µg), norfloxacina (10µg), sulfametoxazol + trimetoprim (25µg), e tetraciclina (30µg). Os resultados dos testes, então, foram comparados, para avaliar se houve aumento significativo da resistência para a forma esporulada em relação à germinativa. Os testes foram realizados, tanto para bactérias germinativas quanto esporuladas, em triplicata.

3.3. Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Para avaliar a concentração de antimicrobiano necessária para inibir o crescimento dos bacilos não esporulados foi realizado o teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC) com microdiluição dos antimicrobianos em caldo Müller-Hinton. Os antibióticos testados foram eritromicina, gentamicina e tetraciclina, que foram diluídos para a obtenção das concentrações de 64 µg/mL para eritromicina e gentamicina e de 256 µg/mL para a tetraciclina. Os testes foram realizados em duplicata. Após a diluição, 200 µL de cada solução antimicrobiana foram depositados na primeira fileira de uma placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 100 µL de caldo Müller-Hinton nos poços subsequentes. Foram coletados 100µL dos poços da primeira fileira e transferidos para os respectivos poços na segunda fileira e homogeneizados, depois da segunda para a terceira e assim sucessivamente até chegar à oitava e última fileira (totalizando assim 8 concentrações diferentes para cada fármaco), da qual foram descartados 100 µL de cada poço para que todos ficassem com volume final de 100 µL. Em seguida, foram adicionados em cada poço 80µL de caldo Müller-Hinton e 20µL da solução da cepa bacteriana previamente diluída em salina em tubo falcon de 15mL e padronizada a 0,5 na escala de MacFarland, de forma que todos os poços ficaram com volume final de 200µL. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 33°C e, posteriormente, realizou-se a leitura de turbidez comparando com os parâmetros da

tabela elaborada CLSI, utilizando como padrão as medidas para *Bacillus* spp. para avaliação da resistência aos antimicrobianos analisados, que estabelece ponto de corte de 4µg para gentamicina e enrofloxacina e 8µg para tetraciclina (CLSI, 2021). O controle positivo foi realizado com uma coluna de poços com bactérias e sem antimicrobianos e o controle negativo foi realizado com uma coluna e controle negativo apenas com caldo Müller-Hinton e antimicrobianos, sem bactérias

Também foi realizado o teste de MIC para a vancomicina, neste caso, utilizando-se de kit rápido CIM Vancomicina da Laborclin®, composto por um painel de 10 poços contendo um controle de crescimento e 9 concentrações do antimicrobiano. O teste foi realizado seguindo as orientações do fabricante. Para isso, uma alçada de bactérias foi coletada e suspendida em solução salina estéril padronizada a 0,5 com a escala visual de MacFarland. Em seguida, realizou-se diluição 1:20 da solução original, acondicionada no tubo 1, para o tubo 2, e diluição 1:10 partindo da solução do tubo 2 para o tubo 3, sendo esta última a que foi utilizada para realização do teste. Inseriu-se 100 µL da solução do tubo 3 em cada um dos dez poços do painel, partindo da menor concentração de antimicrobiano para a maior para evitar contaminações. O painel então foi incubado a 33°C por 20 horas. Os resultados foram interpretados observando o painel contra a luz, sendo que a concentração inibitória mínima é dada pelo primeiro poço no qual não se observou precipitação ao fundo. A concentração encontrada foi então comparada com a tabela mais recente fornecida pelo do CLSI, utilizando os parâmetros para *Bacillus* spp., que estabelecem ponto de corte de 4µg (CLSI, 2021; LABORCLIN, 2019). A escolha dos antimicrobianos para o MIC foi feita de acordo com as recomendações do EFSA, que estabelece estes quatro fármacos como marcadores estratégicos de resistência (EFSA, 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados de TSA (Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos) para as cepas DSM (comercial) e G em sua forma germinativa.

Tabela 1. Valores de halos de inibição (cm) para cepas G e controle e mercado (DSM) de *Bacillus subtilis*, em forma germinativa, para nove antibióticos.

CEPA	ANTIMICROBIANO	HALO (cm)	VALORES CLSI 2021 (cm)			RESULTADO
			S	I	R	
DSM	Amoxicilina + Clavulanato	2,6	≥ 1,8	1,4 - 1,7	≤ 1,3	SENSÍVEL
	Ceftiofur	4,0	*	*	*	*
	Ceftriaxona	4,0	≥ 2,3	2,0 - 2,2	≤ 1,9	SENSÍVEL
	Enrofloxacina	3,1	≥ 2,3	2,0 - 2,2	≤ 1,6	SENSÍVEL
	Gentamicina	2,7	≥ 1,5	1,3 - 1,4	≤ 1,3	SENSÍVEL
	Neomicina	2,4	*	*	*	*
	Norfloxacina	3,1	≥ 1,7	1,3 - 1,6	≤ 1,2	SENSÍVEL
	Sulfametoxazol + Trimetoprim	3,0	≥ 1,6	1,1 - 1,5	≤ 1,0	SENSÍVEL
	Tetraciclina	2,8	≥ 1,9	1,5 - 1,8	≤ 1,4	SENSÍVEL
G	Amoxicilina + Clavulanato	2,7	≥ 1,8	1,4 - 1,7	≤ 1,3	SENSÍVEL
	Ceftiofur	3,0	*	*	*	*
	Ceftriaxona	3,0	≥ 2,3	2,0 - 2,2	≤ 1,9	SENSÍVEL
	Enrofloxacina	2,8	≥ 2,3	2,0 - 2,2	≤ 1,6	SENSÍVEL
	Gentamicina	2,7	≥ 1,5	1,3 - 1,4	≤ 1,3	SENSÍVEL
	Neomicina	2,3	*	*	*	*
	Norfloxacina	3,0	≥ 1,7	1,3 - 1,6	≤ 1,2	SENSÍVEL
	Sulfametoxazol + Trimetoprim	2,9	≥ 1,6	1,1 - 1,5	≤ 1,0	SENSÍVEL
	Tetraciclina	2,5	≥ 1,9	1,5 - 1,8	≤ 1,4	SENSÍVEL

*: sem valores de referência na tabela CLSI; S: Sensível; I: Intermediária; R: Resistente.

Os resultados obtidos para o teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) de *B. subtilis* em meio de esporulação estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de halos de inibição (cm) para cepas G e DSM de *Bacillus subtilis*, em forma esporulada, para seis antibióticos.

CEPA	ANTIMICROBIANO	HALO (cm)	VALORES CLSI 2021			RESULTADO
			S	I	R	
DSM	Amoxicilina + Clavulanato	1,3	≥ 1,8	1,4 - 1,7	≤ 1,3	RESISTENTE
	Ceftiofur	0,4	*	*	*	*
	Enrofloxacina	3,3	≥ 2,3	1,7 - 2,2	≤ 1,6	SENSÍVEL
	Gentamicina	2,7	≥ 1,5	1,3 - 1,4	≤ 1,2	SENSÍVEL
	Sulfametoxazol + Trimetoprim	0,0	≥ 1,9	1,5 - 1,8	≤ 1,4	RESISTENTE
	Tetraciclina	1,1	≥ 1,8	1,4 - 1,7	≤ 1,3	RESISTENTE
G	Amoxicilina + Clavulanato	0,9	≥ 1,8	1,4 - 1,7	≤ 1,3	RESISTENTE
	Ceftiofur	1,3	*	*	*	*
	Enrofloxacina	3,3	≥ 2,3	1,7 - 2,2	≤ 1,6	SENSÍVEL
	Gentamicina	2,2	≥ 1,5	1,3 - 1,4	≤ 1,2	SENSÍVEL
	Sulfametoxazol + Trimetoprim	0,0	≥ 1,9	1,5 - 1,8	≤ 1,4	RESISTENTE
	Tetraciclina	1,5	≥ 1,8	1,4 - 1,7	≤ 1,3	INTERMEDIÀRIA

*: sem valores de referência na tabela CLSI; S: Sensível; I: Intermediária; R: Resistente.

Considerando-se a média entre as três placas, observou-se que a cepa DSM em placa de esporulação apresentou-se resistente para amoxicilina + clavulanato, sulfametoxazol + trimetoprim e tetraciclina. Já a cepa G apresentou-se também resistente pra amoxicilina + clavulanato e sulfametoxazol + trimetoprim, porém, resistência intermediária para a tetraciclina. De acordo com a tabela CLSI (2021), a sensibilidade intermediária se caracteriza pela formação de halos entre 1,5 e 1,8 cm, de maneira que duas das três placas se apresentaram intermediárias e uma resistente, sendo a média das três, demonstrada na Tabela 2, enquadrada como intermediária.

Observou-se que, em sua forma germinativa, ambas as cepas foram sensíveis para todos os antibióticos. Este resultado, quando comparado com a tabela para a forma esporulada, corrobora com a teoria de que a esporulação confere resistência aos bacilos contra a ação de determinados antimicrobianos (CAVALCANTE, 2018).

O método utilizado para esporulação utiliza-se de concentrações de metais que tornam o meio inóspito para as bactérias em estado germinativo, embora ainda seja possível encontrar algumas não esporuladas em virtude da distribuição heterogênea dos metais pelo meio (MONTANHOLI, 2018). Ao cultivar essas bactérias no meio modificado por um período de 24 a 48 horas, já foi possível

observar a esporulação e então avaliar a ocorrência de resistência antimicrobiana, seja total ou intermediária.

Na Tabela 3, são apresentados os resultados do teste de concentração inibitória mínima (MIC) para as duas cepas em sua forma germinativa.

Tabela 3. Valores de concentração inibitória mínima (MIC) para cepas G e a cepa de mercado DSM de *Bacillus subtilis*, em forma germinativa, para quatro antibióticos.

CEPA	ANTIMICROBIANO	RESULTADO MIC (µg/mL)	VALORES CLSI 2021			RESULTADO*
			S	I	R	
DSM	Gentamicina	16,00	≤ 4	8	≥ 16	RESISTENTE
	Eritromicina	2,00	≤ 0,5	1-4	≥ 8	INTERMEDIÁRIO
	Tetraciclina	2,00	≤ 4	8	≥ 16	SENSÍVEL
	Vancomicina	0,50	≤ 4	8-16	≥ 16	SENSÍVEL
G	Gentamicina	8,00	≤ 4	8	≥ 16	INTERMEDIÁRIO
	Eritromicina	2,00	≤ 0,5	1-4	≥ 8	INTERMEDIÁRIO
	Tetraciclina	2,00	≤ 4	8	≥ 16	SENSÍVEL
	Vancomicina	0,50	≤ 4	8-16	≥ 16	SENSÍVEL

Classificação com base na tabela CLSI, 2021.

Observou-se que a cepa DSM apresentou resistência a gentamicina e intermediária à eritromicina, ao passo que a cepa G foi intermediária para os esses dois antimicrobianos, e que ambas as cepas foram sensíveis à tetraciclina e à vancomicina.

Conhecer o perfil de resistência antimicrobiana em bactérias probióticas é uma importante ferramenta de vigilância do surgimento de resistência bacteriana. Apesar de a maioria das espécies do gênero *Bacillus* serem inócuos para seres humanos e animais, o que pode levar as pessoas a pensarem que conhecer a sua resistência antimicrobiana é irrelevante, esta informação é estratégica (EFSA, 2012). É necessário conhecer a resistência, para evitar que cepas resistentes continuem sendo utilizadas como probiótico e transfiram horizontalmente esses genes de resistência para agentes patogênicos, o que poderia desencadear graves crises de saúde pública. Além disso, é importante para tentar investigar a origem desta resistência, que pode ter surgido espontaneamente ou ter sido adquirida de outros micro-organismos, para tentar frear a passagem desses genes a outras (ARAUJO 2019). Os resultados apresentados indicam que a cepa G é apta a ser utilizada como probiótico, uma vez que permanece sensível aos antimicrobianos de gerações mais novas, que configuram a última linha de defesa contra micro-organismos patogênicos.

5. CONCLUSÃO

No teste de inibição em discos, a cepa teste apresentou resultados semelhantes à cepa comercial, com 100% de sensibilidade na forma germinativa e resistência também equivalente na forma esporulada, com exceção à tetracilina, à qual a cepa comercial apresentou resistência e a teste, resistência intermediária. Também a concentração inibitória mínima a drogas consideradas importantes para a terapêutica foi similar à cepa comercial, indicando a aptidão da cepa testada para ser utilizada como probiótico.

6. REFERÊNCIAS

ARAUJO, R. C. C. **To kill or not to kill: a question to yeast and bacteria.** 2019. 53f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade do Minho, Minho, 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Estatísticas: Desempenho de Produção.** *In*: Central de inteligência de aves e suínos. Embrapa Suínos e Aves, 05 maio 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>>. Acesso em: 09 mai. 2022.

BASTOS, T. S.; LIMA, D. C.; SOUZA, C. M. M.; MAIORKA, A.; OLIVEIRA, S. G.; BITTENCOURT, L. C.; FELIX, A. P. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* reduce faecal protein catabolites concentration and odour in dogs. **BMC Veterinary Research**, v.16, n.1, p.3736-3740, 2020).

BEZERRA, W. G. A.; HORN, R. H.; SILVA, I. N. G.; TEIXEIRA, R. S. C.; LOPES, E. S.; ALBUQUERQUE, A. H.; CARDOSO, W. C. Antimicrobianos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. **Arch. Zootec.**, v.66, n.254, p.301-307, 2017.

CAULIER, S.; NANNAN, C.; GILLIS, A.; LICCIARDI, F.; BRAGARD, C.; MAHILLON, J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. **Front. Microbiol.**, c.10, n.1, p.302-309, 2019.

CAVALCANTE, D. A. **Genes de proteínas-chave para a montagem e a função da estrutura de esporos bacterianos.** 2018.118f. Tese (Doutorado em Biologia Microbiana) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** Pensilvânia: NCCLS, 2021.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL [CNA]. **Panorama do Agro.** 2021. Disponível em: <<https://www.cnabrazil.org.br/cna/panorama-do-agro>>. Acesso em: 12 mai. 2022.

CROWE-MCAULIFFE, C.; GRAF, M.; HUTER, P.; TAKADA, H.; ABDELSHAHID, M.; NOVACEK, J.; MURINA, V.; ATKINSON, G. C.; HAURYLIUK, V.; WILSON, D. N. Structural basis for antibiotic resistance mediated by the *Bacillus subtilis* ABCF ATPase VmlR. **PNAS**, v.115, n.36, p.8978-8983, 2018.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance.** 2012. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/consultation/120323.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2022.

FAN, B.; BLOM, J.; KLENK, H. P.; BORRISS, R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis* ad *Bacillus siamensis* form an “operational group B. amyloliquefaciens” within the B. subtilis species complex. **Front. Microbiol.**, v.8, n.1, p.315-323, 2017.

FIEDLER, G.; SCHNEIDER, C.; IGBINOSA, E. O.; KABISCH, J.; BRINKS, E.; BECKER, B.; STOLL, D. A.; CHO, G. S.; HUCH, M.; FRANZ, C. M. A. P. Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group in *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets. **BMC Microbiol.**, v.19, n.1, p.250-255, 2020.

FRANÇA, F. M.; DIAS, D. C.; TEIXEIR, P. C.; MARCANTONIO, A. C.; STEFANI, M. V.; ANTONUCCI, A.; ROCHA, G.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; FERREIRA, C. M. Efeito do probiótico *Bacillus subtilis* no crescimento, sobrevivência e fisiologia de rãs-touro (*Rana catesbeiana*). **B. Inst. Pesca São Paulo**, v.34, n.3, p.403-412, 2018.

GUIMARÃES, C. D. O.; FERREIRA, C. S.; SILVA, K. M. C.; VIEIRA, A. B. R.; VIEIRA, J. M. S. Isolamento bacteriano e suscetibilidade microbiana em amostras biológicas de cães. **Pubvet**, v.11, n.2, p.168-175, 2017.

KOVACS, A. T. *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology**, v.27, n.8, p.724-728, 2019.

MILIAN, G. F.; RONDON, A. J.; PEREZ, MM. Q.; MARTINEZ, Y.; BOUCOURT, R.; RODRIGUEZ, M. O.; BERUVIDEZ, A.; PORTILLA, Y. Stability of the zootechnical additives SUBTILPROBIO® C-31, C-34 and E-44 under different temperature conditions. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v.51, n.2, p.197-207, 2019.

MOLINA, A. Probióticos y su mecanismo de acción en alimentación animal. **Agronomía Mesoamericana**, vv.30, n.2, p.601-611, 2019.

MONTANHOLI, H. I. **Proposição de metodologias rápidas na detecção de forma latente bacteriana utilizando espectroscopia de infravermelho próximo e nariz eletrônico**. 2018. 43f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2018.

NAYAK, S. Multifaceted applications of probiotic *Bacillus* species in aquiculture with special reference to *Bacillus subtilis*. **Reviews in Aquiculture**, v.13., n.2, p.862-906, 2021.

OLIVEIRA, C. R.; MARIANI, A. B.; CARVALHO, C. L.; GALLI, C. M.; ANDREATTA, I. Uso de probióticos na produção de suínos: revisão. In: MEDEIROS, J. A.; NIRO, C. M.; MEDEIROS, J. M. P. (orgs.). **Produção animal e vegetal: inovações e atualidades**. São Paulo: Agron Food Academy, 2021, p.646-655.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA (FAO). **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**: Report of a joint FAO-WHO Working Group on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Londres, UN Press, 2002.

PEET, S. C. M. C.; VERHEJEIN, R.; JORGENSEN, L.; RAFF, L. Effects of mixture of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* on the performance of growing-nursing pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v.261, n.1, p.114409-114412, 2020.

PEREIRA, A. C. A.; NARCISO, B. B. D.; MANSANO, C. F. M. Probióticos e a saúde animal. **Archives of Health**, v.2, n.4, p.155-163, 2021.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S. **Microbiologia Veterinária Essencial**. 2.ed. São Paulo: Artmed, 2018.

SANTOS, P. V.; ARAÚJO, M. A. A importância da inovação aplicada ao Agronegócio: uma revisão. **Revista Latino-americana de Inovação e Engenharia de Produção**, v.5, n.7, p.31-47, 2017.

ZAFFIRI, L.; GARDNER, J.; TOLEDO-PEREYRA, L. H. History of antibiotics from salvarsan to cephalosporins. **J. Invest. Surg.**, v.25, p.67-77, 2012.