

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

**MARIA EDUARDA GODINHO MACIEL**

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE *Bacillus subtilis*  
SELECIONADAS PARA USO EM ANIMAIS**

**UBERLÂNDIA – MG  
2022**

**MARIA EDUARDA GODINHO MACIEL**

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE *Bacillus subtilis*  
SELECIONADAS PARA USO EM ANIMAIS**

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**

MARIA EDUARDA GODINHO MACIEL

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE *Bacillus subtilis*  
SELECIONADAS PARA USO EM ANIMAIS**

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. Belchiolina Beatriz Fonseca  
UFU

---

Profa. Dra. Eliane Pereira Mendonça  
UFU

---

MV. MSc. Simone Sommerfeld  
UFU

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus, que me deu oportunidade, força e coragem para superar todos os desafios.

À minha família, aos meus amigos, principalmente à minha mãe, por o todo apoio, paciência e compreensão

Agradeço aos professores, que sempre estiveram dispostos a ajudar e contribuir para um melhor aprendizado, em especial à minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bia Fonseca.

Agradeço à toda a equipe do LADOC-UFU, no qual o presente trabalho foi desenvolvido, em especial à M.V. MSc. Simone Sommerfeld, técnica no referido laboratório, que tanto ajudou com os experimentos e com as dúvidas na confecção do texto e sem a qual este trabalho não seria possível.

Agradeço, também, à minha instituição, por ter me dado a chance e todas as ferramentas que permitiram chegar hoje ao final desse ciclo de maneira satisfatória.

## RESUMO

Maximizar o ganho de peso dos animais de produção é uma das principais linhas de pesquisa para aumento da produtividade na pecuária, sendo que uma das formas é a adição de probióticos à alimentação animal, que são micro-organismos não patogênicos que beneficiam a saúde hospedeiro, sendo a espécie *Bacillus subtilis* uma das mais utilizadas. Considerando esse panorama, o presente trabalho teve como objetivo avaliar resistência antimicrobiana nas cepas de *Bacillus subtilis* (C e E). As bactérias foram crescidas em agar nutriente (AN) e AN modificado para esporulação. Em seguida realizou-se teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) por difusão de discos usando os antimicrobianos: amoxicilina + ácido clavulânico, gentamicina, ceftiofur, enrofloxacin, sulfametoxazol + trimetoprim e tetraciclina, ceftriaxona, neomicina e norfloxacin. Nas bactérias vegetativas também foi realizada análise da concentração inibitória mínima (MIC) para gentamicina, enrofloxacin e tetraciclina por método de diluição seriada e para vancomicina pelo kit comercial Laborclin®. Os resultados do teste de disco-difusão para a forma vegetativa indicaram que a cepa C foi resistente apenas ao sulfametoxazol e a cepa E foi sensível a todos os antimicrobianos. Na forma esporulada, ambas as cepas foram resistentes a amoxicilina + ácido clavulânico e sulfametoxazol e a cepa C também à tetraciclina. No teste de MIC, ambas as cepas foram sensíveis a todos os antimicrobianos. Na forma vegetativa a cepa C foi resistente apenas ao sulfametoxazol e a cepa E foi sensível a todos os antimicrobianos. No teste de MIC, ambas as cepas foram sensíveis a todos os antimicrobianos. Concluiu-se que o ágar enriquecido com metais foi eficiente para induzir esporulação e que ambas as cepas apresentaram padrões aceitáveis de sensibilidade, não havendo resistência a antimicrobianos de última geração, o que permite que sejam usadas com segurança como probióticos.

**Palavras-chave:** Antibiograma; Concentração Inibitória Mínima; Probióticos.

## ABSTRACT

Maximizing weight gain of producing animals is one of the main research fields for productivity raise in Pecuary, and one of the methods for so is the addition of probiotics to animal food, which consist in non-pathogenic micro-organisms that can benefit its host's health, being *Bacillus subtilis* one of the most used species. Considering such panorama, the present research aimed to evaluate antimicrobial resistance in C and E strains of *Bacillus subtilis*. The bacteria were grown in conventional nutrient agar and nutritional agar modified for sporulation. Then, antimicrobial sensibility test by disc-difusion was performed using the antibiotics amoxicillin + clavulanic acid, gentamicin, ceftiofur, enrofloxacin, sulfametoxazole + trimethoprim, tetraciclín ceftriaxone, neomycin and norfloxacin. In vegetative bacteria, minimum inhibitory concentration (MIC) test was also performed for gentamicin, enrofloxacin and tetraciclín by serial dilution method, and for vancomycin by a Laborclin commercial test. The results for disc-difusion for the vegetative form have indicated that C strain was resistant only for sulfametoxazole and E strain was sensible for all antimicrobials. At sporulated form, both strains were resistant to amoxicillin and sulfametoxazole, and C strain also to tetraciclín. For the MIC test, both strains were sensible to all antimicrobials. In conclusion, the metal-added nutrient agar was efficient to induce sporulation and both strains are sensible to the tested antimicrobials, which allow them to be safely used as probiotics.

**Keywords:** Antibiogram; Minimum Inhibitory Concentration; Probiotics.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>9</b>
2.1. <i>Bacillus subtilis</i> .....	9
2.2. <i>B. subtilis</i> como probiótico para animais.....	9
2.3. Resistência aos antimicrobianos em <i>B. subtilis</i> .....	11
2.4. Orientações de avaliação de resistência de probióticos na alimentação animal.	11
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>13</b>
3.1. Crescimento das bactérias.....	13
3.2. Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos.....	13
3.3. Análise da concentração inibitória mínima .....	14
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>22</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O setor da agropecuária é um dos pilares da economia brasileira, tendo contribuído, só no ano de 2021, com mais de 1/5 do Produto Interno Bruto (PIB) nacional e correspondendo a 44% de todas as exportações realizadas no mesmo ano; isso fez com que o Brasil se consolidasse como o 4º maior exportador mundial de produtos agrícolas (CNA, 2021). Para manter os altos níveis de produtividade e os maiores lucros possíveis, as pesquisas do setor agropecuário são de grande importância para buscar que a performance dos sistemas produtivos melhore cada vez mais (ZAMBON et al., 2019).

Na pecuária, dentro de suas diversas cadeias produtivas, um dos aspectos mais importantes almejados pelas pesquisas é a busca pela maximização do ganho de peso dos animais, com o melhor aproveitamento possível das rações e forragens utilizadas na formulação das dietas de cada espécie. Nesse sentido, um intestino saudável é indispensável para que a absorção dos nutrientes obtidos da dieta se dê de maneira plena (OLIVEIRA et al., 2021).

Um dos aspectos mais importantes para garantir a saúde intestinal dos animais domésticos é a garantia de uma microbiota entérica saudável e formada por micro-organismos que promovam benefícios aos animais, prevenindo a instalação de agentes patogênicos por competição além de estimular de maneira direta a absorção de nutrientes (CARMO et al., 2021). Dentre os micro-organismos que podem agir em benefício da saúde da microbiota intestinal desses animais, tem-se os probióticos, definidos pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) como todos os micro-organismos capazes de trazer benefícios ao hospedeiro ao serem administrados em concentrações adequadas (FAO, 2002). Dentre os diversos gêneros bacterianos descritos como probióticos, o *Bacillus* spp., tem grande destaque, sendo que a espécie *Bacillus subtilis* é uma das mais amplamente utilizadas, com diversas cepas empregadas para este fim (YIRGA, 2015).

Um aspecto importante a ser levado em consideração para os probióticos é seu padrão de sensibilidade aos antimicrobianos. Isso se dá pelo fato de que, apesar de os probióticos em si se tratarem de micro-organismos inócuos, a utilização de cepas resistentes pode favorecer a transferência horizontal de genes de resistência para agentes patogênicos, desencadeando problemas graves à saúde pública. Por

esse motivo, o padrão de sensibilidade antimicrobiana deve ser constantemente avaliado (EFSA, 2012).

Considerando o panorama apresentado, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de duas cepas de *Bacillus subtilis* (cepa C e E) a antimicrobianos de diferentes classes farmacológicas, comparando resultados entre as formas vegetativa e esporulada, visando sua posterior utilização como probióticos para animais.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. *Bacillus subtilis*

*Bacillus* spp. é um dos maiores gêneros bacterianos descritos, tendo atualmente um total de 377 espécies já descritas, com diferentes características fisiológicas e funções. De maneira geral, são bactérias Gram-positivas, com formato de bastonete, tamanho máximo de 1 µm em sua forma vegetativa, que possuem distribuição ampla no ambiente e apresentam capacidade de esporulação e de produção de diversos metabólitos de grande importância e efeitos variados (CAULIER et al., 2019).

O grupo de *Bacillus subtilis* é composto por micro-organismos mesofílicos e neutrófilos, com raras cepas capazes de tolerar valores maiores de pH. Originalmente, o grupo era formado por 4 espécies: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. amyloliquefaciens*, descobertos entre o final da década de 1970 e início de 1980; desde então, os avanços na área de genética molecular permitiram a melhor caracterização destes micro-organismos, com a descoberta de diversas subespécies e cepas dentro das quatro originais (FAN et al., 2017).

As cepas de *Bacillus subtilis* apresentam grande interesse científico. Além de se mostrarem inofensivas à saúde humana e animal, esses micro-organismos produzem uma ampla variedade de compostos químicos com diversas funções de grande interesse, como a produção de fatores antimicrobianos, antitumorais, agentes imunossupressores, conservantes para alimentos, biossurfactantes, compostos para controle biológico de pragas e parasitos, dentre outros. A facilidade de cultivo em laboratório também é um atrativo para o desenvolvimento de pesquisas envolvendo essas bactérias (CAULIER et al., 2019).

### 2.2. *B. subtilis* como probiótico para animais

Uma importante aplicação de *B. subtilis* é a utilização destas bactérias como probióticos para os animais domésticos. Por definição, os probióticos são entendidos como os micro-organismos não-patogênicos que, ao serem administrados a alguma espécie animal, promovem a melhoria da saúde intestinal de seus hospedeiros, resultando em benefícios para qualidade de vida e também aumento de índices produtivos (FAO, 2002). Como a saúde intestinal interfere diretamente sobre a absorção dos nutrientes, os probióticos têm potencial para melhoria de índices zootécnicos importantes em animais de produção (CARMO et al., 2021).

Os probióticos atuam sobre o organismo de seus hospedeiros de diversas formas. O primeiro efeito é a modulação da microbiota intestinal, alterando sua composição por meio do estímulo à proliferação de bactérias benéficas. Essa proliferação de microbiota benéfica também promove exclusão competitiva de microorganismos maléficos e/ou patogênicos, reduzindo os riscos de infecções e também de disbioses intestinais. Além de exclusão competitiva, algumas espécies de bactérias utilizadas como probióticos produzem metabólitos antimicrobianos, o que contribui ainda mais para o controle de microbiota maléfica, ou moduladores da resposta imune do hospedeiro, facilitando o combate aos patógenos (OLIVEIRA et al., 2021).

Diversos estudos apontam a aplicabilidade de *B. subtilis* como probióticos para animais domésticos. No trabalho de Ayala et al. (2015), 48 porcas foram divididas em grupos de tratamento com e sem administração de *B. subtilis* e tiveram a composição do leite analisada. Os autores observaram que o leite das porcas que receberam probiótico apresentou maior teor proteico, com destaque para o aumento significativo de imunoglobulinas, indicando que o uso destes pode influenciar positivamente a saúde de porcas e leitões. Já a pesquisa de Garcia-Marengoni (2015), na qual avaliou-se os efeitos do tratamento de juvenis de tilápia do Nilo com cepas de *B. cereus* e *B. subtilis*, observou que ambas as bactérias colonizaram com sucesso o intestino dos peixes, sem prejuízos de seus índices zootécnicos e aumentando suas taxas de glicemia, hematócrito, concentração de hemoglobina e de neutrófilos no sangue, além de contribuir positivamente para redução de impactos ambientais pela redução da concentração de nutrientes nas excretas liberadas na água pelos indivíduos tratados com os probióticos. No trabalho de Barrios et al. (2021), por fim, os autores analisaram os efeitos de *B. subtilis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces cerevisiae* sobre o trato intestinal de frangos de corte, e observaram que o tratamento com esta combinação de probióticos resultou em um aumento da quantidade de vilosidades na região do duodeno, bem como uma maior largura de bases e criptas dessas vilosidades, além do aumento da quantidade de muco nas regiões de duodeno e jejuno, alterações que aumentam a absorção de nutrientes no intestino dos animais.

### **2.3. Resistência aos antimicrobianos em *B. subtilis***

Antimicrobianos são todas as substâncias, sejam de origem natural ou sintética, capazes de combater micro-organismos colonizando organismos animais. Inicialmente denominados como antibióticos, foram descobertos no início do século XX, com destaque para a descoberta da penicilina em 1929 que constituiu um grande marco para a medicina humana e também para a saúde animal. A partir da Segunda Guerra Mundial, a busca pelo desenvolvimento de novos antimicrobianos assumiu grande destaque, uma vez que se observou que sua utilização aumentou de maneira expressiva a expectativa de vida de humanos e animais, além de diminuir perdas nas cadeias produtivas de animais domésticos, pelo fato de diversas doenças antes letais se tornaram facilmente tratáveis (RIBEIRO; CORTEZI; GOMES, 2018).

Com o uso frequente dos antimicrobianos, observou-se também uma pressão de seleção que fez e ainda faz com que várias bactérias desenvolvam mecanismos de resistência aos antimicrobianos. A resistência antimicrobiana é descrita como a capacidade de uma bactéria de desenvolver mecanismos que sejam capazes de torná-la imune aos efeitos de um dado princípio ativo. O processo de aquisição da resistência antimicrobiana envolve diversos fatores, desde a pressão de seleção pela exposição excessiva aos fármacos, até os processos de troca de material genético entre bactérias (COSTA; SILVA-JUNIOR, 2017). Quando uma bactéria apresenta resistência a antimicrobianos de três ou mais classes farmacológicas, passa a ser considerada como multirresistente (ANVISA, 2021).

Diversos mecanismos estão envolvidos no surgimento de resistência antimicrobiana em uma bactéria. Para *B. subtilis*, assim como para diversas outras bactérias gram-positivas, o principal mecanismo verificado se dá pela produção de proteínas de proteção ribossomal (RPPs), que ocupam o sítio de ação dos antimicrobianos sobre os ribossomos destas bactérias, levando a alterações de conformação desses sítios e consequentemente impedindo a ação dos antimicrobianos por inibição competitiva (CROWE-MCAULIFFE et al., 2018).

### **2.4. Orientações de avaliação de resistência antimicrobiana em cepas utilizadas como probióticos na alimentação animal**

Embora o *Bacillus subtilis* em si seja uma espécie bacteriana inócua para seres humanos e animais, a presença de resistência antimicrobiana neste gênero

deve ser acompanhada rigorosamente, uma vez que as bactérias possuem mecanismos de compartilhamento de material genético entre si; por esse motivo Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (*“European Food Safety Authority”* – EFSA) estabelece parâmetros para a testagem de resistência antimicrobiana em micro-organismos designados para utilização como aditivos para alimentação humana e animal, incluindo os probióticos. O comitê estabelece parâmetros de concentração inibitória mínima (MIC) que devem ser respeitados para que um micro-organismo seja considerado suscetível a antimicrobianos e, desta forma, esteja apto para ser um aditivo alimentar (EFSA, 2012).

### 3. METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (LADOC-UFU), localizado na sala 33 do bloco 2D do *campus* Umuarama da instituição, no município de Uberlândia, Minas Gerais. Foram utilizadas as cepas C e E de *Bacillus subtilis* disponíveis no LADOC-UFU, previamente acondicionadas em caldo infusão cérebro coração (BHI) ou leite e congeladas a -70 °C.

#### 3.1. Crescimento das bactérias

As bactérias foram estriadas em ágar nutriente (AN) modificado para esporulação contendo 10,25mg/mL de magnésio e 3,07mg/mL de manganês. Este meio de cultura promove a esporulação das bactérias, porém algumas ainda permanecem em forma vegetativa no meio. As formas vegetativas foram crescidas em ágar nutriente. A temperatura de incubação foi de 33 °C por 24 horas.

#### 3.2. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

As cepas esporuladas foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão de discos de Kirby-Bauer. Uma alçada de colônias foi coletada, colocada em solução salina e homogeneizada, em seguida padronizada com escala visual de MacFarland a 0,5 e então semeada em cinco direções em placas de Petri com ágar nutriente modificado. Os testes foram realizados em triplicata (CLSI, 2021). Em seguida, foram colocados discos de antimicrobianos nas placas, que foram então incubadas a 33°C por 48 horas. Após a incubação, realizou-se a medida dos halos inibitórios formados ao redor de cada disco, com auxílio de uma régua, e os valores foram comparados aos valores da tabela do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI) para *Staphylococcus* sp. (CLSI, 2021). A escolha do parâmetro se deu pelo fato de que não há valores específicos de *Bacillus* sp. nas tabelas CLSI, tendo sido convencionada a utilização de *Staphylococcus* sp. por ambas se tratarem de bactérias Gram-positivas, terem considerável proximidade filogenética e por isso apresentarem mecanismos similares de aquisição de resistência (ZHANG et al., 2020).

As cepas em forma não-esporuladas foram submetidas ao mesmo teste, embora utilizando-se de ágar Müller-Hinton no lugar do ágar nutriente, para que as bactérias crescessem em sua forma vegetativa. Os antimicrobianos escolhidos para

as bactérias esporuladas foram: amoxicilina + ácido clavulânico, gentamicina, ceftiofur, enrofloxacin, sulfametoxazol + trimetoprim e tetraciclina. Para a forma vegetativa foram utilizados estes mesmos antimicrobianos e também ceftriaxona, neomicina e norfloxacin. Os antimicrobianos para este teste foram escolhidos com base na recomendação da EFSA, que cita estes fármacos como estratégicos para acompanhar a aquisição de resistência por parte dos probióticos (EFSA, 2012) Os resultados das bactérias em forma vegetativa e esporulada foram comparados visando analisar se a esporulação destas bactérias aumenta sua resistência.

### **3.3. Análise da concentração inibitória mínima**

Além do teste de difusão, também realizou-se o teste de microdiluição em caldo para análise de concentração inibitória mínima (MIC) dos antimicrobianos gentamicina, eritromicina, tetraciclina e vancomicina. Para os três primeiros, realizou-se a diluição em meio de cultura caldo Müller-Hinton para obtenção de concentração de 256 µg/mL para tetraciclina e 64 µg/mL para gentamicina e eritromicina. Foi utilizada uma placa para cada antimicrobiano e os testes foram realizados em duplicata. Em seguida, 200µL das soluções de antimicrobianos com esta concentração inicial foram colocadas na primeira fileira da placa de 96 poços. Nos poços subsequentes de cada coluna, foram adicionados 100µL de caldo Müller-Hinton. Em seguida, realizou-se a diluição seriada de cada antimicrobiano, retirando-se 100µL da solução do primeiro poço e transferindo para o subsequente na mesma coluna, descartando o mesmo volume da última fileira de poços, de modo que todos os poços ficaram com 100µL de solução. Em seguida, adicionou-se 80µL de caldo Müller-Hinton em cada poço, seguidos de 20µL da solução de cepa bacteriana previamente diluída em salina em tubo falcon de 15mL e padronizada a 0,5 na escala de MacFarland. Em seguida, a placa foi incubada em estufa a 33°C por 24 horas. Ao final deste período, realiza-se a leitura da turbidez de cada poço, comparando com os padrões estabelecidos pelas tabelas do CLSI para *Bacillus* spp. (CLSI, 2021). Para a vancomicina, por sua vez, utilizou-se o kit Laborclin®, para o qual uma alçada de bactérias foi dissolvida em solução salina estéril e padronizada com escala de MacFarland a 0,5 e em seguida foi diluída em proporção 1:20 em um segundo tubo, que em seguida foi diluído em proporção 1:10 em um terceiro tubo. 100 µL da solução deste último tubo foram colocados em cada um dos 10 poços que compõem o cassete do teste rápido (um controle e 9 concentrações de vancomicina)

que em seguida foi incubado por 20 horas 33°C. Após esse período, observou-se a formação de precipitados nos poços, sendo a concentração mínima definida como a do primeiro poço sem formação de precipitado. Os resultados também foram comparados com a tabela CLSI para *Bacillus* spp. (CLSI, 2021; LABORCLIN, 2019).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do antibiograma para as cepas em sua forma vegetativa são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores de halos de inibição (cm) para cepas C e E de *Bacillus subtilis*, em forma vegetativa, para nove antibióticos.

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

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

Fonte: Autoria própria, 2022.

Pode-se constatar que a cepa C apresentou resistência apenas ao sulfametoxazol + trimetoprim, ao passo que a cepa E foi sensível aos nove antimicrobianos.

Na Tabela 2, são demonstrados os resultados para o antibiograma das cepas em ágar modificado para esporulação.

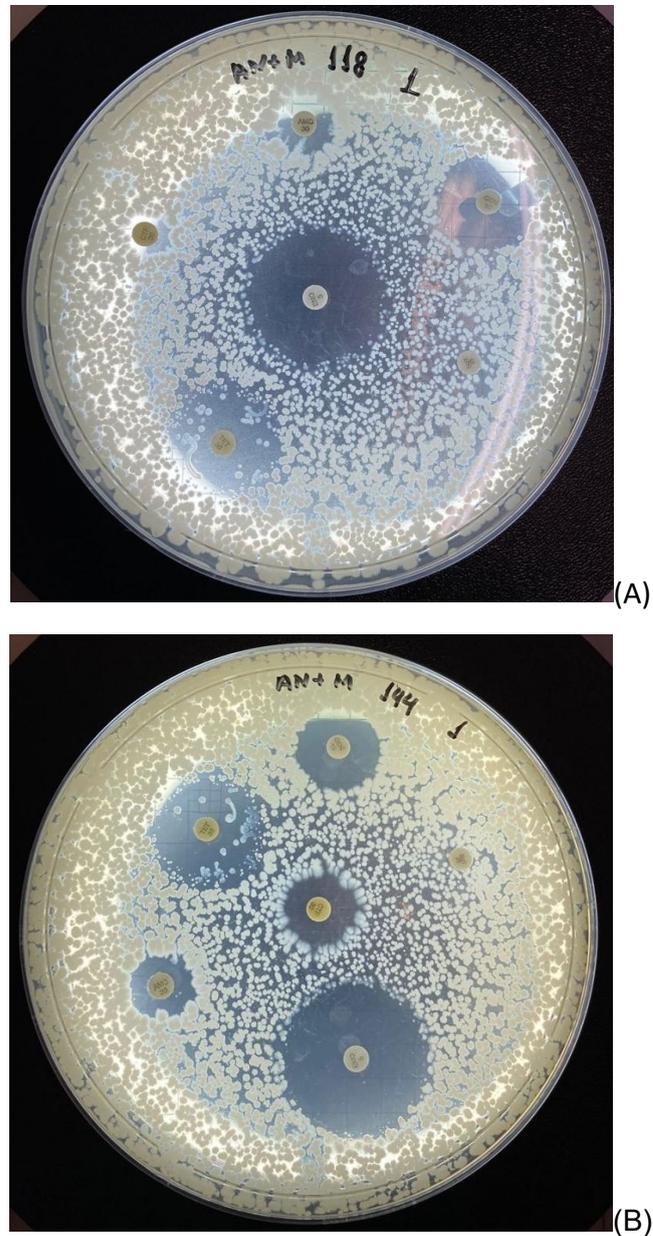
**Tabela 2.** Valores de halos de inibição (cm) para cepas C e E de *Bacillus subtilis*, em forma esporulada, para seis antibióticos.

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

\*: sem valores de referência na tabela CLSI; S: Sensível; I: Intermediária; R: Resistente.  
Fonte: Autoria própria, 2022.

Partindo da média entre os tamanhos dos halos dentre as repetições, observou-se que a cepa C em meio de esporulação foi resistente a amoxicilina + ácido clavulânico e sulfametoxazol + trimetoprim. Para as placas individualmente, observou-se que a terceira repetição desta cepa foi resistente também a tetraciclina, porém as demais foram sensíveis, resultando numa média também sensível. Para a cepa E, por sua vez, considerando a média entre as três repetições, houve resistência para amoxicilina + ácido clavulânico, sulfametoxazol + trimetoprim e também tetraciclina. Analisando resultados individuais das placas, a primeira placa de amoxicilina + ácido clavulânico apresentou-se sensível, a segunda intermediária e a terceira resistente. Para enrofloxacina e gentamicina, as duas primeiras repetições apresentaram-se sensíveis placas formaram halos sensíveis, enquanto a terceira não formou halo, indicando resistência. Para a tetraciclina, por sua vez, o tamanho do halo da primeira placa caracteriza resistência intermediária, a segunda caracteriza sensibilidade e a terceira resistência, resultando numa média resistente. Tal resultado está de acordo com o observado na literatura sobre o aumento da resistência antimicrobiana decorrente da esporulação (BARREIRA, 2020). Ficou claro na leitura das placas que a resistência aparece pelo crescimento microbianos próximo ao disco do antimicrobiano (Figura 1). Assim, essa discrepância entre

resultados para a mesma cepa e o mesmo antibiótico nas repetições é explicada pelo fato de haver cepas esporulada e vegetativas na mesma placa.



**Figura 1.** Teste de sensibilidade antimicrobiana pelo método de disco-difusão para cepas C (A) e E (B) de *Bacillus subtilis*. (Fonte: Acervo pessoal, 2022).

Os resultados para o teste de concentração inibitória mínima (CIM) são apresentados a seguir na Tabela 3.

**Tabela 3.** Valores de concentração inibitória mínima (MIC) para cepas C e E de *Bacillus subtilis*, em forma germinativa, para quatro antimicrobianos.

CEPA	ANTIMICROBIANO	MIC (µg/mL)	CLSI 2021			RESULTADO
			S	I	R	
C	Gentamicina	1	≤ 4	8	≥ 16	SENSÍVEL
	Eritromicina	0,25	≤ 0,5	1 -- 4	≥ 8	SENSÍVEL
	Tetraciclina	0,25	≤ 4	8	≥ 16	SENSÍVEL
	Vancomicina	0,25	≤ 4	8 -- 16	≥ 32	SENSÍVEL
	Gentamicina	1	≤ 4	8	≥ 16	SENSÍVEL
	Eritromicina	0,25	≤ 0,5	1 -- 4	≥ 8	SENSÍVEL
	Tetraciclina	0,25	≤ 4	8	≥ 16	SENSÍVEL
E	Vancomicina	0,25	≤ 4	8 -- 16	≥ 32	SENSÍVEL

S: Sensível; I: Intermediária; R: Resistente.  
 Fonte: A autoria própria, 2022.

Foi possível observar que ambas as cepas se apresentaram sensíveis a todos os antimicrobianos testados pela técnica do MIC. É importante que os micro-organismos utilizados como probióticos sejam sensíveis, porque, mesmo estes sendo incapazes de desencadear doenças, ainda é possível que, ao entrarem em contato com outras bactérias patogênicas, estas consigam adquirir os genes de resistência desses probióticos, e com isso causar complicações ao paciente originalmente afetado e possivelmente se espalhar para outros indivíduos (FERREIRA; SILVA; BETTIOL, 2017).

Com 48 horas de exposição ao meio aditivado com metais, este já se mostrou capaz de induzir a esporulação das bactérias, demonstrada pelo aumento de sua resistência aos antimicrobianos para os quais haviam sido testados na forma vegetativa. Isto comprova que o método é eficiente para indução de esporulação bacteriana em laboratório (RABINOVICH, 1971).

O método de concentração inibitória mínima (CIM) é um importante aliado na avaliação de resistência antimicrobiana, uma vez que permite saber com alto grau de exatidão a dose necessária de um determinado fármaco para eliminação completa de um dado micro-organismo, o que também permite inferir o quão perto está um micro-organismo de superar as doses terapêuticas de um medicamento e passar a se tornar resistente a este (ANVISA, 2021). No presente trabalho, os resultados encontrados demonstraram um padrão de sensibilidade dentro do preconizado pelos parâmetros internacionais para os antimicrobianos testados,

apontando de uma maneira mais precisa que de fato estas cepas estão aptas para utilização como probióticos sem representar qualquer risco à saúde humana ou animal.

## 5. CONCLUSÃO

Ambas as cepas de *B. subtilis* estudadas apresentam um padrão de sensibilidade compatível com as normas internacionais para utilização como aditivos em alimentação humana e animal, sendo considerados aptos para utilização como probióticos.

## 6. REFERÊNCIAS

- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Prevenção de infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde**. 2021. Brasília: ANVISA, 2021. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/manual-prevencao-de-multirresistentes7.pdf> >. Acesso em: 11 jun. 2022.
- AYALA, L.; BOCOURT, R.; CASTRO, M.; MARTINEZ, M.; HERRERA, M. Effect of the probiotic additive *Bacillus subtilis* and their endospores on milk production and immune response of lactating sows. **Cuban J. Agric. Sci.**, v.49, n.1, p. 152-158, 2015.
- BARREIRA, M. E. F. M. **Characterization of genes from a genomic signature for sporulation in the human gastrointestinal tract**. 2020. 120f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2020.
- BARRIOS, O. J. B.; RICO, B. R.; MATUS, J. R. C.; SANTOS, S. L. P.; GONZALEZ, D. G. Association between productive parameters and intestinal histomorphological findings in broilers supplemented with probiotics (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus subtilis*). **Int. J. Morphol.**, v. 39, n.5, p.95-101, 2021.
- CARMO, F. M. S.; MOREIRA, G. M.; ZANINETTI, L. T. D. S.; AMARAL, L. R. S.; FARIA, M. V.; DEL-GAUDIO, N. Uso de probiótico e prebióticos na alimentação de suínos: vantagens e desvantagens – revisão. **Revista Universo Juiz de Fora**, v.13, n.1, p.1-6, 2021.
- 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.
- 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: 29 mai. 2022.
- COSTA, A. L. P.; SILVA-JÚNIOR, A. C.S. Resistência bacteriana aos antimicrobianos e saúde pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica**, v.7, n.2, p.45-57, 2017.
- CROWE-MCAULIFFE, C.; GRAF, M.; HUTER, P.; TAKADA, H.; ABDEL SHAHID, 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 VmIR. **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: 11 jul. 2022.

FAN, B.; BLOM, J.; KLENK, H. P.; BORRIS, 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.

FERREIRA, T. C.; SILVA, D. P.; BETTIOL, W. Resistência de diferentes cepas de *Bacillus spp.* a antibióticos. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n.1, p.1-5, 2017.

GARCIA-MARENGONI, N.; MOURA, M. C.; OLIVEIRA, N. T. E.; BOMBARDELLI, R. A.; MENEZES-ALBUQUERQUE, D. Use of probiotics *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Bacillus subtilis* C-3102 in the diet of juvenile Nile tilapia cultured in cages. **Lat. Am. J. Aquat. Res.**, v.43, n.3, p.515-521, 2015.

LABORCLIN. **CIM Vancomicina**. 2019. Disponível em: <<https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/12/640010-CIM-VANCOMICINA-CX-10T.pdf>>. Acesso em: 26 jul. 2022.

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.

RABINOVICH, L. Estudo sobre a esporulação de uma amostra de *Bacillus*: II - Importância dos íons Mn e Mg na indução do processo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.69, n.2, 1971.

RIBEIRO, R. C. N.; CORTEZI, A. M.; GOMES, D. E. Utilização racional de antimicrobianos na clínica veterinária. **Revista Científica UNILAGO**, v.1, n.1, p.27-40, 2018.

YIRGA, H. The use of probiotics in animal nutrition. **J Prob Health**, v.3, n.12, p.132-138, 2015.

ZAMBON, I.; CECCHINI, M.; EGIDI, G.; SAPORITO, M. G.; COLANTONI, A. Revolution 4.0: Industry vs. Agriculture in a Future Development of SMEs. **Processes**, v.7, n.1, p.36-46, 2019.

ZHANG, Y.; CHEN, M.; YU, P.; YU, S.; WANG, J.; GUO, H.; ZHANG, J.; ZHOU, H.; CHEN, M.; ZENG, H.; WU, S.; PANG, R.; YE, Q.; XUE, L.; ZHANG, S.; LI, Y.; ZHANG, J.; WU, Q.; DING, Y. Prevalence, virulence feature, antibiotic resistance and MLST typing of *Bacillus cereus* isolated from retail aquatic products in China. **Front. Microbiol.**, v.32, n.4, p.2251-2258, 2019.