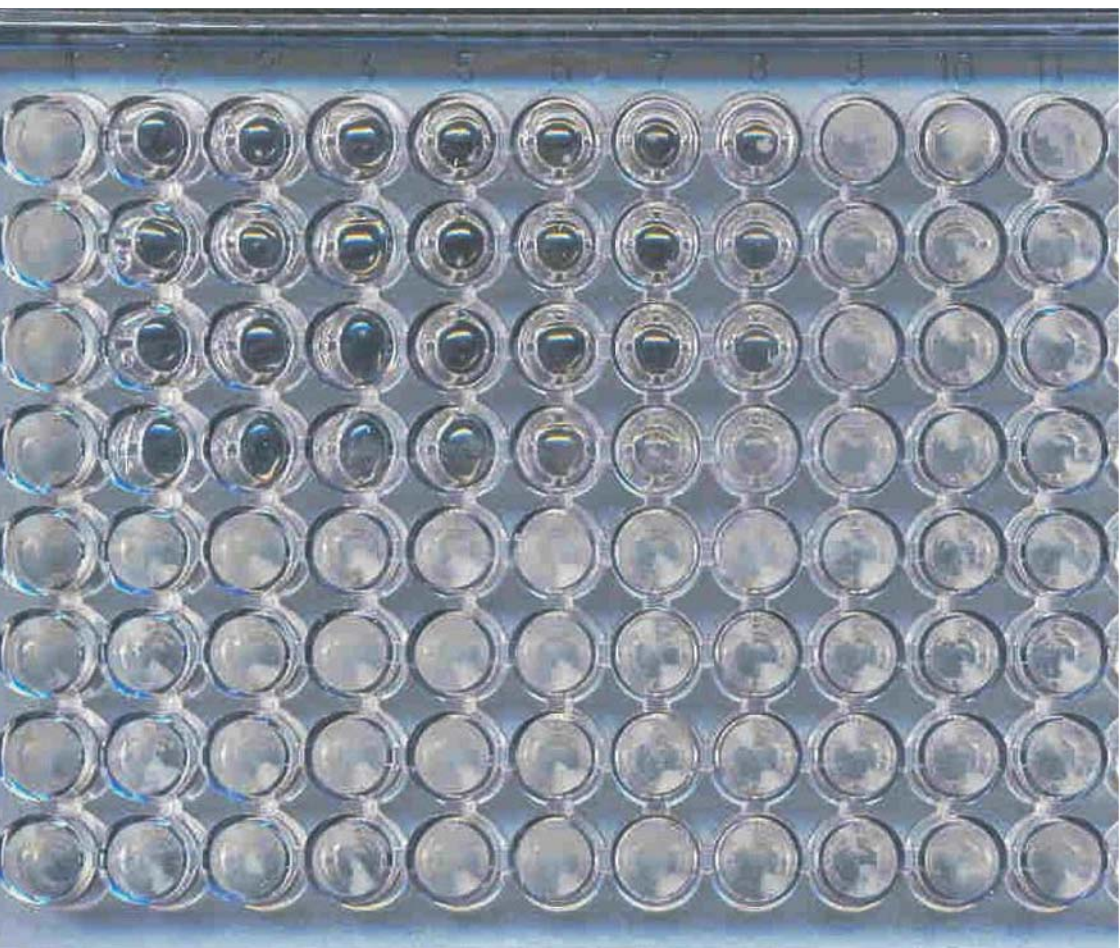


Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 49

Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia

Thaís de Freitas Oliveira
Joilson Silva Ferreira
Paulo Marcos Fernandes Boa Sorte
Veronica Massena Reis
José Ivo Baldani
Stefan Schwab

Embrapa Agrobiologia
Seropédica, RJ
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465, km 7, CEP 23.851-970, Seropédica, RJ

Caixa Postal 74505

Fone: (21) 3441-1500

Fax: (21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Norma Gouvêa Rumjanek

Secretária-Executivo: Carmelita do Espírito Santo

Membros: Bruno José Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Guilherme

Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luis Henrique de Barros Soares

Revisão de texto: Kátia R. dos S. Teixeira e Guilherme M. Chaer

Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Tratamento de ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

Foto da capa: Paulo Marcos Fernandes Boa Sorte

1ª edição

1ª impressão (2009): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agrobiologia

C744

Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. / Thaís de Freitas Oliveira et al. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 16 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento, 49).

ISSN 1676-6709

1. Agente antimicrobiano. 2. Bactéria - Resistência. I. Ferreira, Joilson S. II. Boa Sorte, Paulo M. F. III. Reis, Veronica M. IV. Baldani, José I. V. Schwab, Stefan. VI. Embrapa Agrobiologia. VII. Título. VIII. Série.

CDD 631.46

© Embrapa 2009

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	10
Referências Bibliográficas	14

Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia

*Thaís de Freitas Oliveira*¹

*Joilson Silva Ferreira*²

*Paulo Marcos Fernandes Boa Sorte*³

*Veronica Massena Reis*⁴

*José Ivo Baldani*⁴

*Stefan Schwab*⁴

Resumo

Define-se antibiótico, dentro da classe dos agentes antimicrobianos, como uma substância química necessariamente produzida por um microrganismo, que mata ou inibe o crescimento de outro microrganismo. A atividade antimicrobiana de um agente pode ser medida determinando-se a menor quantidade desse agente necessária para inibir o crescimento de um microrganismo-teste, sendo esta quantidade denominada concentração mínima inibitória (CMI). Neste trabalho, foram determinadas as CMIs de cinco agentes antimicrobianos (antibióticos) frente às seguintes bactérias diazotróficas endofíticas/associativas de trigo e cana-de-açúcar: *Azospirillum amazonense*, *A. brasilense*, *Burkholderia tropica*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae* e *Raoultella terrigena*. Os resultados complementam dados prévios para a descrição dessas bactérias, podendo ser utilizados como auxílio em uma rápida identificação.

¹ Bolsista de Iniciação Científica do INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas - CNPq/Embrapa Agrobiologia, Graduanda em Agronomia, UFRRJ. E-mail: tha.oliverfre@hotmail.com

² Pós-Doutorando da Fundação Educacional Charles Darwin/ Embrapa Agrobiologia. E-mail: joilsonsf@yahoo.com.br

³ Doutorando em Agronomia-Ciência do Solo da UFRRJ/Embrapa Agrobiologia. E-mail: paulobsorterural@yahoo.com.br

⁴ Pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, Rod. BR 465, km 7, Seropédica/RJ. E-mail: veronica@cnpab.embrapa.br; ibaldani@cnpab.embrapa.br; sschwab@cnpab.embrapa.br

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of antibiotics for eight diazotrophic bacterial strains from the Embrapa Agrobiologia Culture Collection

Abstract

*Within the class of antimicrobial agents, antibiotic is defined as a chemical substance necessarily produced by a microorganism that kills or inhibits the growth of another microorganism. The antimicrobial activity of an agent can be measured by determining its lowest quantity necessary to inhibit the growth of a test-microorganism. This quantity is defined as the minimal inhibitory concentration (MIC). In this work, MICs of five antimicrobial agents (antibiotics) were determined for the following endophytic/associative diazotrophic bacteria of wheat and sugarcane: *Azospirillum amazonense*, *A. brasilense*, *Burkholderia tropica*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae* and *Raoultella terrigena*. Results complement previous data on the description of these bacteria, and can be used as an aid to their fast identification.*

Keywords: antimicrobial agent, sensibility, resistance.

Introdução

De modo importante, muitas estirpes diazotróficas têm sido isoladas de gramíneas, com o uso de meios semi-sólidos sem N, metodologia esta desenvolvida na década de 1970 na Embrapa Agrobiologia (DÖBEREINER, DAY e DART, 1972). Desta forma, alguns endófitos fixadores de nitrogênio foram isolados no Brasil, tendo-se mostrado promissores para a inoculação em cana-de-açúcar, como as espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica* (OLIVEIRA et al., 2002), e em trigo, como *Azospirillum brasilense*, *H. seropedicae* e *Raoultella terrigena*.

A descrição de novos isolados promissores para uso como inoculante/ biofertilizante envolve sua caracterização fenotípica, entre outros aspectos. Das avaliações fenotípicas realizadas para a descrição de novas espécies bacterianas, a determinação da sensibilidade/resistência a antibióticos tem sido prática corrente (CHEN et al., 2008; PENG et al., 2008; LIU et al., 2008; HAN et al., 2008).

Define-se agente antimicrobiano como sendo um produto químico natural ou sintético que mata ou inibe o crescimento de microrganismos; o antibiótico, dentro da classe dos agentes antimicrobianos, é uma substância química necessariamente produzida por um microrganismo, que mata ou inibe o crescimento de outro microrganismo (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2003). A atividade antimicrobiana de um agente pode ser medida determinando-se a menor quantidade desse agente necessária para inibir o crescimento de um microrganismo-teste, sendo esta quantidade denominada concentração mínima inibitória (CMI). Classicamente, para a determinação da CMI, uma série de tubos de cultura é preparada pela adição de uma concentração diferente do agente em cada tubo, os quais são, posteriormente, inoculados. Após a incubação, os tubos são inspecionados, verificando-se a ocorrência de um crescimento visível (turbidez). O tubo contendo a menor concentração do agente capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo-teste define a CMI. Esse procedimento é frequentemente denominado técnica da diluição em tubos.

A CMI não é constante para um determinado agente antimicrobiano, uma vez que pode ser afetada pela natureza do microrganismo-teste utilizado, tamanho do inóculo, composição do meio de cultura, tempo e condições de incubação, tais como temperatura, pH e aeração (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2003). Quando todas as condições são padronizadas, é possível comparar diferentes agentes antimicrobianos, determinando-se qual o mais eficaz contra um determinado microrganismo, ou realizar a avaliação da atividade de um único agente contra uma variedade de microrganismos.

Neste trabalho, foram determinadas as CMIs de cinco agentes antimicrobianos (antibióticos) frente às bactérias *Azospirillum amazonense*, *A. brasilense*, *Burkholderia tropica*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae* e *Raoultella terrigena*. Os resultados obtidos complementam dados da literatura para a caracterização fenotípica dessas bactérias.

Material e Métodos

Estirpes, antibióticos, meios e condições de cultivo

As bactérias das espécies *A. amazonense* (estirpe CbamC), *A. brasilense* (Sp245), *B. tropica* (Ppe8), *G. diazotrophicus* (PAL5), *H. rubrisubalbicans* (HCC103), *H. seropedicae* (estirpes HRC54 e ZAE94) e *R. terrigena* (TFi08) foram pré-inoculadas em 2 mL de meio líquido DYGS modificado (glicose 2,0 g/L, extrato de levedura 2,0 g/L, peptona 1,5 g/L, K_2HPO_4 0,5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/L, ácido glutâmico 1,5 g/L, ácido málico 2,0 g/L e pH variando em função da bactéria utilizada) (RODRIGUES NETO et al., 1986) e incubadas a 30°C em agitador a 200 rpm por uma noite.

Soluções-estoques de antibióticos foram preparadas para, a partir das mesmas, se realizar as diluições nos meios de cultura, conforme preconizado por Maniatis, Fritsch e Sambrook (1982). Estas soluções-estoques foram assim constituídas: cloranfenicol 34 mg/mL em etanol 80%; tetraciclina 10 mg/mL em etanol 80%; gentamicina 40 mg/mL em H_2O ; canamicina 10 mg/mL em H_2O ; e estreptomicina 10 mg/mL em H_2O .

As soluções-estoques de antibiótico cujo solvente era H₂O foram esterilizadas em filtro de 0,22 mm de retenção. Todas as soluções-estoques foram armazenadas a -20°C em alíquotas de 1 mL.

Determinação da CMI de antibióticos para as bactérias

O preparo da microplaca (tipo ELISA fundo chato) com as diluições seriadas de um determinado antibiótico consistiu em preencher os 96 poços da mesma com meio líquido DYGS, sendo aplicados 150 µL de meio nos poços da 1^a, e da 3^a a 12^a coluna, e 300 µL nos poços da 2^a coluna (Fig. 1). Na 2^a coluna, foi preparada a concentração mais alta de antibiótico, adicionando uma determinada quantidade de sua solução-estoque (item anterior). A partir desta 2^a coluna, foi iniciada a diluição seriada (fator 2 ×) ao longo da microplaca até a 11^a coluna. Para isto, foi utilizada uma micropipeta multicanal, com a qual o meio foi homogeneizado e metade do volume dos poços da 2^a coluna, ou seja, 150 µL, foi transferido para os poços da 3^a coluna, para diluição por homogeneização. A partir da 3^a coluna, metade do volume dos poços (150 µL) foi transferido para os poços da 4^a coluna, e assim sucessivamente, até chegar à 11^a coluna, quando, após a homogeneização, metade do volume de meio com antibiótico diluído (150 µL) foi descartado (Fig. 1). Os intervalos de concentração do antibiótico na microplaca, nas colunas 2^a-11^a (Fig. 1), foram: 0,4 a 200 µg/mL de tetraciclina, 5,9 a 3000 µg/mL de canamicina, 2,9 a 1500 µg/mL de gentamicina, 2,0 a 1000 µg/mL de estreptomicina ou 1,0 a 500 µg/mL de cloranfenicol. Estas concentrações de antibiótico foram escolhidas utilizando como referência os valores de CMI para *Escherichia coli* previamente estabelecidos (ANDREWS, 2001). Dessa forma, para um determinado antibiótico, o valor da CMI para *E. coli* foi fixado nos poços de uma coluna central (6^a ou 7^a) da microplaca e o conteúdo de antibiótico dos poços das colunas restantes foram calculados respeitando o fator de diluição 2x.

Para a inoculação da bactéria nas colunas 1^a-11^a da microplaca, foi utilizado 1 µL de suspensão bacteriana do pré-inóculo por poço. Após a inoculação, as microplacas foram mantidas em agitador a > 200 rpm, 30°C, durante uma noite. Após o crescimento bacteriano, a densidade ótica

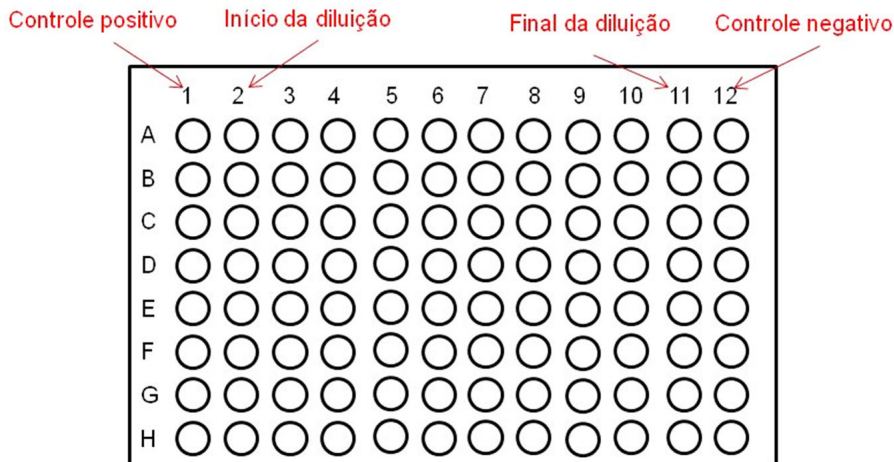


Fig. 1. Esquema da microplaca utilizada na diluição dos antibióticos. As diluições de antibióticos foram realizadas nas colunas 2-11 (ver texto para maiores explicações); na coluna 1 foi utilizado o controle positivo para crescimento bacteriano, na ausência de antibiótico; na coluna 12 foi utilizado o controle negativo, meio estéril.

das culturas ($D.O_{595}$) foi determinada em espectrofotômetro de microplacas iEMS (Labsystems). As médias dos valores de $D.O_{595}$ obtidos foram traçadas em função das concentrações iniciais de antibiótico, após se descontar a média dos valores de $D.O_{595}$ do meio estéril (controle negativo). A CMI foi considerada como sendo a menor concentração de antibiótico em que não houve crescimento significativo da bactéria, por comparação com o controle negativo (comparação entre os valores de $D.O_{595}$ pelo teste t unilateral, 95% de intervalo de confiança).

Resultados e Discussão

As CMIs de cinco antibióticos testados frente às oito estirpes de bactérias diazotróficas são apresentadas na Tab. 1. De um modo geral, as estirpes testadas demonstraram maior resistência ao antibiótico estreptomicina (maior CMI em quatro das oito estirpes testadas, e maior média geral de

Tabela 1. Concentração Mínima Inibitória dos antibióticos tetraciclina, gentamicina, canamicina, estreptomina e cloranfenicol, para as bactérias *A. amazonense*, *A. brasilense*, *Burkholderia tropica*, *G. diazotrophicus*, *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae* (estirpes HRC54 e ZAE94) e *R. terrigena*.

Espécie bacteriana	CMI (µg/mL)				
	Cloranfenicol	Tetraciclina	Gentamicina	Canamicina	Estreptomina
<i>Azospirillum amazonense</i>	8	50	12	6	16
<i>Azospirillum brasilense</i>	4	0,4	94	23	250
<i>Burkholderia tropica</i>	62	0,8	12	23	62
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	250	100	47	12	125
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	4	<0,3	40	31	40
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54	16	<0,3	20	31	40
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> ZAE94	8	0,8	12	6	4
<i>Raoultella terrigena</i>	31	3	23	47	38

CMI = concentração mínima inibitória (em que não houve crescimento quando comparado com o controle sem antibiótico).

CMI, de ≈ 72 µg/mL) e maior sensibilidade a tetraciclina (menor CMI em seis das oito estirpes testadas, e menor média geral de CMI, de ≈ 1 µg/mL).

A Fig. 2 mostra dois tipos de análises com os dados obtidos: uma comparação da sensibilidade de um único microrganismo (neste caso, *G. diazotrophicus*) frente a vários antibióticos, ou ainda uma comparação entre as sensibilidades de várias bactérias frente a um único antibiótico (cloranfenicol). Nos exemplos da Fig. 2, a bactéria *G. diazotrophicus* mostrou maior sensibilidade frente aos antibióticos tetraciclina e canamicina, e maior resistência frente a cloranfenicol e estreptomina. Por outro lado, considerando a sensibilidade das estirpes testadas frente ao antibiótico cloranfenicol, verifica-se uma maior sensibilidade das estirpes de *A. brasilense* e *H. rubrisubalbicans* do que a de *G. diazotrophicus*.

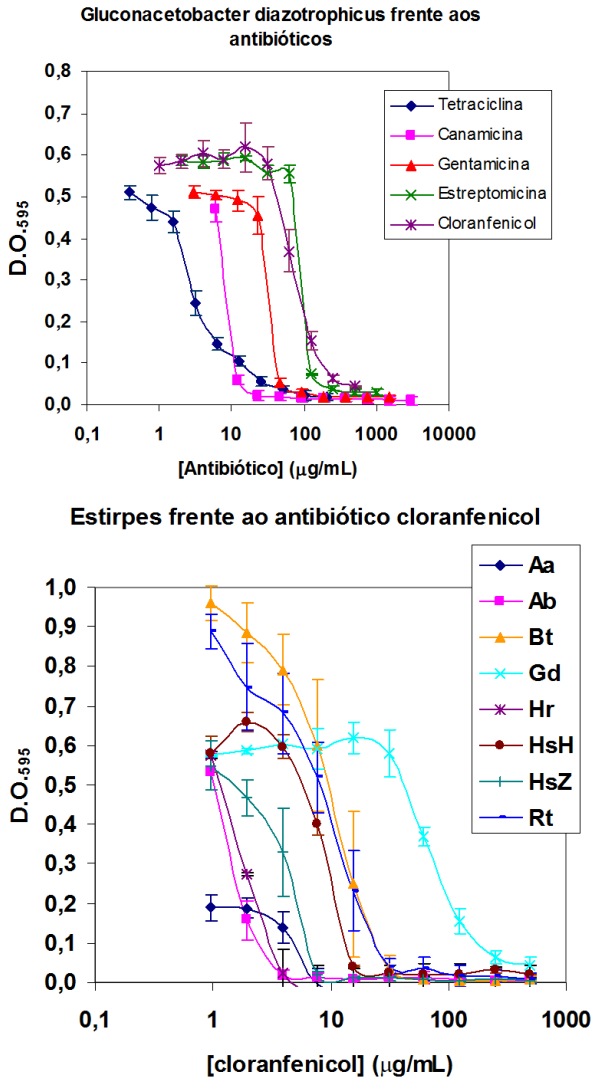


Fig. 2. Crescimento de uma estirpe (*G. diazotrophicus* PAL5) frente a cinco antibióticos (gráfico da esquerda); e das oito estirpes utilizadas neste estudo frente ao antibiótico cloranfenicol (gráfico da direita). Legenda: Aa = *A. amazonense* CbamC, Ab = *A. brasilense* Sp245, Bt = *B. tropica* Ppe8, Gd = *G. diazotrophicus* PAL5, Hr = *H. rubrisubalbicans* HCC103, HsH = *H. seropedicae* HRC54, HsZ = *H. seropedicae* ZAE94, Rt = *R. terrigena* TFi08.

Trabalhos prévios envolvendo estirpes de bactérias diazotróficas mostraram sua sensibilidade/resistência a antibióticos diversos (MISHRA, ROY e BHATTACHARYA, 1979; MAGALHÃES, BALDANI, e SOUTO, 1983; BALDANI et al., 1986; URETA et al., 1995; MOWADE e BHATTACHARYYA, 2000). À primeira vista, os resultados desses trabalhos parecem diferir em certo grau dos resultados aqui obtidos. Porém, e conforme referido anteriormente, a resistência/sensibilidade de uma bactéria a um antibiótico (ou a CMI de um antibiótico frente a uma bactéria) depende da natureza do microrganismo-teste utilizado (estirpe) e das condições de cultivo. Resultados nossos não apresentados neste Boletim mostraram que o cultivo de algumas das estirpes utilizadas neste estudo em meio sólido alterou significativamente a resistência/sensibilidade das bactérias ao agente antimicrobiano comparativamente a quando as bactérias foram cultivadas em meio líquido. Desta forma, os resultados apresentados neste Boletim não podem ser diretamente comparados com os da literatura. Por outro lado, esses dados enfatizam a importância de se descrever detalhadamente as estirpes e as condições de cultivo para a apresentação de resultados sobre a sensibilidade/resistência a antibióticos por bactérias.

As potenciais aplicações dos resultados descritos neste trabalho são em protocolos de transformação genética e como auxílio na identificação das estirpes avaliadas. Plasmídeos sintéticos têm sido utilizados para a transferência/introdução de genes das mais diversas fontes ou funções em células bacterianas. Estes plasmídeos são introduzidos nas células através de técnicas de transformação genética e, normalmente, além do(s) gene(s) com função específica, carregam também outro gene que confere às células hospedeiras resistência a um determinado antibiótico, o que permite o crescimento seletivo das células transformadas na presença do mesmo. Previamente ao procedimento de transformação, é necessário conhecer a sensibilidade da bactéria frente ao antibiótico, conhecendo-se sua CMI, para que, após a transformação, seja realizada a seleção dos transformantes utilizando-se quantidades econômicas e ao mesmo tempo eficientes de antibiótico. Os resultados deste trabalho permitem, assim, a utilização de uma quantidade eficiente e ao mesmo tempo econômica de antibiótico para a seleção de células transformantes dessas estirpes após a introdução de plasmídeos sintéticos por técnicas de transformação.

Referências Bibliográficas

- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 48 suppl. S1, p. 5-16, 2001.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a new root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 36, p. 86-93, 1986.
- CHEN, W. -M.; FARIA, S. M. de; CHOU, J. -H.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; BONTEMPS, C.; YOUNG, J. P. W.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp.nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 9, p. 2174-2179, set. 2008.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J. M.; DART, P. J. Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugar cane and some other tropical grasses. **Plant Soil**, The Hague, v. 37, n. 1, p. 191-196, 1972.

HAN, T. X.; HAN, L. L.; WU, L. J.; CHEN, W. F.; SUI, X. H.; GU, J. G.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, 2610-2618, 2008.

LIU, R.; LIU, H.; FENG, H.; WANG, X.; ZHANG, C. -X.; ZHANG, K. -Y.; LAI, R. *Pseudomonas duriflava* sp. nov., isolated from a desert soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 1404-1408, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 10. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2003.

MAGALHÃES, F. M. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum species*. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

MISHRA, A. K.; ROY, P.; BHATTACHARYA, S. Deoxyribonucleic acid-mediated transformation of *Spirillum lipoferum*. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 137, p. 1425-1427, 1979.

MOWADE, S.; BHATTACHARYYA, P. Resistance of P-solubilizing *Acetobacter diazotrophicus* to antibiotics. **Current Science**, Bangalore, v. 79, p. 1591-1594, 2000.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N_2 -fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 242, p. 205-215, 2002.

PENG, G.; YUAN, Q.; LI, H.; ZHANG, W.; TAN, Z. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 2158-2163, 2008.

URETA, A.; ALVAREZ, B.; RAMÓN, A.; VERA, M. A.; MARTÍNEZ-DRETS, G. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 172, p. 271-277, 1995.

Embrapa

Agrobiologia

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

