

## IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA E PERfil DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS DE BACTÉRIAS LIPOLÍTICAS

ANGELITA MILECH<sup>1</sup>; ANDRÉS FELIPE GIL RAVE<sup>2</sup>; GREICE HARTWIG SCHWANKE PEIL<sup>2</sup>; YOHANA MELANIA LOPEZ HERNANDES<sup>2</sup>; PATRÍCIA DA SILVA NASCENTE<sup>2</sup>; ANELISE VICENTINI KUSS<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – angelitamilech@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – pipe.biologia@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – schwanke.greice@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – yohanalopez6@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – patsn@gmail.com.br

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – anelisevk@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos que apresentam alta atividade lipolítica constituem a principal fonte das lipases comercializadas para utilização em aplicações industriais. Portanto, formulações biológicas são utilizadas para remoção de poluentes contidos em efluentes industriais, em caixas de gordura, fossas sépticas, sumidouros, filtros biológicos e esgotos sanitários (VEIGA, 2003). Entretanto os micro-organismos presentes nestes ambientes vêm apresentando resistência a vários antibióticos utilizados nessas atividades.

A resistência de bactérias a antibióticos e outros fármacos antimicrobianos é um fenômeno natural e de pressão seletiva. A resistência microbiana a antibióticos constitui um dos principais problemas de saúde pública e ambiental, sendo uma ameaça séria. Observa-se que o aumento de resistência em bactérias ocorre nos países onde existe prescrição excessiva de antibióticos para uso humano ou uso indiscriminado destes compostos em medicina veterinária para diversos fins, principalmente, como promotores de crescimento animal (SANTOS, 2004).

O processo metabólico dos micro-organismos é responsável pela remoção de contaminantes (MANDRI; LIN, 2007), reduzindo a sua concentração no local da remoção (BELLO, 2007) ou da transformação dos poluentes em compostos de baixa toxicidade (COLLA; COSTA, 2003). Sendo assim muito utilizados em processos de biorremediação. Quando isoladas do ambiente, as bactérias não apresentam características morfológicas suficientes para sua identificação. Por isso, foram desenvolvidas metodologias que avaliam as reações metabólicas ou enzimáticas, possibilitando seu agrupamento e identificação em nível de gênero ou espécie (BUSCH; NITSCHKO, 1999).

O sistema VITEK (BioMérieux) tem sido útil como uma ferramenta para a identificação de diferentes grupos de bactérias, através de provas bioquímicas miniaturizadas em cartões específicos que contêm 64 testes bioquímicos fluorescentes, que incluem a assimilação de carboidratos, ácidos orgânicos e detecção de oxidases e arilamidases (SONG; LEFF, 2005). O sistema VITEK também realiza provas de sensibilidade antimicrobiana de modo semelhante à identificação, através de cartões que contêm diferentes antibióticos em concentrações padronizadas, correspondentes aos limites de susceptibilidade estabelecidos pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (DOERN et al., 1997).

Considerando a importância de identificar e determinar o perfil de suscetibilidade de micro-organismos do ambiente aos antibióticos, o presente estudo teve como objetivo identificar e determinar a resistência ou sensibilidade

de bactérias lipolíticas oriundas de efluentes residenciais e industriais da região de Pelotas/RS a fim de utilizar os micro-organismos em processos de biorremediação.

## 2. METODOLOGIA

Os 24 isolados armazenados no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Biologia – UFPel, foram obtidos a partir de amostras coletadas em cinco indústrias de alimentos, quatro caixas de gordura residenciais e quatro caixas de gordura de restaurantes da região de Pelotas/RS. Para verificar a morfologia celular das bactérias foi utilizada a técnica de coloração de Gram com visualização em microscopia ótica em aumento de 1000X, para determinação da forma, arranjo e classificação em Gram positivo ou Gram negativo.

Para análise no sistema VITEK®2, as bactérias isoladas foram inoculadas em meio BHI e incubadas durante 24h a 35°C. Após, foi preparada uma suspensão homogênea com uma densidade de micro-organismo equivalente a densidade ótica entre 0,55 e 0,63, utilizando um calibrador DensiCHEK™ VITEK® 2. Posteriormente as amostras foram colocadas no VITEK® 2, a fim de realizar 48 provas bioquímicas através dos cartões de identificação bacteriana GN, específicos para bactérias Gram negativas.

Para determinar o perfil de suscetibilidade utilizando o sistema automatizado VITEK® 2, foi adicionada uma alíquota de 145µL de uma suspensão de células equivalente a densidade ótica entre 0,55 e 0,63 em 3mL de solução salina 0,85%. As amostras foram colocadas no VITEK® 2 em cartões que indicariam a resistência ou sensibilidade por parte da bactéria a várias concentrações de antibióticos presentes nos cartões de antibiograma. Foram determinados os perfis de susceptibilidade a 18 antibióticos presentes nos cartões de antibiograma AST (Antimicrobial Susceptibility Test) específicos para bactérias Gram negativas, sendo eles: bsle, ampicilina, ampicilina/sulbactam, piperacilina/ tazobactam, cefuroxima, cefuroxima axetyl, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, ertapenem, imipenem, meropenem, amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, tigeciclina, colistina. Nas concentrações de 2/1; 4/2; 8/4; 16/8; 32/16 (µg/mL). Exceto o antibiótico piperacilina/ tazobactam, cujo, as concentrações foram 4/4; 8/4 16/4; 32/4; 64/4; 128/4 (µg/mL).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto a caracterização das bactérias, todas as 24 bactérias, oriundas de efluentes domésticos e industriais, apresentaram coloração compatível com bactérias Gram negativas ao exame de microscopia ótica.

O resultado da identificação pelo sistema automatizado revelou que, as 24 bactérias isoladas, se distribuíam em três espécies: *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* (2 isolados – 8,33%), *Serratia marcescens* (17 isolados – 70,83%) e *Klebsiella oxytoca* (5 isolados – 20,83%) (Tabela 1).

Tabela 1: Resultado da identificação bioquímica automatizada de bactérias isoladas de efluentes residenciais e industriais.

Amostras	VITEK® 2
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>
2	<i>Serratia marcescens</i>
3	<i>Klebsiella oxytoca</i>
4	<i>S. marcescens</i>
5	<i>S. marcescens</i>
6	<i>K. oxytoca</i>
7	<i>S. marcescens</i>
8	<i>S. marcescens</i>
9	<i>S. marcescens</i>
10	<i>S. marcescens</i>
11	<i>S. marcescens</i>
12	<i>S. marcescens</i>
13	<i>K. oxytoca</i>
14	<i>S. marcescens</i>
15	<i>S. marcescens</i>
16	<i>S. marcescens</i>
17	<i>S. marcescens</i>
18	<i>S. marcescens</i>
19	<i>S. marcescens</i>
20	<i>K. oxytoca</i>
21	<i>S. marcescens</i>
22	<i>S. marcescens</i>
23	<i>K. pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>
24	<i>K. oxytoca</i>

Todos os isolados (100%) apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico entre os 18 antibióticos testados pelo sistema automatizado VITEK®2. Todas as bactérias identificadas da mesma espécie apresentaram o mesmo perfil de susceptibilidade.

Todos os isolados identificados como *S. marcescens* (100%) apresentaram resistência a três tipos de antibióticos (cefuroxima, cefuroxima axetil e colistina), sendo dois deles, pertencentes ao grupo das cefalosporinas (cefuroxima e cefuroxima axetil) em CMI  $\geq 16$  e sensíveis a todos os outros antibióticos testados.

No entanto, as bactérias identificadas como *K. pneumoniae* spp. *pneumoniae* apresentaram resistência a dois dos antibióticos (ampicilina em CMI = 16 e colistina em CMI = 4) e sensíveis a todos os outros antibióticos. Todos os isolados identificados como *K. oxytoca* apresentaram resistência a um antibiótico (ampicilina) em CMI = 16 e sensíveis a todos os outros antibióticos.

Neste estudo se observou a prevalência de resistência às cefalosporinas que pertencem à classe de  $\beta$ -lactâmicos, que interagem com as Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBP – Penicillin binding proteins) impedindo a formação da parede celular. As cefalosporinas estão entre os antibióticos mais utilizados em diferentes áreas como a medicina humana e veterinária e estão disponíveis há mais tempo no mercado, o que acaba por selecionar fatores disseminadores de resistência, uma vez que os antibióticos são descartados no ambiente e podem

ser relacionados com a presença de micro-organismos resistentes a esses antibióticos (OLIVEIRA, 2011).

#### 4. CONCLUSÕES

Não foram identificadas bactérias multirresistentes através da determinação do perfil de suscetibilidade a antibióticos entre os 24 isolados de origem ambiental analisados.

Pertencentes às espécies: *Klebsiella pneumoniae* ssp. *Pneumoniae*, *Serratia marcescens* e *Klebsiella oxytoca*, as 24 bactérias isoladas de efluentes residenciais e industriais podem ser utilizadas para posteriores estudos a fim de avaliar outras características importantes de micro-organismos para aplicação em processos de biorremediação.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VEIGA, A. A. **Biodegradação de gordura em efluente através da adição controlada de enzimas e micro-organismos em reatores aeróbios em série.** 2003. 134f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)-Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SANTOS, Q. N. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto – Enfermagem**, v.13, p.64-70, 2004.

MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.1, p.23-27, 2007.

BELLO, M. Y. Biological approach to oil spills remediation in the soil. **African Journal of Biotechnology**, vol.6, n.24, p.2735-2739, 2007.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, vol.13, p.85-103, 2003.

BUSCH, U.; NITSCHKO, H. Methods for the differentiation of microorganisms. **Journal of Chromatography B. Science Applications**, v.722, n.1, p.263-278, 1999.

SONG, B.; LEFF, L. Identification and characterization of bacterial isolates from the Mir space station. **Microbiological Research**, v.160, n.2, p.111-117, 2005.

DOERN, G. V.; BRUEGEMANN, A. B.; PERLA, R.; HALKIAS, D.; JONES, R. N.; SAUBOLLE, M. A. Multicenter laboratory evaluation of the bioMerieux VITEK antimicrobial susceptibility testing system with 11 antimicrobial agents versus members of the family Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.8, p.2115-2119, 1997.

OLIVEIRA, V. D. **Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias gram-negativas isoladas nas águas do arroio Dilúvio.** 2011. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Instituto De Ciências Básicas Da Saúde, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, RS.