

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PRODUTORAS DE BACTERIOCINAS A ANTIBIÓTICOS E DE SEU DETERMINANTE GENÉTICO

VITOR W. M. **VIRGINIO**¹; PATRICIA B. **ZACARCHENCO**²; IZILDINHA **MORENO**³,
CRISTIANE C. P. **ANDRADE**⁴, ADRIANA **TORRES**⁴, ELZA E.T. **GRAEL**⁴, FABIANA K.
H. S. **TRENTO**⁴.

Nº0901021

Resumo

Os critérios de seleção para linhagens probióticas em humanos incluem ausência de propriedades indesejadas como fatores de virulência, atividade bioquímica prejudicial e transmissão de resistência a antibióticos. Por estas razões, o objetivo deste estudo foi avaliar linhagens de bactérias lácticas, isoladas a partir de amostras de carnes e produtos cárneos, comparando-as com fermentos probióticos comerciais quanto a presença de resistência a antibióticos. As linhagens isoladas previamente avaliadas foram: *Enterococcus Spp*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus sp.* e *Lactococcus lactis subsp. hardinae*. Os antibióticos utilizados foram: Vancomicina, Fenoximetilpenicilina, Amoxicilina, Cloranfenicol, Cloridrato de Clindamicina, Eritromicina, Cloridrato de tetraciclina e Metronidazol. Os resultados mostraram a resistência de todas as linhagens avaliadas ao metronidazol na concentração mais elevada. *L. plantarum* CTC368, *Ent.avium* CTC 469 e *Ent.avium* CTC 483 foram resistentes a vancomicina e as demais linhagens, mesmo as probióticas comerciais, foram resistentes apenas a quantidades inferiores a 5µg. Estas três linhagens apresentaram bandas em géis de eletroforese dos extratos celulares contendo plasmídeos nas mesmas regiões. Essas mesmas culturas apresentaram grande resistência a vancomicina, o que pode sugerir que esse plasmídeo encontrado seja responsável por essa resistência

Palavras chaves: probiótico, bactérias lácticas, antibióticos, plasmídeos

Abstract

The selection criteria for probiotic strains for humans should include also absence of undesirable properties such virulence factors, harmful biochemical activities and

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Biologia, PUC, Campinas-SP, vitorwilson@hotmail.com

² Orientador: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP, pblumer@ital.sp.gov.br

³ Co-orientador: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

⁴ Colaborador: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

transmissible antibiotic resistances. For this reason, the objective of this study was to evaluate lactic acid bacteria previously isolated from meats and meat products according their antibiotic resistance. These bacteria were also compared with the commercial probiotic starters and their antibiotic resistance. The previously isolated strains analysed were *Enterococcus avium* CTC 469, *Enterococcus* sp. CTC 483, *Enterococcus* sp. CTC 141, *Lactococcus lactis* subsp. *hordinae* CTC 484, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 and *Lactobacillus plantarum* CTC 368. The antibiotics tested against bacteria (vancomycin, phenoximetilpenicillin, amoxicillin, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, tetracycline and metronidazole) were acquired from retail drugstores. All analyzed bacteria were resistant to metronidazole at the highest concentration. The strains CTC469, CTC368 and CTC483 were resistant to vancomycin and all others, including commercial probiotic strains, were resistant only to concentrations lower then 5µg of this antibiotic. These three strains showed similar bands in the gel eletrophoresis of the cells extracts containing plasmids. They also showed the highest resistance to vancomycin. These results suggest that the bands could be plasmids associated to antibiotic resistance.

Key words: probiotic, lactic acid bacteria, antibiotics, plasmids

Introdução

Para um microorganismo probiótico garantir efetividade, várias condições devem ser atendidas: não apresentar variação genética; ser estável; apresentar resistência ao ambiente ácido do estômago e a sais biliares; ter capacidade de proliferação, afinidade e sobrevivência no intestino; produzir metabólitos; fazer a modulação da atividade metabólica; a imunomodulação, além de ser seguro ou *Generally Regarded as Safe* (GRAS) (HAULY *et al*, 2005).

As bactérias probióticas devem, ainda, ser resistentes a tratamentos com antibióticos no organismo do hospedeiro. A evolução da resistência a antibióticos em populações de microrganismos é aumentada pela transferência horizontal de genes entre espécies e gêneros por meio de plasmídeos, transposons e bacteriófagos (TEUBER *et al*, 1999).

As indústrias de laticínios já inovaram e desenvolveram vários produtos funcionais, porém as pesquisas ainda são incipientes no setor de carnes. Um estudo anterior deste grupo de pesquisa gerou o isolamento e seleção de linhagens produtoras de bacteriocinas com potencial de utilização industrial. Nesta etapa da pesquisa se analisou a resistência a antibióticos de algumas destas linhagens e se iniciou a

verificação do local de codificação desta característica, se no cromossomo ou em plasmídeos.

Material e Métodos

As linhagens avaliadas: *Enterococcus avium* CTC 469, *Enterococcus* sp. CTC 483, *Enterococcus* sp. CTC 141, *Lactococcus lactis* subsp. *hordinae* CTC 484, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 e *Lactobacillus plantarum* CTC 368, foram previamente isoladas a partir de amostras de carnes e produtos cárneos por Bromberg et al (2004). Com exceção da Vancomicina (Sigma®) (0,33mg.mL⁻¹) todos os antibióticos: Fenoximetilpenicilina (240ui.mL⁻¹), Amoxicilina (300ug.mL⁻¹), Cloranfenicol (4mg.mL⁻¹), Cloridrato de Clindamicina (300ug/mL), Eritromicina (0,5mg/mL) Cloridrato de tetraciclina (500ug.mL⁻¹) e Metronidazol (40mg.mL⁻¹), foram adquiridos em farmácias. Os antibióticos foram dissolvidos com água destilada estéril e esterilizados por filtração (Millipore, 0,22µm). As suspensões obtidas foram diluídas sucessivamente (1:2; v/v) em placas de microtitulação, utilizando-se solução-tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,0. Alíquotas de 10µL de cada diluição foram depositadas no Ágar MRS, previamente inoculados com as linhagens (10⁶UFC.mL⁻¹). Esta metodologia foi adaptada de Todorov et al (2008). Após 48 horas de incubação a 37°C, os meios foram verificados quanto à formação de halos de inibição. As linhagens comerciais: *Bifidobacterium bifidum* BB12® (Chr Hansen, Dinamarca) e *Bif.longum* BL-07 (Danisco, EUA) foram incluídas nos experimentos, sendo a incubação em anaerobiose.

Para o estudo de perfil de plasmídeos foi usado o *Illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare). Além das bactérias lácticas avaliadas se utilizou como referência linhagens de bactérias *Escherichia coli*(DH5α) com e sem plasmídeo(PBKS). A separação dos plasmídeos foi realizada por eletroforese em gel de agarose (0,9%) contendo 2,0µL/100mL de uma solução de brometo de etídeo (10mg/mL) em tampão Tris-borato EDTA (16,6g/L), pH 8,0. A migração será realizada a 80 volts durante 3 horas. O DNA foi visualizado por fluorescência e os géis documentados em foto documentador (Image Master VDS – Pharmacia Biotech, EUA).

A concentração dos plasmídeos foi feita por precipitação com NaCl. Para isso foi adicionado solução 5M NaCl para obter uma solução final 0,3M NaCl. A essa solução, foi adicionado 2 volumes de etanol absoluto gelado, deixado 30 minutos em banho água-gelo e centrifugado a 12500 rpm por 30 minutos a 4°C. O *pellet* foi lavado com etanol 70% gelado, centrifugado novamente por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e deixou-se o tubo de microcentrífuga aberto até evaporar todo etanol. Foi

adicionado 30µL de tampão de ressuspensão (TR: 25mM Tris-HCl; 10mM EDTA). Para o crescimento das bactérias participantes da extração foi utilizado 5ug/ml de cloranfenicol para replicação dos plasmídeos, buscando aumentar o número de cópias destes, facilitar sua extração e a visualização nos géis posteriormente elaborados (SAMBROOK et al., 1989).

Resultados e Discussão

Utilizando-se os valores da menor quantidade de antibiótico, presente na gota aplicada sobre a placa, capaz de causar inibição de crescimento construiu-se o gráfico da Figura 1.

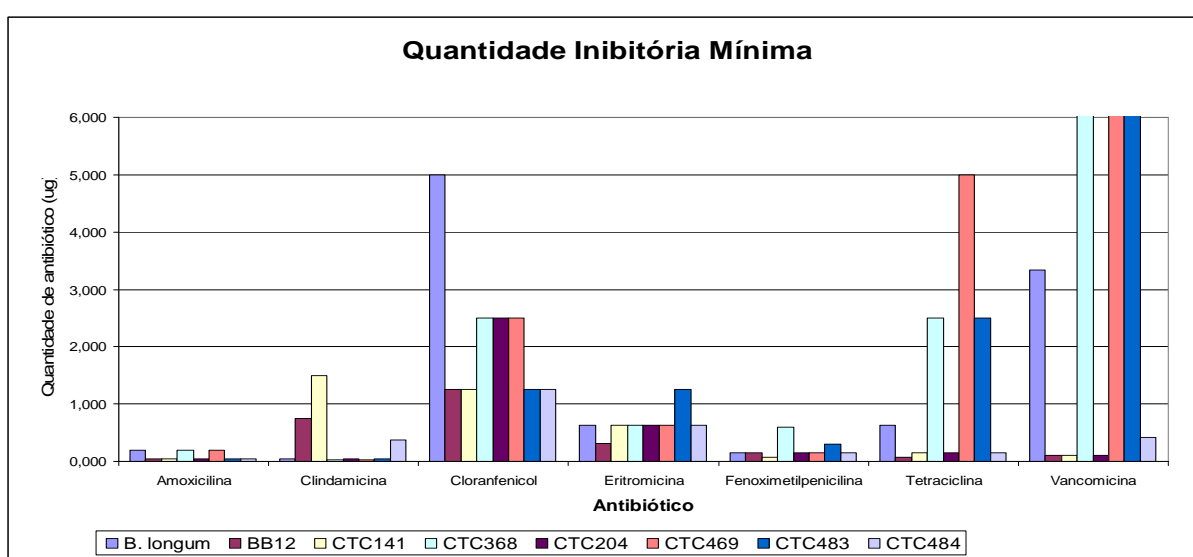


Figura 1. Quantidade mínima de antibiótico necessária para causar inibição microbiana.

Todas as culturas apresentaram-se resistentes ao metronidazol na concentração utilizada mais elevada (40mg/mL), apontando que este antibiótico não é eficaz na inibição da síntese de ácidos nucleicos nessas culturas. Resultado semelhante foi encontrado por Flórez et al (2005), que estudaram microrganismos isolados de queijo pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, sendo todos resistentes a metronidazol (MIC \geq 32 µg/mL, minimum justificar essa resistência é o fato das BAL não possuírem atividade de hidrogenase (FLÓREZ et al. 2005), já que a susceptibilidade antimicrobiana ao metronidazol está correlacionada com a presença de hidrogenase ativa (CHURCH et al. 1996).

As culturas CTC368, CTC469 e CTC483 apresentaram grande resistência a vancomicina (>333ug). Casos de resistência a vancomicina foram descritos por

Maragkoudakis *et al* (2006) que avaliaram 29 culturas de *Lactobacillus* das quais 25 apresentaram CIM superior a 128 µg/mL e as 4 culturas restantes apresentaram-se como sensíveis (CIM ≤ 4µg/mL).

As espécies de bifidobactérias analisadas apresentaram baixa resistência aos antibióticos estudados. Exceto para *Bifidobacterium longum* que obteve menor sensibilidade a cloranfenicol (5,00ug) e vancomicina (3,33ug), todos os demais foram susceptíveis a dosagens de antibiótico iguais ou inferiores a 0,75ug.

Todas as bactérias avaliadas apresentaram grande susceptibilidade a amoxicilina (0,075 a 0,600ug), clindamicina (0,023 a 1,500ug), eritromicina (0,313 a 1,250ug) e fenoximetilpenicilina (0,075 a 0,600ug). Os antibióticos inibidores de síntese protéica direcionados à subunidade ribossomal 50S (cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina), apresentam uma ação levemente menos eficaz sobre as bactérias analisadas, cuja maior dosagem de antibiótico capaz de causar inibição foi de 5µg de cloranfenicol para *B. longum* e 5µg de tetraciclina para CTC469.

O resultado da purificação com o *Illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit* foi analisado por eletroforese. Um dos géis obtidos é apresentado na Figura 2. A cepa de *E.coli* DH5α, utilizada como controle negativo, não apresentou nenhuma banda, o que indica a ausência de fragmentos do DNA cromossômico ou outras contaminações. Os plasmídeos pBKS da cepa DH5α e pGEM da cepa JM109, apresentaram as bandas esperadas. Isto mostra a correta aplicação da técnica de extração.

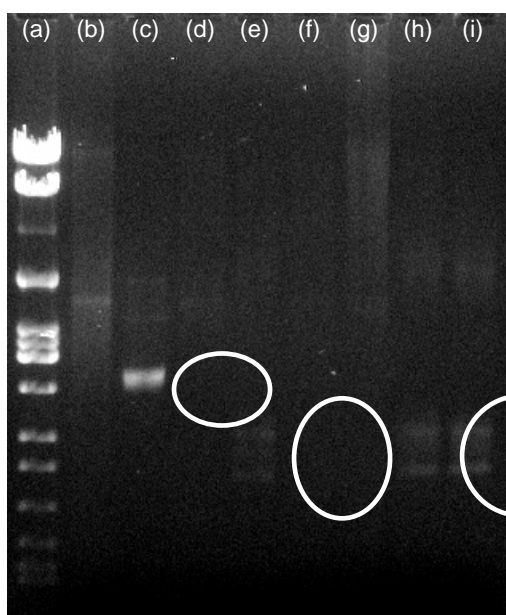


Figura 2 Fotografia do gel de eletroforese dos extratos de possíveis plasmídeos.λ BEH (a); DH5α (b); DH5α + pBKS (c); CTC204 (d); CTC483 (e); CTC484 (f); CTC141 (g); CTC368 (h); CTC469 (i)

As culturas CTC204 e CTC484 não apresentaram nenhuma banda. Como nos géis anteriores, as culturas CTC368 e CTC469, além da CTC483, apresentaram as mesmas bandas. Essas mesmas culturas apresentaram grande resistência a vancomicina (33,33mg/mL), o que pode sugerir que esse plasmídeo encontrado seja responsável por essa resistência.

Conclusões

Todas as bactérias avaliadas foram resistentes ao metronidazol, mas foram susceptíveis a amoxicilina, clindamicina, eritromicina e fenoximetilpenicilina. *L. plantarum* CTC 368, *Ent.avium* CTC 469 e *Ent.avium* CTC 483 foram resistentes a vancomicina e as demais culturas, mesmo as probióticas comerciais, foram resistentes apenas a quantidades inferiores a 5µg dos antibióticos avaliados.

As culturas CTC368, CTC469 e CTC483, apresentaram bandas similares nos géis de eletroforese realizados com os extratos obtidos destes microrganismos. Essas mesmas culturas apresentaram grande resistência a vancomicina (33,33mg/mL), o que pode sugerir que essas bandas sejam plasmídeos responsáveis por essa resistência.

Agradecimentos

Ao CNPq pela Bolsa PIBIC concedida e a FAPESP pelo auxílio financeiro ao projeto.

Referências Bibliográficas

- CHURCH, D.L., BRYANT, R.D., SIM, V., AND LAISHLEY, E.J. 1996. Metronidazole susceptibility and the presence of hydrogenase in pathogenic bacteria. **Anaerobe**, 2: 147–153.
- FLÓREZ, A.B.; DELGADO, S.; MAYO, B. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 51, p. 51-58, 2005.
- HAULY, M.C.O.; FUCHS, R.H.B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S.H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. *Revista de Nutrição*, v. 8, n. 5, p.613-622, 2005
- MARAGKOUidakis, et al. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**. v. 16, p. 189 – 199, 2006
- SAMBROOK, J.; MANIATIS, T. & FRITSCH, F. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- TEUBER, M.; MEILE, L.; SCHWARZ, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.76, p.115-137, 1999.
- TODOROV, et al. Boza a natural source of probiotic lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 465-477, 2008.