

Antibióticos veterinários como indutores de resistência em *Pseudomonas aeruginosa*

Jessica Vieira Dantas (IFPB, Campus Sousa), Andrwey Augusto Galvão Viana (UFPB, Campus João Pessoa), Amélia Lizziane Leite Duarte, (IFPB, Campus Sousa), Ian Porto Gurgel do Amaral (UFPB, Campus João Pessoa), Ulrich Vasconcelos (UFPB, Campus João Pessoa)

E-mails: jessica.dantas@ifpb.edu.br, andrwey-viana@hotmail.com, amelia.leite@ifpb.edu.br, ianamaral@cbiotec.ufpb.br, u.vasconcelos@cbiotec.ufpb.br

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.12.00.00-9 Microbiologia

Palavras-chave: Biofilme; Florfenicol; Resistência antimicrobiana; Adesão; Água residuária.

1. Introdução

A resistência aos antimicrobianos é reconhecida como uma das principais ameaças à saúde pública global, afetando não apenas a medicina humana, mas também a saúde animal e ambiental, em consonância com os princípios da abordagem One Health (Wang et al., 2023). Nesse contexto, *Pseudomonas aeruginosa* destaca-se como um patógeno oportunista de importância clínica e veterinária, notoriamente resistente a diversas classes de antimicrobianos devido à presença de múltiplos mecanismos de resistência, incluindo efluxo ativo, baixa permeabilidade de membrana e produção de enzimas inativadoras (Poole, 2011). Além de sua resistência intrínseca, *P. aeruginosa* apresenta elevada capacidade de formar biofilmes – comunidades microbianas organizadas e envoltas por uma matriz extracelular – que favorecem a persistência ambiental e aumentam significativamente a tolerância aos antimicrobianos (Filloux; Vallet, 2003; Vu et al., 2009). Essa característica é particularmente preocupante em ambientes aquáticos, nos quais o biofilme pode atuar como reservatório e fonte de dispersão de resistência (Li; Wu, 2015; Ambreetha; Singh, 2023).

O uso intensivo e, muitas vezes, inadequado de antibióticos na produção animal tem sido apontado como um dos principais fatores contribuintes para a seleção de microrganismos resistentes, com possibilidade de transferência de genes de resistência entre bactérias comensais e patogênicas (Rousham et al., 2018; Kim; Ahn, 2022). Entre os antibióticos de uso veterinário, o florfenicol, um análogo do cloranfenicol, atua inibindo a síntese proteica bacteriana por ligação à subunidade ribossomal 50S (Hayes et al., 2003) e é amplamente empregado em diversas espécies, especialmente na aquicultura e produção de ruminantes (Trif et al., 2023). Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto do florfenicol, em formulações veterinárias, sobre a formação de biofilme por isolados ambientais de *Pseudomonas aeruginosa*, em meio com elevada carga orgânica

2. Materiais e métodos

Foi utilizado o medicamento comercial VETFLOR® (JA Saúde Animal, Patrocínio Paulista-SP), adquirido em farmácia veterinária. Foram analisados três isolados obtidos pelo método 9213F da APHA; AWWA; WEF (2012). As amostras de água foram coletadas da torneira do ambulatório de um hospital veterinário (isolado JVD05, SisGen A8A9D5A) e do açude São Gonçalo, no distrito de Sousa-PB (isolados JVD07, SisGen AD6CFAA, e JVD08, SisGen AC65073).

Os ensaios in vitro para formação de biofilme foram realizados em meio aquoso com alta carga orgânica, simulando uma DQO de 20.000 mg/L, compatível com efluentes de estações de tratamento de esgoto. Para a avaliação da formação de biofilme, foi utilizada a técnica de microdiluição em placas de poliestireno com 96 poços (fundo em U). Cada poço recebeu 100 µL de água residuária sintética, 100 µL da solução de florfenicol (preparada em DMSO a 1%) e 10 µL do inóculo bacteriano, padronizado em solução salina (NaCl 0,85%) com turbidez ajustada ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Foram testadas três concentrações do antimicrobiano: 0,30; 0,15; e 0,08 mg/mL. As placas foram incubadas por 4 horas a 30 °C. A quantificação do biofilme foi realizada pela técnica do cristal violeta (Batista et al., 2017). Após a incubação, o sobrenadante foi removido, os poços foram lavados com água destilada esterilizada e preenchidos com 210 µL de cristal violeta a 1%. Após 20 minutos, o corante foi descartado, o excesso lavado com água destilada e os poços deixados para secar. Em seguida, adicionou-se 210 µL de etanol 99,6% e, após 15 minutos, a densidade óptica foi medida a 570 nm (BIOTEK EL800). A formação de biofilme foi classificada como fraca, moderada ou alta, com base na densidade óptica em relação ao controle. A concentração de células planctônicas foi medida por absorbância a 630 nm. Os testes foram feitos em triplicata, com os resultados expressos como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada no software R, utilizando o teste de Shapiro-Wilk para normalidade e, devido à ausência de distribuição normal, o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre grupos.

3. Resultados e discussão

Os resultados mostraram comportamento semelhante entre os isolados, especialmente entre JVD05 e JVD07. Observou-se que, com o aumento da concentração de florfenicol, houve um incremento na densidade óptica, sugerindo que o antimicrobiano favoreceu a formação de biofilme. A Figura 1 ilustra esses dados por meio de um gráfico de combinação, no qual as áreas mais amarelas indicam maior formação de biofilme. Cores iguais no gráfico

representam condições com diferenças estatisticamente não significativas.

A adesão celular foi considerada elevada em todas as condições avaliadas, com aumentos superiores a 2.000% em relação ao controle. A Tabela 1 resume a magnitude do incremento na formação de biofilme frente às concentrações crescentes de florfenicol.

Tabela 1 – Avaliação da adesão do biofilme de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em meio com DQO de 20.000 mg/L ($p < 0,01$)

FFC (mg/mL)	JVD 05	JVD 07	JVD 08
0,30	27,5	14,7	17,9
0,15	32,9	36,5	36,9
0,08	43,0	41,8	29,2

FFC- florfenicol. Os números indicam quantas vezes a mais, o biofilme estava aderido se comparado ao controle (sem florfenicol).

Fonte: Dantas *et al.* (2024).

Observou-se um comportamento estatisticamente mais homogêneo entre os isolados, em comparação ao ensaio de biofilme. O padrão de crescimento foi mantido, com similaridade entre JVD05 e JVD07, distintos de JVD08. A Figura 2 apresenta os dados em gráfico de combinação, onde as cores roxa e amarela indicam ausência de diferença estatística. A maior densidade de células planctônicas foi registrada na concentração mais elevada de florfenicol. Embora JVD07 e JVD08 tenham apresentado leve redução celular nas concentrações de 0,08 e 0,15 mg/mL, os valores não diferiram significativamente do controle. O isolado JVD08 destacou-se por apresentar aumento superior a 500 vezes em relação ao controle, com diferença estatística em relação aos demais.

O florfenicol não demonstrou atividade antibiofilme nem efeito biocida sobre células planctônicas, que apresentaram aumentos superiores a 1.000%. A comparação dos dados sugere que a formação de biofilme não foi induzida por estresse antibiótico, assim como não houve migração celular associada ao mesmo fator.

Tabela 2 – Aumento na quantidade de células planctônicas de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* expostos a florfenicol em meio com DQO de 20.000 mg/L ($p < 0,01$).

FFC (mg/mL)	Aumento (%)		
	JVD 05	JVD 07	JVD 08
0,30	11,8	- 22,51	- 36,4
0,15	21,8	- 17,2	- 47,0
0,08	1.053,1	1.016,0	560,4

FFC – florfenicol. ¹Valores negativos representam redução das células planctônicas, mas não foram estatisticamente significativas.

Fonte: Dantas *et al.* (2024).

O presente estudo objetivou analisar as respostas de células séssies e planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa*, de origens clínica e ambiental, expostas a diferentes concentrações de florfenicol. Observou-se que o aumento da concentração de florfenicol resultou em maior crescimento de *P. aeruginosa*, tanto na forma planctônica quanto em biofilme. Apesar da ação bacteriostática do antibiótico, alguns isolados já apresentam resistência primária (Cruz *et al.*, 2012). Há ainda relatos de sua utilização como fonte de carbono por certas bactérias (Dantas *et al.*, 2008), embora isso não tenha sido confirmado neste estudo. Uma hipótese plausível para os resultados observados é que os isolados analisados já possuíam genes de resistência a múltiplos antibióticos, possivelmente devido à exposição prévia a ambientes com diversos estressores, o que resulta na ativação de mecanismos multifuncionais de resistência, como sistemas de efluxo capazes de eliminar diferentes compostos antimicrobianos (Mutuku *et al.*, 2022). A possibilidade de contato prévio com florfenicol não pode ser descartada, embora a detecção direta do antibiótico no ambiente não tenha sido abordada neste trabalho.

A formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* pode ser influenciada pela concentração de nutrientes no ambiente, especialmente em sistemas com elevada carga orgânica. Ambientes com alta DQO favorecem o desenvolvimento do biofilme devido à abundância de matéria orgânica disponível (Lecca; Lizama, 2014), embora concentrações excessivas de certos nutrientes, como o nitrogênio, possam exercer efeito inibitório sobre esse processo (Leys *et al.*, 2005). Nos ensaios realizados, as respostas das células planctônicas e o comportamento observado nos controles sugerem uma resposta rápida das bactérias à presença do florfenicol, provavelmente mediada por mecanismos regulados por densidade celular, favorecendo a formação do biofilme.

Diversos mecanismos moleculares têm sido associados à resistência bacteriana aos antimicrobianos, podendo atuar de forma independente ou sinérgica, incluindo o prolongamento do tempo de duplicação celular (Balaban *et al.*, 2004; Lewis, 2007). Embora essa adaptação possa proteger as bactérias, a exposição aos antibióticos também pode causar desequilíbrios metabólicos e danos celulares. Ainda assim, a produção de metabólitos tóxicos resultante dessa condição pode contribuir para a resistência generalizada observada em *P. aeruginosa* (Belenky *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2019).

5. Considerações finais

Nas condições experimentais deste estudo, isolados de *P. aeruginosa* expostos a diferentes concentrações de florfenicol apresentaram rápida formação de biofilme, enquanto as populações planctônicas mantiveram-se estáveis e relativamente elevadas. Observou-se que, na maior concentração do antibiótico, ambos os modos de crescimento — sésil e planctônico — atingiram seus valores máximos, independentemente da origem clínica ou ambiental dos isolados. Esses resultados evidenciam a necessidade de discutir o papel dos antimicrobianos de uso veterinário na seleção e manutenção de fenótipos resistentes em bactérias potencialmente patogênicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (nível Mestrado) da Universidade Federal da Paraíba e ao Instituto Federal da Paraíba (IFPB) pelo apoio e colaboração no desenvolvimento deste projeto.

Referências

- WANG, W.; WENG, Y.; LUO, T.; WANG, Q.; YANG, G.; JIN, Y. Antimicrobial and the Resistances in the Environment: Ecological and Health Risks, Influencing Factors, and Mitigation Strategies. *Toxics* 2023, *11*, 185. <https://doi.org/10.3390/toxics11020185>
- VU, B.; CHEN, M.; CRAWFORD, R.J.; IVANOVA, E.P. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules* 2009, *14*, 2535-2554. <https://doi.org/10.3390/molecules14072535>
- FILLOUX, A.; VALLET, I. Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *M/S: médecine sciences*, v. 19, n. 1, p. 77-83, 2003.
- AMBREETHA, S.; SINGH, V. Genetic and environmental determinants of surface adaptations in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, v. 169, n. 6, p. 001335, 2023.
- KIM, JUNHWAN; AHN, JUHEE. Emergence and spread of antibiotic-resistant foodborne pathogens from farm to table. *Food Science and Biotechnology*, v. 31, n. 12, p. 1481-1499, 2022.
- ROUSHAM, EMILY K.; UNICOMB, LEANNE; ISLAM, MOHAMMAD AMINUL. Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: integrating behavioural, epidemiological and One Health approaches. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 285, n. 1876, 2018.
- TRIF, E.; CERBU, C.; OLAH, D.; ZĂBLĂU, S.D.; SPÎNU, M.; POTĂRNICHE, A.V.; PALL, E.; BRUDAȘCĂ, F. Old Antibiotics Can Learn New Ways: A Systematic Review of Florfenicol Use in Veterinary Medicine and Future Perspectives Using Nanotechnology. *Animals* 2023, *13*, 1695. <https://doi.org/10.3390/ani13101695>
- JOHN M HAYES, JONATHAN EICHMAN, TERRY KATZ, ROSALIA GILEWICZ, Stability of Florfenicol in Drinking Water, *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, Volume 86, Issue 1, 1 January 2003, Pages 22–29, <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.1.22>.
- CRUZ, R.A.; PAES, A.C.; SIQUEIRA, A.K. Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos. *Vet Zoot.* v. 19, n. 4, p. 601-610, 2012.
- DANTAS, G.; SOMMER, M.O.A.; OLUWASEGUN, R.D.; CHURCH, G. M. Bacteria subsisting on antibiotics. *Science*. v. 320, n. 5872, p. 100-103, 2008. <https://doi.org/10.1126/Science.1155157>.
- MUTUKU, C.; GAZDAG, Z.; MELEGH, S. Occurrence of antibiotics and bacterial resistance genes in wastewater: resistance mechanisms and antimicrobial resistance control approaches. *World J Microbiol Biotechnol.* v. 38, n 9, p. 152, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03334-0>
- LECCA, E.R.; LIZAMA, E.C.R. Caracterización de las aguas residuales y la demanda bioquímica de oxígeno. *Diseño Tecnol.* v. 17, n. 1, p. 71-80, 2014. <https://doi.org/10.15381/ldata.v17i1.12035>
- LEYS, N.M.; BASTIENS, L.; VERSTRAETE, W.; et al. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ration on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Appl Environ Biotechnol.* v. 66, n. 6, p. 726-736, 2005.
- BELENKY, P.; YE, J.D.; PORTER, C.B.; et al. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage. *Cell Rep.* v. 13, n. 5, p. 968–980, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.059>
- LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Rev Microbiol.* v. 5, n. 1, p. 48-56, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1557>
- ZHU, K.; CHEN, S.; SYSOEVA, T.A.; et al. Universal antibiotic tolerance arising from antibiotic-triggered accumulation of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Biol.* v. 17, n. 12, p. e3000573, 2019, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000573>