

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA A TETRACICILINAS EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE SISTEMA DE BIODIGESTÃO ANAERÓBICA

Mateus Rodrigues Alves¹, Max Sullivan Fontes², Cleveland Soriano Neto²,
Mariana Drummond Costa Ignachiti², Juliana Alves Resende¹.

¹Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCA), Alegre – ES, Brasil. mateusrodriguesalves002@gmail.com, juliana.resende@ufes.br.

²Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde (CCENS), Alegre – ES, Brasil. max.s.fontes@gmail.com, csorianoneto@gmail.com, marianadci@gmail.com.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar aspectos moleculares associados à resistência a tetraciclina em *Escherichia coli* isoladas de um sistema de biodigestão anaeróbica alimentados com dejetos bovinos, no intuito de avaliar o potencial risco clínico-microbiológico associado à utilização dos resíduos finais como biofertilizantes. Neste sentido, procedeu-se a pesquisa do gene de resistência *tetA* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando oligoiniciador específico e condições de amplificação descritas na literatura. No total, 90 linhagens do efluente e 90 do biofertilizante foram avaliadas e destas, 10% apresentaram o marcador de resistência, não havendo diferença significativa entre os pontos de coleta efluente e biofertilizante. Apesar da baixa prevalência do gene, a detecção de isolados resistentes suscita a necessidade de promover discussões sobre o uso de drogas antimicrobianas na pecuária leiteira, bem como sobre a segurança do uso de biofertilizantes.

Palavras-chave: *tetA*. biodigestor anaeróbio. bovinocultura. PCR.

Área do Conhecimento: Biologia Molecular.

Introdução

A bovinocultura leiteira é de grande importância para o setor econômico do Brasil, sendo uma das atividades mais lucrativas do setor pecuário e significativa para o crescimento econômico. Essa atividade está amplamente presente em todo território brasileiro, abrangendo a criação de gado bovino e a comercialização dos seus produtos (BELONI *et al.*, 2020). Com o aumento da população humana e da demanda por proteína animal, o confinamento ou semiconfinamento de animais de produção aumenta, assim como também aumenta os resíduos gerados pela pecuária leiteira. Os dejetos da pecuária, quando descartados de maneira incorreta, podem aumentar a proliferação de microrganismos patogênicos à saúde animal e humana. Para evitar que os resíduos do setor da pecuária leiteira sejam lançados diretamente no solo e em corpos hídricos, uma opção é a implementação e o uso de biodigestores anaeróbios (TANNUS, 2023).

O uso de biodigestores anaeróbios na pecuária leiteira é uma alternativa empregada em fazendas para agregar valor aos resíduos dos animais. O biodigestor é composto por duas partes: uma câmara hermeticamente fechada que permite a decomposição da biomassa e uma campânula que permite o armazenamento do biogás produzido durante a biodigestão (AMARAL; STEINMETZ; KUNTZ, 2019). O destaque da digestão anaeróbia é a eficiência na degradação dos resíduos orgânicos sólidos que, após a digestão, viabiliza o uso do biogás, para geração de energia, e do biofertilizante que pode ser empregado na agricultura (SILVA *et al.*, 2020).

Na pecuária é comum o uso de antimicrobianos para tratar animais com manifestações clínicas específicas, como a mastite bovina, ou uso preventivo em doses subterapêuticas na prevenção de doenças infecciosas (TORRES, 2019). Destaca-se que uma proporção significativa da dose de antimicrobiano administrada, variando de 40% a 90% (dependendo da classe), é excretada nas fezes e na urina na forma ativa (forma original), podendo eventualmente atingir o meio ambiente e impactar em outros ecossistemas (POLIANCIUC *et al.*, 2020). Portanto, a utilização de antimicrobianos na

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

bovinocultura leiteira pode influenciar diretamente na ocorrência de genes de resistência a antimicrobianos (GRA) e promover a resistência aos antimicrobianos.

A resistência aos antimicrobianos (RAM) é um problema mundial. A seleção de linhagens bacterianas resistentes aos antimicrobianos pode ser acelerada pelo uso excessivo e inadequado deste tipo de medicamento (XU *et al.*, 2022). Estudos demonstram que o uso de antimicrobianos em concentrações subclínicas pode estimular a transferência horizontal de genes relacionados à resistência. Assim, a administração de baixas concentrações de antimicrobianos nos animais pode selecionar bactérias portadoras de GRA, levando à multiplicação e disseminação desses genes entre as linhagens bacterianas (ALMEIDA, 2020; PÉREZ *et al.*, 2020).

A tetraciclina é um antimicrobiano popular na medicina humana e veterinária devido ao seu amplo espectro de atividade e baixo custo (BALSALOBRE *et al.*, 2014; BENEDITO *et al.*, 2015). Esta droga exerce um efeito bacteriostático, interferindo no processo de síntese proteica por atuar na subunidade ribossomal 30S e 70S (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Mais de 38 genes que codificam resistência a esta classe já foram identificados, eles têm sido tipicamente associados a elementos genéticos móveis, como plasmídeos e integrons. Genes de resistência à tetraciclina já foram detectados em diferentes ambientes, por exemplo, em dejetos de animais e solo (SCHMITT *et al.*, 2006).

A prevalência de genes de resistência nos sistemas de biodigestão é uma importante questão de saúde pública, uma vez que esses genes podem persistir no ambiente por longos períodos e serem transferidos de forma horizontal (MATOS *et al.*, 2017). Do exposto, conhecer a persistência de bactérias resistentes em sistemas de biodigestores anaeróbios é fundamental. Tais informações são essenciais à tomada de decisão quanto à gestão dos dejetos da pecuária, com vista à redução do impacto ambiental negativo do descarte inadequado destes dejetos. Assim, o objetivo desta pesquisa é descrever qualitativamente a prevalência de um gene de resistência à tetraciclina (*tetA*) em isolados de *E. coli* provenientes de um sistema de biodigestão anaeróbio em escala real alimentados com dejetos bovinos.

Metodologia

As linhagens de *Escherichia coli* avaliadas neste estudo foram isoladas de um sistema de biodigestão anaeróbia de escala real e operado em contínuo. O digestor é mantido em temperatura ambiente, com capacidade útil de volume de 540 m³ e o tempo de retenção hidráulico (TRH) de 32 dias ($\pm 6,4$). O substrato utilizado para abastecimento do biodigestor (efluente) é proveniente de dejetos de bovinos leiteiros do sistema de limpeza dos pisos de um sistema de semi-confinamento. Foram coletadas amostras do líquido provenientes da entrada do biodigestor (efluente) e após o processo de biodigestão provenientes do tanque reservatório de biofertilizante.

Para o isolamento e identificação das linhagens sugestivas de *E. coli*, as amostras do efluente e biofertilizante foram inoculadas sem diluição em meios 3M Petrifilm 6404 e a identificação presumida foi realizada por cultivo em ágar *Eosin Methylene Blue* (EMB) e posterior cultivo em ágar *Triple Sugar Iron* (TSI). Após identificação, as linhagens foram armazenadas em meio de congelamento, em congelador à -80°C, e enviadas para o Laboratório de Microbiologia Farmacêutica do Departamento de Farmácia e Nutrição, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES, onde a pesquisa de genes de resistência antimicrobiana foi realizada.

Neste estudo foram avaliadas 180 linhagens sugestivas de *E. coli* do efluente (n=90) e do biofertilizante (n=90).

Para a obtenção de DNA genômico, as linhagens bacterianas congeladas foram reativadas em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) por 24 horas, a 35°C, posteriormente foram cultivadas em caldo caseína soja, por 24 horas, a 35°C. A seguir, 1 mL da cultura foi utilizada para extração de DNA genômico total, usando-se o Kit de extração comercial (QIAamp DNA Mini Kit), de acordo com as instruções do fabricante. As linhagens foram quantificadas e diluídas para a concentração de 10 µg/µL em água livre de RNAase, em volume final de 50 µL. O DNA foi estocado em freezer a -20 °C para, posteriormente, ser utilizado como DNA molde em reações em cadeia da polimerase (PCR).

Para a PCR foram adicionados 2 µL do DNA diluído juntamente com 1 µL de primer F *tetA* (5'- GCT ACA TCC TGGC TTG CCT TC), 1 µL Primer R *tetA* (5'- CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG), 2 µL de Master Mix e completado com 8 µL de água ultrapura, totalizando um volume final de 14 µL. O protocolo de amplificação utilizado conta com: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, 30 ciclos de 94 °C por

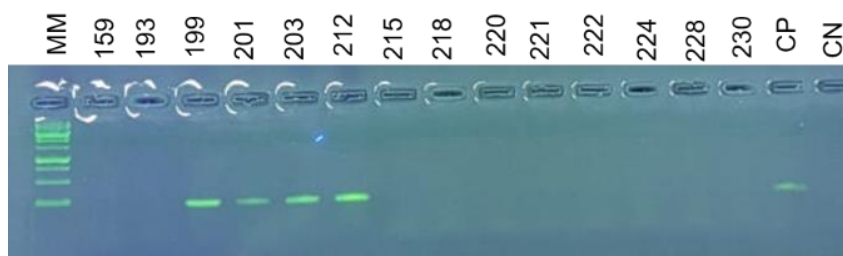
A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

30 segundos, 55 °C por 45 segundos, 72 °C de por 1 minuto. A extensão final foi na temperatura de 72 °C por 5 minutos. As reações foram realizadas em termociclador automatizado (Dlab, TC1000-G). Os amplicons foram visualizados em fotodocumentador (Gel DocTM XR+, Bio-Rad) após eletroforese em gel de agarose 1,5% (80v, 500mA, 150W a 45min), e foram corados com corante não mutagênico *Safer Dye* (Kasvi). Amplicons com tamanho de 210pb foram considerados positivos para a presença do gene *tetA*. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA ladder 1000 Kb (Kasvi). Para o controle negativo foi realizado reações sem DNA molde. Como controle positivo foi utilizado um isolado bacteriano de *E. coli* já caracterizado como positivo para este gene a partir do trabalho de Gomes Junior (2021). As amostras foram analisadas estatisticamente utilizando o software Genes.

Resultados

A partir da análise de eletroforese das reações de PCR foi possível identificar a presença do gene *tetA* nas amostras. A Figura 1 apresenta algumas das linhagens analisadas derivadas do ponto de coleta biofertilizante. É possível observar a presença do gene *tetA* nos isolados 199, 201, 203 e 212 do biofertilizante (Figura 1).

Figura 1 - Fotografia de gel de agarose contendo os amplicons de *tetA* (210 pb) presentes em *E. coli* isolados de biofertilizante.



Fonte: Os autores

Legenda: MM= Marcador Molecular (DNA ladder 1000 Kb); CP= Controle Positivo e CN= Controle Negativo.

Dentre as 180 linhagens sugestivas de *E. coli* avaliadas, 18 (10%) apresentaram o marcador de resistência testado, dessas 7 pertencem ao efluente e 11 ao biofertilizante (Tabela 1). Um aumento de 4,42% de *tetA* em relação as amostras de entrada (efluente) e de saída (biofertilizante) foi observado, no entanto sem diferença estatística.

Tabela 1 - Frequência de detecção do gene de resistência a tetraciclina (*tetA*) em linhagens de *E. coli* isoladas de efluente e biofertilizante de biodigestor anaeróbico.

Gene	Detecção dos marcadores de resistência (%)		
	Efluente (n= 90)	Biofertilizante (n= 90)	Total (n= 180)
<i>tetA</i>	7,78% (n= 7)	12,2% (n= 11)	10% (n= 18)

Fonte: Os autores

Discussão

As tetraciclinas são antimicrobianos de amplo uso na pecuária leiteira e saúde humana (BURCH *et al.* 2021; ANDERSON, *et al.* 2023). O uso excessivo de antimicrobianos em animais de produção resulta no desenvolvimento de resistência a antimicrobianos em patógenos (ISKANDAR *et al.*, 2020). Segundo Kumar, Patyal e Panda (2018) existem evidências de que a resistência de alguns patógenos entéricos humanos surgiu através da transferência de bactérias resistentes ou GRA de animais para humanos através da cadeia alimentar.

Linhagens de *E. coli* foram escolhidas devido sua importância à saúde única, pois além de ser residente permanente do trato intestinal de animais de sangue quente, pode estar presente tanto no meio ambiente, quanto no solo e na água, além de ter a capacidade de adquirir material genético por

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

transferência horizontal de genes; característica que pode resultar em uma rápida disseminação de clones multirresistentes na comunidade microbiana (FURLAN *et al.*, 2020; NASCIMENTO *et al.*, 2023).

Bactérias resistentes às tetraciclinas são abundantemente distribuídas no meio ambiente, devido a popularidade deste antimicrobiano na medicina humana e veterinária (BALSALOBRE *et al.*, 2014). O primeiro relato de resistência às tetraciclinas foi datado na década de 1950, tornando-se evidente somente na década de 1970. Devido ao seu amplo espectro de ação, a resistência a esta droga está largamente disseminada entre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Dentre as espécies do grupo Gram-negativo, para a *E. coli*, a resistência à tetraciclina está ligada à aquisição de um operon que consiste em um gene de efluxo *tetA* (SAWANT *et al.*, 2007).

Diferentes mecanismos podem estar associados ao perfil de persistência do gene *tetA* de bactérias Gram-negativas, como bombas de efluxo adquiridas, transferência horizontal e vertical de GRA (FURLAN *et al.*, 2020). Além disso, outras variáveis podem agir na abundância de GRA, por exemplo, o tipo de dejetos que alimenta o biodigestor e a forma de operação dos biodigestores como foi destacado por Saavedra; Haro; Cuasapaz (2022).

Corroborando os achados deste estudo, Saavedra; Haro; Cuasapaz (2022), observaram que o gene *tetA* esteve presente em três pontos de coleta distintos do biodigestor (efluente, interior do biodigestor e em biofertilizante), diminuindo numericamente entre os pontos. Foi observado que linhagens que não tinham GRA no primeiro ponto de coleta, ao fim do processo de biodigestão haviam isolados com GRA. Este resultado pode ser devido a conjugação bacteriana durante o processo da biodigestão anaeróbia, onde novas cepas com GRA podem ter sucesso evolutivo e terem se mantido no biodigestato. No presente estudo, sugere-se a preservação do gene *tetA* durante o processo de biodigestão uma vez que não foi observada diferença estatística na detecção do gene entre as amostras de efluente e biofertilizante.

No estudo de Anderson *et al.* (2023), foi mostrado que 71,6% ($n = 490$) dos isolados bacterianos de dejetos bovinos eram resistentes a tetraciclina antes de entrarem no biodigestor, resultado diferente do encontrado neste estudo, onde 7,78% ($n=90$) do efluente revelou a presença do gene *tetA*. Essa diferença pode ser devido ao n amostral maior do que o analisado no presente estudo e também variações locais (como, pressão seletiva) que mantém a prevalência de genes de resistência.

Yoshizawa *et al.* (2020) mostrou que dejetos bovinos submetidos a respiração aeróbia (ambiente campo aberto), antes de serem destinados à fertilização de terras, diminuem a prevalência de GRA. A desvantagem no uso da respiração aeróbia para mitigar a ocorrência de GRA é que o esterco fica em campo aberto, disponível a aves e outros vetores que podem disseminar doenças entre humanos e animais, além de ser potencialmente perigoso a outras espécies e vetores que podem introduzir bactérias com resistência e, dessa forma, ainda manterem-se presentes. Ainda no estudo de Yoshizawa *et al.* (2020), foram apresentados os dados referente a permanência de GRA em esterco bovino submetidos a ciclos de autoclavagem (121 °C/30min) com três repetições, sendo observado que o gene *tetA* manteve-se presente nas amostras após os ciclos. Zou *et al.* (2020) e Burch *et al.* (2021) demonstraram uma redução significativa para o gene *tetA* durante o processo de digestão anaeróbia, mas a remoção de GRA foi menor do que o esperado. Estes achados diferem do resultado do presente estudo, onde a correlação entre os dois pontos de coleta não apresentou diferença significativa na ocorrência de *tetA*. Isso sugere que as bactérias que entram na biodigestão anaeróbia conservam o GRA *tetA* durante o processo de biodigestão anaeróbia, que opera em temperatura ambiente, podendo possivelmente transferir este gene a microrganismos no solo e demais ecossistemas. A investigação referente a presença de outros GRA relevantes à saúde por conferir resistência a antimicrobianos usuais na medicina humana e veterinária ainda será analisada.

Conclusão

A prevalência de GRA é uma preocupação mundial multissetorial, uma vez que humanos, animais e o ambiente são expostos a microrganismos que podem ser resistentes aos antimicrobianos. Os dados obtidos neste estudo mostraram que o processo de biodigestão de dejetos bovinos leiteiros em sistema de confinamento não alterou, de forma significativa, a prevalência de genes *tetA* nos resíduos. No entanto, a presença do gene suscita discussões sobre a segurança sanitária e microbiológica do uso de efluentes.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Referências

- ALMEIDA, T. V. de. **Fatores de risco para mastite bovina e avaliação fenotípica de resistência antimicrobiana**. 2020. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2020.
- AMARAL, C. A.; STEINMETZ, R. L. R.; KUNTZ, A. **Os biodigestores**. In: KUNTZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, C. A. Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato. 1 ed. Gráfica Sul Oestes. Concórdia, 2019. p. 41-68. 209p.
- ANDERSON, R. E. V. *et al.* Characterization of *Escherichia coli* and other Enterobacterales resistant to extended-spectrum cephalosporins isolated from dairy manure in Ontario, Canada. **American Society for Microbiology**. vol. 89, n. 2, p. 1-18, 2023.
- BALSALOBRE, L. C. *et al.* **Resistência a tetraciclinas em isolados clínicos e ambientais de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Aeromonas* spp.: identificação e mapeamento do ambiente genético de genes *tet***. 2014. 159 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutor em Ciências, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- BELONI, M. V. *et al.* **Biodigestão anaeróbia: uma alternativa viável para a redução dos impactos causados pelos dejetos da pecuária leiteira**. In: SILVA, M. A. da. *et al.* Tópicos especiais em ciência animal IX. 1 ed. Alegre: CAUFES, 2020, p. 386-404, 2020.
- BENEDITO, G. S. *et al.* **Retrospective study: incidence of medication without veterinary hospital**. In: 42º Congresso brasileiro de medicina veterinária e 1º congresso sul-brasileiro da anclivepa. Anais... Curitiba - PR, 2015. p. 1238-1242, 2015.
- BURCH, T. R. *et al.* Fate and seasonality of antimicrobial resistance genes during full-scale anaerobic digestion of cattle manure across seven livestock production facilities. **Journal of Environmental Quality**. v. 51 n.3, p. 352-363, 2021.
- FURLAN, J. P. R. *et al.* Fecal cultivable aerobic microbiota of dairy cows and calves acting as reservoir of clinically relevant antimicrobial resistance genes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 1377-1382, 2020.
- GOMES JUNIOR, A. O. **Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de sistemas de biodigestão anaeróbica**. 2021. 50 f. Monografia (Farmácia) (Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde – CCENS), Universidade Federal do Espírito Santo, 2021.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. da S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.
- ISKANDAR, K. *et al.* Drivers of antibiotic resistance transmission in low- and middle income countries from a “One Health” perspective - A Review. **Antibiotics**, v. 9, n. 7, p. 2-23, 2020.
- KUMAR, A.; PATYAL, A.; PANDA, A. K. Sub-therapeutic use of antibiotics in animal feed and their potential impact on environmental and human health: a comprehensive review. **Journal of Animal Feed Science and Technology**, v. 6, p. 15-25, 2018.
- MATOS, C. F. *et al.* Avaliação do potencial de uso de biofertilizante de esterco bovino resultante do sistema de manejo orgânico e convencional da produção de leite. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 5, p. 1957-1969, 2017.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

NASCIMENTO, G. R. S do. *et al.* Resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* sp. causadores de Mastite Bovina—revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 1, p. 4375-4391, 2023.

PÉREZ, V. K. C. *et al.* Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, n.1, p. 792–802, 2020.

POLIANCIUC, S. I. *et al.* Antibiotics in the environment: causes and consequences. **Medicine and pharmacy reports**, v. 93, n. 3, p. 231, 2020.

SAAVEDRA, R. C. M; HARO, D. R. P; CUASAPAZ, E. G. M. Interacción de *E. coli* resistente a los antimicrobianos de los residuos de una granja lechera durante los procesos de biodigestión. **Revista Recursos Naturales Producción y Sostenibilidad**, v. 1, n. 2, p. 1-16, 2022.

SAWANT, A. A. *et al.* Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 156-163, 2007.

SCHMITT, H. *et al.* Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils: microcosm and field studies. **Microbial Ecology**. v. 51, p.67–276. 2006.

SILVA, J. A. R. da, *et al.* Tratamento de dejetos no brasil: comparativo entre as técnicas de compostagem e biodigestores anaeróbios. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**. v. 12, n. 2, p. 797-817, 2020.

TANNUS, M. M. Poluição ambiental causada por fármacos para usos humanos e veterinários. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**, v. 4, n. 15, p. 1-14, 2017.

TORRES, M. C. **Resistência antimicrobiana em populações animais e seu impacto na saúde pública: uma revisão da literatura**. 2019. Monografia (Bacharel em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

XU, C. *et al.* A review of current bacterial resistance to antibiotics in food animals. **Frontiers in Microbiology**. v. 13, n. 822689, p. 1-16, 2022.

ZOU, Y, *et al.* New insight into fates of sulfonamide and tetracycline resistance genes and resistant bacteria during anaerobic digestion of manure at thermophilic and mesophilic temperatures. **Journal of Hazardous Materials**. v. 384, p. 1-9, 2020.

YOSHIZAWA, N., *et al.* Manure Compost Is a Potential Source of Tetracycline-Resistant *Escherichia coli* and Tetracycline Resistance Genes in Japanese Farms. **Antibiotics**. v. 9, n. 2, 2020.