

## PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE À BIOCIDAS DE ISOLADOS BACTERIANOS PROVENIENTES DE BIODIGESTOR ANAERÓBIO

Mariana Fabri Lima<sup>1</sup>, Mateus Rodrigues Alves<sup>2</sup>, Max Sullivan Fontes<sup>1</sup>, Heberth de Paula<sup>1</sup>, Marcelo Henrique Otenio<sup>3</sup>, Mariana Drummond Costa Ignacchiti<sup>1</sup>, Juliana Alves Resende<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Farmácia e Nutrição - CCENS, Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, mariana.fabri@outlook.com, max.s.fontes@gmail.com, hdpaula@gmail.com, marianadci@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCA), Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-00, Alegre – ES, Brasil, mateusrodriguesalves002@gmail.com, juliana.resende@ufes.br.

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 36038-330, Juiz de Fora – MG, Brasil, marcelo.otenio@embrapa.br.

### Resumo

O presente estudo investigou o perfil de susceptibilidade de *Escherichia coli* provenientes de biodigestores anaeróbios a diversos biocidas: cloreto de benzalcônio, peróxido de hidrogênio, clorexidina e ácido láctico. Amostras de efluente (n=89) e biofertilizante (n=84) foram coletadas da fazenda experimental da Embrapa Gado de Leite, isolando 173 linhagens de *E. coli* para análise. As cepas bacterianas foram submetidas ao método de disco-difusão para avaliar a eficácia dos biocidas e os comparativos entre as duas origens amostrais (efluente e biofertilizante). A *E. coli* resistência ao ácido láctico 2%, enquanto aos demais biocidas estudados apresentaram eficácia. O peróxido de hidrogênio 3% revelou diferença significativa entre amostras efluente e biofertilizante, sugerindo que o uso de biodigestores pode alterar o perfil de susceptibilidade microbiana, evidenciando a importância de avaliar o perfil de susceptibilidade microbiana, para controlar a disseminação de microrganismos em ambientes agrícolas, alimentos e solos fertilizados com biofertilizantes.

**Palavras-chave:** Enterobactérias, Biodigestor, Sanitização.

**Área do Conhecimento:** Microbiologia.

### Introdução

A disponibilidade de terras férteis e adequadas para o cultivo, aliada à abundância de recursos hídricos e a uma população numerosa, posiciona o Brasil como um país de destaque e dependente do agronegócio. Este setor desempenha um papel essencial na sustentação da economia brasileira, contribuindo significativamente para o Produto Interno Bruto (PIB) (Pinheiro *et al.*, 2020). Contudo, apesar de sua importância econômica, a agroindústria acarreta impactos ambientais e de saúde pública que nem sempre são positivos.

A bovinocultura, seja leiteira ou de corte, frequentemente utiliza biocidas para desinfecção de materiais e assepsia dos tetos durante o processo de coleta do leite (Pedrini; Margatho, 2003). Além disso, os biocidas podem também ser aplicados no processo de sanitização das estruturas de confinamento animal. Embora muitas vezes subestimado, o uso de biocidas nesses processos pode resultar em mutações e reduzir a suscetibilidade bacteriana (Rozman *et al.*, 2021).

Considerando a composição da microbiota intestinal de animais de sangue quente, a bactéria *Escherichia coli* é um dos microrganismos mais abundantes e potencialmente perigosos devido à sua alta capacidade de mutação e interação com os demais microrganismos naturais do corpo animal (Sapountzis *et al.*, 2020). É de suma importância reconhecer que um dos resíduos da criação de bovinos é o esterco, que, durante o processo de higiene e limpeza das estruturas de confinamento animal, compõe grande parte do efluente residual, que é direcionado para biodigestores anaeróbios, onde serão produzidos biogás e biofertilizante (Menezes *et al.*, 2024; Lin *et al.*, 2022; Amaral; Steinmetz;

Kunz, 2019). O biogás produzido pode ser utilizado como recurso energético renovável, enquanto o biofertilizante é uma fonte abundante de nutrientes essenciais para o solo, tornando-se um fertilizante (Amaral; Steinmetz; Kunz, 2019).

No entanto, por ser oriundo de excreta animal, ressalta-se que o biofertilizante também é rico em enterobactérias, como a *E. coli*, que, ao longo da cadeia, pode ter sofrido alterações genéticas por meio de transformação, conjugação ou até mesmo transdução, adquirindo assim menor susceptibilidade. Portanto, o material utilizado em plantações para melhorar a saúde do solo acaba por expor os alimentos cultivados a microrganismos potencialmente com baixa sensibilidade aos biocidas (Zalewska *et al.*, 2021).

Segundo a ANVISA (2021), biocidas são “substâncias químicas ou suas misturas cuja finalidade é destruir, reduzir ou neutralizar qualquer organismo prejudicial, impedir sua ação ou exercer sobre ele um efeito de controle de outro tipo, por qualquer meio que não seja uma mera ação física ou mecânica”. Com base nesses fatos e na definição de biocida, infere-se a relevância do presente estudo, que visa analisar a susceptibilidade de bactérias da espécie *E. coli* provenientes de biodigestores anaeróbios aos biocidas cloreto de benzalcônio, peróxido de hidrogênio, clorexidina e ácido láctico, avaliando as diferenças significativas entre as amostras de efluente e biofertilizante (antes e após o processo de biodigestão anaeróbia).

## Metodologia

Foram coletadas amostras oriundas de um sistema biodigestor semicontínuo na fazenda experimental da unidade de pesquisa da Embrapa Gado de Leite, integrante da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). A amostragem foi realizada nos pontos de entrada do biodigestor (efluente residual) e no tanque de reservatório de biofertilizante.

Para o isolamento de bactérias sugestivas de *E. coli*, foram utilizadas placas de Petrifilm™ (Petrifilm™ EC 6404, 3M™), conforme as orientações do fabricante. As colônias de coloração azul aparente e formação de bolhas de gás foram inoculadas em ágar Eosin Methylene Blue (EMB) a 35°C por 24 horas. Em seguida, as colônias que apresentaram o reflexo verde metalizado, característico da bactéria em estudo, foram cultivadas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) e submetidas a análises confirmatórias, como coloração de Gram, avaliação da capacidade de fermentar glicose, sacarose e/ou lactose, além da produção de gás e PCR confirmativo para *E. coli*. Assim, foram isoladas, e congeladas 173 linhagens de *E. coli*, sendo 89 oriundas do efluente e 84 do biofertilizante.

Para este estudo foram selecionados biocidas de uso rotineiro para sanitização, listados na Tabela 1, seguidos por suas respectivas concentrações e mecanismos de ação:

Tabela 1- Biocidas, concentrações utilizadas e mecanismos de ação

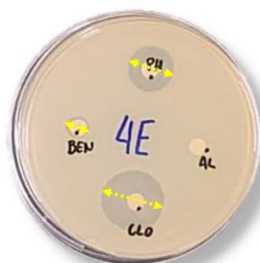
Biocida	Concentração	Mecanismo de Ação
Cloreto de Benzalcônio	0,28%	Baixa tensão superficial, inativa enzimas, proteínas celulares degradadas.
Peróxido de Hidrogênio	3%	Oxidação por radical livre de componentes celulares essenciais.
Clorexidina	1%	Interação iônica, rompe a membrana celular.
Ácido Láctico	2%	Redução do pH, desintegração de proteínas.

Fonte: Anvisa, 2021; Efendi *et al.*, 2023

As linhagens bacterianas congeladas foram recuperadas em caldo BHI a 35 ± 2°C por 24 horas, seguindo o mesmo protocolo para a cepa controle ATCC 25922. Após o crescimento em ágar BHI, as bactérias foram transferidas para tubos com salina estéril a 9%, homogeneizadas e ajustadas para a Escala McFarland 0.5, correspondendo a aproximadamente 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL. Os testes de biocidas foram conduzidos pelo método de disco de difusão, conforme o *Clinical & Laboratory Standards Institute*

(CLSI, 2020). A suspensão bacteriana foi distribuída uniformemente em placas de ágar Mueller Hinton, sobre as quais foram colocados discos de papel filtro contendo 5 µL dos biocidas. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 18-20 horas, e os halos de inibição ao redor dos discos foram medidos com paquímetro (Figura 1).

Figura 1 – Imagem ilustrativa de uma placa com uma linhagem do ponto de amostragem biofertilizante (após o processo de biodigestão) e a presença de halos de inibição frente aos biocidas.



Fonte: os autores

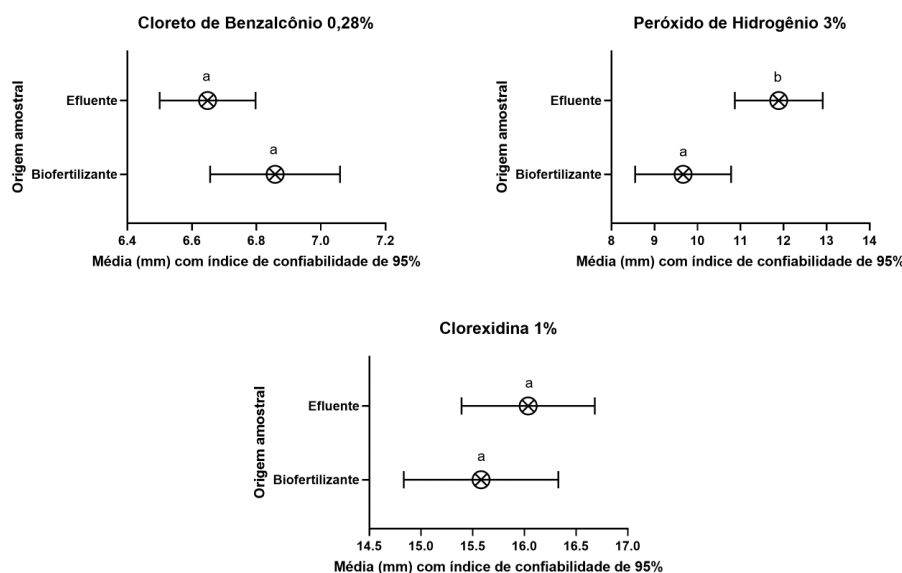
Legenda: Em amarelo destaca-se o diâmetro considerado para medida do halo.

Para o comparativo entre o perfil de susceptibilidade de amostras de efluente e biofertilizante, foi utilizado o teste T independente, através do software *GraphPad Prism* versão 9.0.

## Resultados

Para avaliar se o processo de biodigestão foi capaz de alterar as características fenotípicas das enterobactérias que possivelmente serão liberadas no ambiente, foi analisado o perfil de susceptibilidade aos biocidas. Os valores médios (mm) e desvio padrão dos tamanhos dos halos de inibição podem ser observados na Figura 2. O controle positivo *E. coli* ATCC 25922, apresentou diâmetro de halo de 8 mm contra cloreto de benzalcônio 0,28%, 8 mm contra o peróxido de hidrogênio 3%, 12 mm contra a clorexidina 1% e ausência de halo de inibição frente ao ácido láctico 2%.

Figura 2 – Perfil de susceptibilidade aos biocidas (médias e desvio padrão dos halos de inibição de *Escherichia coli* isoladas de efluente e biofertilizante provenientes do processo de biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros.



Fonte: os autores.

Legenda: Letras divergentes indicam diferença significativa.

Não houve diferença estatística para cloreto de benzalcônio 0,28% ( $p=0,0957$ ), clorexidina 1% ( $p=0,3585$ ) e ácido láctico 2%. Neste último não foi observado halo de inibição, portanto, nenhum isolado se mostrou sensível a este biocida, não sendo possível a realização do teste estatístico. O peróxido de hidrogênio 3% apresentou diferença estatística significativa entre o efluente e biofertilizante com valor de  $p=0,0121$  com 95% de confiabilidade.

Considerando o tamanho do disco de papel de 6 mm no qual foram impregnados os biocidas no presente trabalho, os isolados que apresentaram tamanhos de halo de inibição de 6mm (ausência de formação do halo) foram classificados como resistentes.

Dentre os isolados do efluente ( $n=89$ ), 48,31% ( $n=43$ ) apresentaram resistência para cloreto de benzalcônio, 21,34% ( $n=19$ ) para o peróxido de hidrogênio, e não foi observada resistência a clorexidina. Considerando os isolados do biofertilizante ( $n=84$ ), 47,61% ( $n=40$ ) apresentaram resistência frente a cloreto de benzalcônio, 48,80% ( $n=41$ ) para o peróxido de hidrogênio e 4,76% ( $n=4$ ) para a clorexidina. Todos os isolados testados apresentaram-se com resistência frente ao ácido láctico 2%, com ausência de formação de halo de inibição.

## Discussão

Os biocidas cloreto de benzalcônio, peróxido de hidrogênio e clorexidina desempenham papéis importantes na saúde pública e na indústria de alimentos devido às suas propriedades antimicrobianas. O cloreto de benzalcônio é amplamente utilizado como desinfetante em ambientes hospitalares e na indústria de alimentos para a prevenção de infecções cruzadas e a desinfecção de superfícies. O peróxido de hidrogênio é empregado na desinfecção de equipamentos e na limpeza de tetos de animais, particularmente na indústria leiteira, para garantir a segurança do leite e prevenir mastites. Já a clorexidina é frequentemente utilizada em antisepsias e na prevenção de infecções em procedimentos médicos. A eficácia desses biocidas é essencial para manter padrões elevados de higiene e segurança, protegendo tanto a saúde pública quanto a qualidade dos produtos alimentícios (Kampf, 2019; Vaerewijck *et al.*, 2012).

Os resultados deste estudo evidenciam diferenças significativas na susceptibilidade de bactérias isoladas de efluente e biofertilizante aos biocidas testados, com implicações importantes para a indústria agrícola e de saúde pública. O cloreto de benzalcônio e a clorexidina não mostraram diferenças estatísticas entre as amostras de efluente e biofertilizante, sugerindo que a eficácia desses biocidas permanece estável após o processo de biodigestão anaeróbia. No entanto, o peróxido de hidrogênio 3% apresentou uma diferença significativa, indicando uma alteração na susceptibilidade bacteriana entre as amostras.

Uma explicação potencial para essa diferença pode ser a variação no tamanho da amostra entre efluente e biofertilizante, o que pode influenciar os resultados estatísticos. Contudo, assumindo a confiabilidade dos dados, é possível que a biodigestão anaeróbia tenha levado ao desenvolvimento de uma microbiota com menor sensibilidade ao peróxido de hidrogênio. Jones e Joshi (2021) sugerem que a redução na sensibilidade a biocidas pode ocorrer devido à produção de enzimas neutralizantes ou mutações genéticas nas bactérias.

A redução da susceptibilidade microbiana também representa um perigo à cadeia de produção de produtos agrícolas. O peróxido de hidrogênio, por exemplo, é amplamente utilizado na indústria leiteira para desinfecção de tetos antes da ordenha e sanitização de superfícies. Com a alteração no perfil de susceptibilidade bacteriana e a seleção de cepas menos sensíveis a este biocida, os métodos utilizados podem ser questionados quanto a sua eficácia e segurança ao consumidor final (El-Gohary *et al.*, 2020).

Além disso, a falta de efeito do ácido láctico 2% nas amostras sugere que as cepas bacterianas locais podem ter desenvolvido mecanismos de resistência, potencialmente comprometendo sua função como desinfetante e aumentando o risco de contaminação. Isso é particularmente preocupante em relação à *E. coli*, comum no trato gastrointestinal dos bovinos. A redução da eficácia dos sanitizantes pode dificultar a higienização adequada dos locais de confinamento e dos tetos dos animais, afetando a qualidade do leite e expondo o consumidor a riscos de saúde devido à presença de bactérias difíceis de eliminar (Davies; Wales, 2019).

## Conclusão

Este estudo demonstra que a susceptibilidade bacteriana a biocidas pode ser alterada pelo processo de biodigestão anaeróbia, como evidenciado pela resistência aumentada ao peróxido de hidrogênio em amostras de biofertilizante. Embora o cloreto de benzalcônio e a clorexidina tenham mantido sua eficácia, a adaptação bacteriana ao peróxido de hidrogênio e a resistência ao ácido láctico 2% levantam preocupações sobre a eficácia das práticas de sanitização na indústria agrícola. Esses achados destacam a necessidade de monitoramento e de revisões nas estratégias de uso de biocidas, para mitigar os riscos à saúde pública associados à resistência bacteriana emergente.

## Referências

AMARAL, A. C.; STEINMETZ, R. L. R.; KUNZ, A. O processo de biodigestão. *In*: KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. **Fundamentos da biodigestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. 1 ed. Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) - **Proposta de harmonização do (re)enquadramento de antissépticos de uso em humano na anvisa**, Brasília-DF 2021. Disponível em: <[https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/regulamentacao/participacao-social/consultas-dirigidas/arquivos/documento\\_cd\\_gt\\_antissepticos\\_01mar2021.pdf](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/regulamentacao/participacao-social/consultas-dirigidas/arquivos/documento_cd_gt_antissepticos_01mar2021.pdf)> Acesso em 31 de julho de 2024.

DAVIES, R.; WALES, A. Antimicrobial Resistance on Farms: A Review Including Biosecurity and the Potential Role of Disinfectants in Resistance Selection. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 3, p. 753–774, 17 abr. 2019.

EFENDI, R. *et al.* Antimicrobial properties of lactic acid bacteria from fermented palm sap against *E. coli* and *S. aureus* growth. IOP conference series. **Earth and environmental science**, v. 1241, n. 1, p. 012092–012092, 2023.

EL-GOHARY, F. A. *et al.* Enhanced antibacterial activity of silver nanoparticles combined with hydrogen peroxide against multidrug-resistant pathogens isolated from dairy farms and beef slaughterhouses in Egypt. **Infection and Drug Resistance**, p. 3485-3499, 2020.

JONES, I. A; JOSHI, L. T. Biocide use in the antimicrobial era: a review. **Molecules**, v. 26, n. 8, p. 2276, 2021.

KAMPF, G. Antibiotic Resistance Can Be Enhanced in Gram-Positive Species by Some Biocidal Agents Used for Disinfection. **Antibiotics**, v. 8, n. 1, p. 13, 2019.

LIN, M. *et al.* Challenges of pathogen inactivation in animal manure through anaerobic digestion: A short review. **Bioengineered**, v. 13, n. 1, p. 1149-1161, 2022.

MENEZES, K. V. *et al.* Enterobacteria in anaerobic digestion of dairy cattle wastewater: Assessing virulence and resistance for one health security. **Water Research**, v. 252, n. 121192, p. 1-11, 2024.

PEDRINI, S. C. B.; MARGATHO, L. F. F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 4, p. 391-395, 2003.

PINHEIRO JÚNIOR, J. L.; BISPO, L. G. O Agronegócio no Brasil: Uma análise sobre a relevância do agronegócio para o cenário econômico do país (2011 a 2016). **Revista de Administração de Roraima - RARR**, v. 9, n. 2, p. 265, 2020.

ROZMAN, U. *et al.* Reduced Susceptibility and Increased Resistance of Bacteria Against Disinfectants: A Systematic Review. **Microorganisms**, v. 9, n. 2550, 2021.

SAPOUNTZIS, P. *et al.* An Overview of the Elusive Passenger in the Gastrointestinal Tract of Cattle: The Shiga Toxin Producing Escherichia coli. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 877, 2020.

VAEREWIJCK, M. J. M. *et al.* Assessment of the Efficacy of Benzalkonium Chloride and Sodium Hypochlorite against Acanthamoeba polyphaga and Tetrahymena spp. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 3, p. 541–546, 1 mar. 2012.

ZALEWSKA, M. *et al.* Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Animal Manure – Consequences of Its Application in Agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

### Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES - Edital Universal 03/2021 TO428/2021), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Embrapa Gado de Leite.