

PREVALÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA A BETA-LACTÂMICOS EM *Escherichia coli* ISOLADOS DE BIODIGESTOR ANAERÓBIO

Mateus Rodrigues Alves¹, Mariana Fabri Lima², Max Sullivan Fontes², Mariana Drummond Costa Ignacchiti², Juliana Alves Resende¹.

¹ Universidade Federal do Espírito Santo/Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCA), Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, mateusrodriguesalves002@gmail.com, juliana.resende@ufes.br.

² Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Farmácia e Nutrição, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde (CCENS), Alto Universitário, S/N, Guararema – 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, mariana.fabri@outlook.com, max.s.fontes@gmail.com, marianadci@gmail.com

Resumo

A crescente demanda por produtos de origem animal como o leite e seus derivados fez com que os produtores se adequassem e aumentassem a produção para atender a grande demanda. Concomitante a crescente demanda, aumentam-se os resíduos gerados a partir da produção animal. Neste estudo foram coletadas amostras do efluente e do biofertilizante (antes e após o processo da biodigestão anaeróbia) de um biodigestor semi-contínuo em uma fazenda experimental para isolar linhagens de *Escherichia coli*. As amostras foram analisadas quanto a presença dos genes de resistência a beta-lactâmicos, *bla-TEM* e *ampC*, através de reações de PCR. Dos 173 isolados, 36,41% apresentaram o gene *ampC* e 18,49% o gene *bla-TEM*. Além disso, 6,35% das linhagens apresentaram ambos os genes, destacando o potencial risco de disseminação de resistência antimicrobiana em sistemas de biodigestão anaeróbia. O uso ostensivo de antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos na medicina veterinária e humana sublinha a necessidade de um monitoramento rigoroso em ambientes agrícolas para contenção de resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: GRAs. Dejetos leiteiros. Disseminação. PCR.

Área do Conhecimento: Biologia Molecular.

Introdução

O crescimento populacional global aumenta a demanda por alimentos, impactando a pecuária leiteira, que fornece matérias-primas essenciais para diversos produtos alimentícios (Erdaw, 2023). O Brasil é um dos líderes mundiais na produção animal, com um vasto rebanho destinado ao consumo interno e à exportação. De acordo com dados do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA, 2023), o Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial de rebanhos bovinos. No entanto, o crescimento da bovinocultura apresenta desafios significativos, incluindo a pressão sobre os recursos naturais, como água e terra, e a necessidade de aumentar a eficiência e a sustentabilidade da produção, devido à alta produção de dejetos provenientes dessa atividade (Timsina *et al.*, 2024).

Resíduos da produção animal, como fezes e urina, representam uma grande quantidade de biomassa, cuja reciclagem é essencial tanto por razões econômicas quanto ambientais (Almeida; Bacha, 2021). A utilização de biodigestores anaeróbios nas fazendas leiteiras oferece uma solução para a gestão desses dejetos, convertendo-os em biofertilizante e biogás. O biodigestor promove a decomposição da matéria orgânica sem oxigênio, produzindo recursos valiosos para a fertilização do solo e energia renovável (Amaral; Steinmetz; Kunz, 2019).

No entanto, a aplicação de biofertilizantes derivados de processos de biodigestão anaeróbia levanta questões sobre o potencial de disseminação de microrganismos patogênicos e genes de resistência antimicrobiana (GRAs) como o gene *bla-TEM* e *ampC*. A *Escherichia coli*, uma bactéria comensal do trato intestinal de animais de sangue quente, é frequentemente utilizada como indicador de contaminação fecal e como modelo para estudar a resistência antimicrobiana devido à sua capacidade de adquirir e transmitir genes de resistência a antimicrobianos (GRAs). O aumento da resistência antimicrobiana (RAM) em *E. coli* representa uma ameaça significativa à saúde pública, especialmente

quando essas bactérias são liberadas no ambiente através de efluentes tratados inadequadamente ou não tratados (Furlan *et al.*, 2020).

A RAM é uma preocupação global, reconhecida como uma ameaça emergente pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Ahmed *et al.*, 2024). Estudos anteriores indicam que os sistemas de biodigestão anaeróbia, embora eficazes na redução da carga microbiana total, nem sempre eliminam completamente os microrganismos patogênicos ou os genes de resistência presentes nos dejetos bovinos (Pham *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2023; Burch *et al.*, 2022).

A disseminação dos marcadores de resistência *bla-TEM* e *ampC* em ambientes agrícolas, especialmente em sistemas de manejo de resíduos, pode agravar o problema da RAM. A presença deste gene em *E. coli* é particularmente preocupante devido à capacidade desta bactéria de atuar como reservatório e vetor de resistência, disseminando GRAs através de transferência horizontal em diferentes ambientes, como solo, água e no trato intestinal de humanos e animais. A resistência mediada pelo *bla-TEM* compromete a eficácia de tratamentos fundamentais e aumenta o risco de infecções persistentes e difíceis de tratar, representando uma ameaça significativa à saúde única, que considera a interconexão entre saúde humana, animal e ambiental.

A escolha de *Escherichia coli* como objeto de estudo é fundamentada em sua importância crítica para a saúde pública, uma vez que essa bactéria é amplamente disseminada no ambiente e possui uma notável capacidade de adquirir e disseminar genes de resistência a antimicrobianos (GRAs) por meio da transferência horizontal de genes. Neste contexto, a presente pesquisa buscou avaliar a presença dos genes *blaTEM* e *ampC* em isolados de *E. coli* provenientes de um sistema de biodigestão anaeróbia. Esses genes foram selecionados devido ao seu papel na conferência de resistência a uma ampla gama de antimicrobianos beta-lactâmicos, comprometendo a eficácia de terapias medicamentosas.

Metodologia

Amostras do processo de biodigestão foram coletadas de um biodigestor semi-contínuo instalado na fazenda experimental da Embrapa Gado de Leite, que faz parte da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). O biodigestor opera à temperatura ambiente e tem uma capacidade útil de 540 m³, com um tempo de retenção hidráulica (TRH) de 32 dias ($\pm 6,4$). O substrato utilizado para alimentar o biodigestor (efluente) é derivado do sistema de limpeza das superfícies do piso em um sistema semi-confinado. As amostras líquidas foram coletadas tanto na entrada do biodigestor (efluente) quanto no tanque de armazenamento do biofertilizante (biofertilizante).

Para o isolamento de enterobactérias indicativas de *E. coli*, foram utilizadas placas Petrifilm™ (Petrifilm™ EC 6404, 3M™), seguindo as instruções do fabricante. A presença de colônias azuis com formação de bolhas de gás nas placas Petrifilm™ foi usada como identificação presuntiva de *E. coli*.

As colônias sugestivas de *E. coli* foram então cultivadas em ágar Eosin Methylene Blue (EMB, HIMEDIA) a 35°C por 24 horas. As colônias que apresentaram reflexo verde metalizado, característico de *E. coli*, foram transferidas para ágar Triple Sugar Iron (TSI) e ágar BHI (Himedia) para posterior análise. Foram avaliados os aspectos morfológicos pela coloração de Gram, a capacidade de fermentar glicose, sacarose e/ou lactose, bem como a produção de gás.

Ao todo, 180 colônias bacterianas sugestivas de *E. coli* foram isoladas, sendo 90 provenientes do efluente e 90 do biofertilizante.

Para a obtenção de DNA genômico, os isolados bacterianos foram cultivados em caldo BHI, por 24 horas, a 35 °C. A seguir, uma colônia isolada foi coletada para extração de DNA genômico total, usando-se o kit comercial de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado em placa de nanodrop (Thermo Scientific) e diluídos para a concentração de 10 µg/µL em água livre de Rnase e Dnase ultrapura (Invitrogen), 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).

Foi realizada a confirmação genotípica de *E. coli* usando oligonucleotídeos específicos para o gene 16S (16S-23S F: 5'- GCT TGA CAC TGAACA TTG AG; 16S-23S R: 5'- GCA CTT ATC TCT TCC GCA TT) para reações de PCR (Charaya *et al.*, 2015). Para amplificação dos genes de resistência *bla-TEM* e *ampC* foram utilizados oligonucleotídeos específicos (Invitrogen Custom Primers) (F= 5'- GTG CGC GGA ACC CCT ATT e R= 5'- TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA GGC) e (F= 5'- ATA ACC ACC CAG TCA CGC e R= 5'- CAG TAG CGA GAC TGGC GCA), respectivamente (Jones *et al.*, 2009; Odeh *et al.*, 2002).

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 14 μ L, contendo 4 μ L de PCR Master Mix, 2 μ L de DNA (~20ng/ μ L), o volume do oligoiniciador foi usado de acordo com a referência e o volume restante completado com água livre de Dnase e Rnase (Invitrogen). 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). Os amplicons foram corados com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador de 1Kb DNA ladder (Life Technologies Inc.).

Os controles negativos destes testes foram realizados a partir de reações com adição de água livre de Rnase e Dnase (Invitrogen) no lugar do DNA molde e como controle positivo, foram utilizadas amostras da coleção do Grupo Aplicado à Microbiologia (GrAM) alocado no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da UFES – Campus Alegre.

Resultados

A partir das PCRs de confirmação do gene 16S para *E. coli*, foram identificados 96,11% de isolados positivos (173/180) para o gene 16S, sendo 89 isolados positivos no efluente e 84 no biofertilizante. Após a PCR confirmativa para *E. coli*, foram realizadas reações de PCR para identificação de marcadores genéticos que conferem resistência aos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, genes *bla-TEM* e *ampC*. As observações dos genes de resistência *bla-TEM* e *ampC* estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Frequência de detecção dos marcadores de resistência a beta-lactâmicos (*bla-TEM* e *ampC*) em linhagens de *E. coli* isoladas de efluente e biofertilizante de biodigestor anaeróbico.

	Detecção dos marcadores de resistência % (n)		
	Efluente (89)	Biofertilizante (84)	Total (173)
<i>bla-TEM</i>	19,10 (17)	17,85 (15)	18,49 (32)
<i>ampC</i>	35,95 (32)	36,90 (31)	36,41 (63)

Fonte: Os autores.

De todas as 95 (54,91%) linhagens que tinham os genes de interesse deste estudo, *bla-TEM* e *ampC*, 11 (6,35%) apresentaram os dois marcadores de resistência para antimicrobianos beta-lactâmicos, sendo 5 (5,61%) isolados no efluente e 6 (7,14%) no biofertilizante.

Discussão

As linhagens de *E. coli* foram selecionadas para este estudo devido à sua relevância na saúde única, uma vez que essa bactéria não só é um residente permanente do trato intestinal de animais de sangue quente e répteis, mas também pode ser encontrada em diversos ambientes, como solo e água. A capacidade de *E. coli* adquirir material genético por meio da transferência horizontal de genes é uma característica preocupante, pois facilita a disseminação rápida de clones multirresistentes na comunidade microbiana, representando um risco significativo à saúde pública e animal (Furlan *et al.*, 2020; Nascimento *et al.*, 2020).

O gene *ampC*, associado à resistência à ampicilina, um antimicrobiano da classe dos beta-lactâmicos, foi o mais prevalente identificado neste estudo, sendo encontrado em 36,41% dos isolados (63/173), com 32 positivos em efluentes e 31 em biofertilizantes. Juntamente com o gene *bla-TEM*, que confere resistência a penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, o *ampC* contribui para a produção de beta-lactamases, que são mediadas por plasmídeos e por cromossomos. A presença desses genes em plasmídeos é particularmente alarmante, pois facilita a transferência horizontal de resistência entre diferentes espécies bacterianas (Arruda *et al.*, 2019; Rodríguez *et al.*, 2020).

A análise da presença do gene *bla-TEM*, que confere resistência a medicamentos beta-lactâmicos, revelou variações na prevalência deste marcador genético em comparação com outros estudos. Enquanto o presente estudo encontrou uma prevalência de 18,49% para o gene *bla-TEM*, outros estudos relataram valores discrepantes, como 2% em Wang *et al.* (2023) e 63,4% em Chaudhary,

Jadhav e Banjara (2023). Essas discrepâncias podem estar associadas a diferentes padrões de uso de antimicrobianos, variações nas práticas de manejo e condições ambientais específicas das regiões onde os estudos foram conduzidos.

O uso extensivo de antimicrobianos beta-lactâmicos em rebanhos leiteiros, conforme relatado na literatura, pode estar contribuindo significativamente para a disseminação dos genes de resistência, como o *bla-TEM* (Benites *et al.*, 2021; Borges *et al.*, 2019; Furlan *et al.*, 2020). Isso sugere que as práticas de uso de antimicrobianos na pecuária necessitam de revisão e controle rigoroso para mitigar a propagação de cepas multirresistentes de *E. coli*, protegendo tanto a saúde humana quanto animal.

Conclusão

A análise dos marcadores genéticos de resistência a antimicrobianos beta-lactâmicos revelou a presença significativa dos genes *blaTEM* e *ampC* nas linhagens estudadas. Especificamente, o gene *ampC* foi detectado em 36,41% dos isolados, enquanto o gene *blaTEM* foi encontrado em 18,49%, com ambos os genes coocorrendo em 6,35% das linhagens.

A presença considerável desses genes de resistência, especialmente a coocorrência de *blaTEM* e *ampC* em isolados tanto do efluente quanto do biofertilizante, ressalta a capacidade dos sistemas de biodigestão anaeróbica de manter e possivelmente disseminar *E. coli* com resistência múltipla a beta-lactâmicos. Esses achados sublinham a importância de monitorar e mitigar a propagação de genes de resistência antimicrobiana em ambientes agrícolas e de tratamento de resíduos, visando proteger a saúde pública e a eficácia terapêutica dos antimicrobianos beta-lactâmicos.

Referências

- AHMED, S. K. *et al.* Antimicrobial resistance: impacts, challenges, and future prospects. **Journal of Medicine, Surgery, and Public Health**, v. 2, p. 1-9, 2024.
- ALMEIDA, M. de; BACHA, C. J. C. Literatura sobre eficiência na produção leiteira brasileira. **Revista de Política Agrícola**, v. 30, n. 1, p. 20-33, 2021.
- 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.
- BENITES, N. R. *et al.* Genotypic evaluation of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine clinical mastitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, n. 2, p. 302-310, 2021.
- BORGES, L. F. F. *et al.* Uso da PCR para detecção dos genes *mecA* e *mecA* LGA251 em *Staphylococcus aureus* isolados de leite mastítico no Norte de Minas Gerais. In: **III simpósio de engenharia de alimentos: interdisciplinaridade e inovação na engenharia de alimentos**, 2019. Anais SIMEALI III Simpósio de Engenharia de Alimentos. Montes Claros: Biblioteca Universitária do ICA/UFMG, 2019. p. 844-849, 2019.
- 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, p. 352-363, 2022.
- CHARAYA, G. *et al.* Detection of major mastitis pathogens by multiplex polymerase chain reaction assay in buffalo milk. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 85, n. 2, p. 122-125, 2015.
- CHAUDHARY, M. K.; JADHAV, I.; BANJARA, M. R. Molecular detection of plasmid mediated *bla* TEM, *bla* CTX- M, and *bla* SHV genes in Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) *Escherichia coli* from clinical samples. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 22, n. 1, p. 33, 2023.

ERDAW, M. M. Contribution, prospects and trends of livestock production in sub-Saharan Africa: a review. **International Journal of Agricultural Sustainability**, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2023.

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.

LI, X. *et al.* Anaerobic sludge digestion elevates dissemination risks of bacterial antibiotic resistance in effluent supernatant. **Journal of Environmental Management**, v. 338, p. 1-11, 2023.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Mapa do leite. Brasília, DF, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producaoanimal/mapadoleite#:~:text=O%20Brasil%20%C3%A9%20o%20terceiro,de%204%20milh%C3%B5es%20de%20pessoas>. Acesso em: 03 jun 2024.

NASCIMENTO, A. M. *et al.* Quantitative microbial risk assessment of occupational and public risks associated with bioaerosols generated during the application of dairy cattle wastewater as biofertilizer. **Science of the Total Environment**, v. 745, p. 1-11, 2020.

PHAM, M. N. *et al.* Recent advancement of eliminating antibiotic resistance bacteria and antibiotic resistance genes in livestock waste: a review. **Environmental Technology & Innovation**, p. 1-27, 2024.

RODRÍGUEZ, R. E. F. *et al.* Resistencia antibiótica: el rol del hombre, los animales y el medio ambiente sobre la salud humana. **Revista Científica Salud Uninorte**, v. 36, n. 1, p. 1-27, 2020.

TIMSINA, J. *et al.* Agriculture-livestock-forestry Nexus in Asia: Potential for improving farmers' livelihoods and soil health, and adapting to and mitigating climate change. **Agricultural Systems**, v. 218, p. 1-6, 2024.

WANG, Y. *et al.* Degradation of antibiotic resistance genes and mobile gene elements in dairy manure anaerobic digestion. **PLoS one**, v. 16, n. 8, p. 1-17, 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 nº 4/2022 - Programa de Apoio aos Programas de Pós-Graduação Capixabas Emergentes – PROAPEM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Embrapa Gado de Leite.