

# PERFIL DE RESISTÊNCIA A METAIS PESADOS EM BACTÉRIAS DO GÊNERO *ENTEROBACTER* PROVENIENTES DE CAMA DE AVIÁRIO DE DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO

Data de aceite: 01/04/2024

### **Giselle Pereira de Azevedo**

Estudante de graduação em Farmácia  
(UFRRJ)

### **Gustavo Rodrigues Saldanha**

Mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia-Ciência do Solo  
(UFRRJ)

### **Paula Fernanda Alves Ferreira**

Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia-Ciência do Solo  
(UFRRJ)

### **Cyndi dos Santos Ferreira**

Mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia-Ciência do Solo  
(UFRRJ)

### **Pablo Henrique Narciso Marques**

Estudante de graduação em Agronomia  
(UFRRJ)

### **Irene da Silva Coelho**

Professora do Departamento Microbiologia e Imunologia Veterinária(UFRRJ)

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de resistência a metais pesados em *Enterobacter* isoladas durante o processo de compostagem de cama

de aviário do sistema convencional e orgânico de produção. Foram isoladas e identificadas doze cepas bacterianas do gênero *Enterobacter* durante 125 dias de compostagem dos resíduos, o efeito de cobre, zinco e chumbo no crescimento dessas bactérias foi avaliado pela técnica de microdiluição em caldo. Os isolados foram identificados como *Enterobacter asburiae*(2), *Enterobacter kobei*(1) e *Enterobacter cloacae*(9). A maioria apresentou crescimento elevado nas concentrações mais baixas dos metais, principalmente no cobre e zinco por serem considerados micronutrientes essenciais no desenvolvimento dos microrganismos. O chumbo não afetou o crescimento nas concentrações mais baixas, devido à presença de nitrogênio na composição do sal utilizado, um macronutriente essencial para os microrganismos. Nas concentrações de 2,4 g.L<sup>-1</sup> de cobre, 2,88 g.L<sup>-1</sup> de zinco e 0,72 g.L<sup>-1</sup> de chumbo, houve uma redução acentuada na curva de crescimento dos isolados. Além disso, não houve diferença no padrão de resistência aos metais pesados das bactérias isoladas da cama de aviário do modelo convencional em relação ao orgânico. Assim, resíduos animais como a cama de aviário, independente do sistema

de produção, carregam bactérias resistentes a metais pesados, representando um risco a saúde pública quando utilizados como fertilizante orgânico na agricultura.

**PALAVRAS-CHAVE:** chumbo, cobre, fertilizante orgânico, resíduos animais, zinco.

## RESISTANCE PROFILE TO HEAVY METALS IN BACTERIA OF THE GENRE ENTEROBACTER FROM POULTRY LITTER FROM DIFFERENT PRODUCTION SYSTEMS

**ABSTRACT:** The objective of this work was to evaluate the resistance profile to heavy metals in *Enterobacter* isolated during the composting process of poultry litter from conventional and organic production systems. Twelve bacteria of the genus *Enterobacter* were isolated and identified during 125 days of waste composting and the effect of copper, zinc and lead on the growth of these bacteria was evaluated using the broth microdilution technique. The isolates were identified as *Enterobacter asburiae* (2), *Enterobacter kobei* (1) and *Enterobacter cloacae* (9). The majority showed high growth at the lowest concentrations of metals, mainly copper and zinc as they are considered essential micronutrients in the development of microorganisms. Lead did not affect growth at lower concentrations, due to the presence of nitrogen in the composition of the salt used, an essential macronutrient for microorganisms. At concentrations of 2.4 g.L<sup>-1</sup> of copper, 2.88 g.L<sup>-1</sup> of zinc and 0.72 g.L<sup>-1</sup> of lead, there was a marked reduction in the growth curve of the isolates. Furthermore, there was no difference in the pattern of resistance to heavy metals of bacteria isolated from poultry litter from the conventional model in relation to the organic model. Thus, animal waste such as poultry litter, regardless of the production system, carries bacteria resistant to heavy metals, representing a risk to public health when used as organic fertilizer in agriculture.

**KEYWORDS:** animal waste, copper, lead, organic fertilizer, zinc

## INTRODUÇÃO

Muitos desafios são enfrentados pela avicultura no Brasil, sendo um deles o gerenciamento dos resíduos gerados, como a cama de aviário. Esse resíduo é um material utilizado na forração das instalações onde os animais permanecem para evitar o contato direto do animal com o piso, servir de substrato para a absorção da água, incorporação de fezes, urina e restos de alimentos não aproveitados ou deteriorados (VIRTUOSO et al., 2015). Esse material possui elevado teor nutricional e, devido a isso é muito utilizado na agricultura como fertilizante orgânico. No entanto, ele também pode conter microrganismos patogênicos, como bactérias do gênero *Enterobacter* que são importantes patógenos causadores de infecções em humanos e animais, podendo ainda apresentar diferentes genes de resistência a antimicrobianos devido a utilização indiscriminada desses fármacos na produção animal (CABRAL, 2016).

Além dessa problemática, tem-se ainda a questão dos metais pesados, como o cobre e o zinco, que por serem utilizados como aditivos na ração do animal, pouco absorvidos pelo organismo animal, são facilmente expelidos, podendo contaminar o solo e a água

(OLIVEIRA, 2019; YAZDANKHAH et al., 2018). Além disso, a presença de metais pesados pode favorecer a persistência das bactérias resistentes a antimicrobianos. Já é sabido que microrganismos que são expostos a contaminação ambiental de antimicrobianos e metais pesados estão sujeitos a co-seleção da resistência de ambos, processo esse que pode ocorrer por mecanismos de co-resistência e resistência cruzada (IMRAN et al., 2019). Tal fato constitui um grave potencial de ameaça à saúde pública, uma vez que bactérias resistentes a antimicrobianos limitam a eficiência destes, dificultando o tratamento de infecções (IMRAN et al., 2019).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de resistência a metais pesados em *Enterobacter* isoladas durante o processo de compostagem de cama de aviário do sistema convencional e orgânico de produção.

## MATERIAL E MÉTODOS

O crescimento de doze cepas bacterianas do gênero *Enterobacter* previamente isoladas e identificadas por Ferreira et al. (2021), provenientes de compostagem de cama de aviário do sistema convencional e orgânico de produção, foi avaliado na presença de cobre, zinco e chumbo por meio da técnica de microdiluição em caldo.

Inicialmente, as cepas foram cultivadas em caldo Mueller Hinton a 37°C por 24 horas e a concentração celular foi ajustada. Os ensaios foram realizados em microplacas de poliestireno de 96 poços com um volume total de 100  $\mu$ L por poço, composto por 97,5% de caldo TSB e 2,5% de inóculo. Seis diferentes concentrações de soluções de sulfato de cobre pentahidratado (0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8 e 9,6 g.L<sup>-1</sup>), sulfato de zinco heptahidratado (0,18; 0,36; 0,72; 1,44; 2,88 e 5,76 g.L<sup>-1</sup>) e nitrato de chumbo (0,09; 0,18; 0,36; 0,72; 1,44 e 2,88 g.L<sup>-1</sup>) foram utilizadas. Foram incluídos controles positivos (TSB sem metal + bactéria) e brancos (sem inóculo) para cada concentração dos metais. As microplacas foram incubadas a 35°C por 24 horas. O cálculo foi realizado com base nas leituras espectrofotométricas antes e após a incubação, com o objetivo de determinar o crescimento bacteriano. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a concentração de metal em g.L<sup>-1</sup> capaz de inibir 95% do crescimento bacteriano.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados foram identificados como pertencentes às espécies *Enterobacter asburiae* (2), *Enterobacter kobei* (1) e *Enterobacter cloacae* (9). A curva de crescimento desses isolados não apresentou comportamento discrepante entre os dois sistemas de produção, convencional e orgânico (Figura 1). Todos os isolados apresentaram um elevado crescimento nas concentrações mais baixas de metais, com ápice nas concentrações de 0,60 g.L<sup>-1</sup> de cobre e 0,36 g.L<sup>-1</sup> de zinco e chumbo. Em relação a cobre e zinco, tal resultado já era esperado pois esses micronutrientes são essenciais para a saúde de todos os

organismos vivos, incluindo os microrganismos. Em um estudo realizado por Bravo (2018), ao avaliar a resistência a metais de bactérias isoladas de ambiente aquático, detectou elevado crescimento bacteriano em concentrações baixas de cobre, chumbo, cromo e zinco. O chumbo, por sua vez, é um dos contaminantes ambientais mais comuns, tóxico para os homens e animais, e sem nenhuma função fisiológica conhecida no organismo. No entanto, como a fonte de chumbo utilizada foi o nitrato, um sal que se dissocia em meio aquoso e libera nitrogênio que é indispensável para os organismos, houve crescimento bacteriano nas menores concentrações de chumbo.

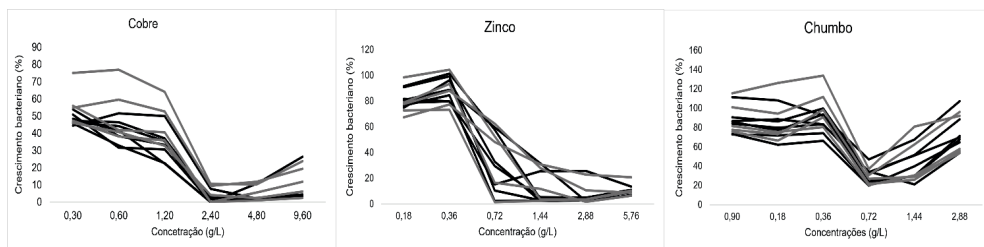


Figura 1: Curva de crescimento bacteriano de isolados de *Enterobacter* provenientes de camas de aviário convencional (cinza) e orgânica (preto) em diferentes concentrações de cobre, zinco e chumbo.

A curva de crescimento apresentou uma tendência de decréscimo à medida em que as concentrações aumentaram. Nas concentrações de 2,4 g.L<sup>-1</sup> para cobre e 0,72 g.L<sup>-1</sup> para zinco e chumbo, foi possível observar uma redução brusca, seguido de uma estagnação no crescimento bacteriano para a maioria dos isolados, principalmente em relação ao cobre e zinco. O ponto mais baixo da curva coincidiu com as concentrações nas quais houve maior número de isolados em que apresentaram ausência de crescimento bacteriano. A alta concentração de metais pesados pode ocasionar efeitos tóxicos nas células dos microrganismos e causar danos letais (BARON, 1996). Esse fato explica o declínio e consequente ausência do crescimento bacteriano à medida que aumenta a concentração dos metais.

No chumbo não foi possível observar isolados que apresentaram ausência de crescimento, logo após o ponto mais baixo da curva (0,72 g.L<sup>-1</sup>), pelo contrário, houve uma nova tendência de crescimento. Tal fato pode estar relacionado a precipitação do metal, tornando-o indisponível no meio. À medida que maior quantidade de sais contendo metal é adicionada, ocorre a formação de precipitados. Essa precipitação é um processo químico em que íons metálicos dissolvidos em solução reagem com outros íons ou compostos, resultando na formação de sólidos insolúveis. Assim, quanto maior for a disponibilidade de íons metálicos na solução, maior será a intensidade da reação de precipitação pois o produto da atividade iônica ultrapassa o produto da solubilidade (SHEORAN; SHEORAN, 2006).

Cerca de 60% dos isolados de *Enterobacter* provenientes da cama de aviário convencional (CAC) atingiram a CIM de cobre a 2,4 g.L<sup>-1</sup>, enquanto em apenas 40% dos isolados não foi possível determinar a CIM (Tabela 1). Os isolados provenientes da cama de aviário orgânica (CAO) atingiram, em sua maioria (86%), a CIM de 2,4 g.L<sup>-1</sup> de cobre. Em relação ao zinco, 60% dos isolados oriundos da cama de aviário convencional, apresentaram uma CIM, sendo 20% na concentração de 0,72 g.L<sup>-1</sup>, 20% na 1,44 g.L<sup>-1</sup> e 20% na 2,88 g.L<sup>-1</sup>. Já os 40% restantes dos isolados apresentam crescimento nem até a maior concentração testada (5,76 g.L<sup>-1</sup>). A concentração de 1,44 g.L<sup>-1</sup> de zinco foi a que inibiu o crescimento de uma maior quantidade de isolados da cama de aviário orgânica. No chumbo, 100% dos isolados da cama de aviário convencional e orgânica apresentaram crescimento na concentração de 2,88 g.L<sup>-1</sup>, sendo esta a maior concentração de chumbo avaliada.

Tabela 1: Percentual de bactérias do gênero *Enterobacter* provenientes de camas de aviário convencional (CAC) e orgânica (CAO) com concentração inibitória mínima (CIM) de chumbo, cobre e zinco determinada. \*Concentrações que não apresentaram isolados que atingiram a CIM

Sistema de produção	Cobre (g.L <sup>-1</sup> )						
	0,3	0,6	1,2	2,4	4,8	9,6	>9,6
CAC (n=5)	*	*	*	60	*	*	40
CAO (n=7)	*	*	*	86	14	*	*
Sistema de produção	Zinco (g.L <sup>-1</sup> )						
	0,2	0,4	0,72	1,44	2,88	5,76	>5,76
CAC (n=5)	*	*	20	20	20	*	40
CAO (n=7)	*	*	14	58	14	*	14
Sistema de produção	Chumbo (g.L <sup>-1</sup> )						
	0,9	0,18	0,36	0,72	1,44	2,88	>2,88
CAC (n=5)	*	*	*	*	*	*	100
CAO (n=7)	*	*	*	*	*	*	100

Independente do sistema de produção, não foi possível detectar a CIM de elevada parcela dos isolados, ou seja, a maioria dos isolados apresentaram crescimento nas concentrações mais altas do metal, com destaque para o chumbo. Tal fato indica uma elevada resistência dos isolados bacterianos aos metais pesados, o que já era esperado para os isolados proveniente do sistema convencional de produção animal pelo uso frequente de metais como aditivos alimentares (ZHANG et al., 2012).

## CONCLUSÕES

Os isolados de *Enterobacter* de diferentes sistemas de produção de cama de aviário apresentaram resistência aos metais pesados cobre, zinco e chumbo e, se beneficiam de baixas concentrações desses metais, indicando seu potencial como micronutrientes. Esse fenômeno é consistente, independentemente do sistema de produção. No entanto, essa resistência representa um risco para o meio ambiente e a saúde pública. Portanto, medidas de gerenciamento são necessárias para mitigar esses riscos e garantir a segurança e sustentabilidade nos sistemas de produção de cama de aviário.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARON, S. **Medical microbiology** (4th edition), University of Texas Medical Branch, Galveston, 1996.

BRAVO, G. B. G. **Resistência aos metais cobre, chumbo, cromo e zinco em bactérias gram-positivas isoladas de ambiente aquático**. 2018. 46 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2018.

CABRAL, A. B. **Caracterização genética de isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*: determinantes de resistência e virulência**. 2016. 168 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2016.

FERREIRA, P.F.A. et al. Effect of composting on the microbiological and parasitic load in animal production wastes in Brazil. **International journal of recycling organic waste in agriculture**, v. 10, n. 3, p. 265-273, 2021.

IMRAN, M. et al. Co-selection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in metal and microplastic contaminated environments: An emerging health threat. **Chemosphere**, v. 215, p. 846–857, 2019.

OLIVEIRA, C. C. D. **Ocorrência de genes de resistência antimicrobiana em solos de área agrícola e de reserva legal em Nova Friburgo, RJ**. 2019. 60 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2019.

SHEORAN, A.S. et al. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: a critical review. **Minerals engineering**, v. 19, n. 2, p. 105-116, 2006.

VIRTUOSO, M.C.S. et al. Reutilização da cama de frango. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 12, n. 2, p. 3964-3979, 2015.

YAZDANKHAH, S. et al. Antimicrobial resistance due to the content of potentially toxic metals in soil and fertilizing products. **Microbial ecology in health and disease**, v. 29, n. 1, p. 1548248, 2018.

ZHANG, F. S. et al. Content of heavy metals in animal feeds and manures from farms of different scales in northeast China. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 9, n. 8, p. 2658–2668, 2012.