

PERFIL DE RESISTÊNCIA A METAIS PESADOS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE CAMA DE AVIÁRIO PROVENIENTE DE DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO

Data de aceite: 01/04/2024

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

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

Giselle Pereira de Azevedo

Estudante de graduação em Farmácia (UFRRJ)

Pablo Henrique Narciso Marques

Estudante de graduação em Agronomia (UFRRJ)

Irene da Silva Coelho

Professora do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária (UFRRJ)

e orgânico de produção. Os isolados foram avaliados quanto à sensibilidade a cobre, zinco e chumbo utilizando a técnica de microdiluição em caldo com seis concentrações de cada metal e três repetições. A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada como a concentração na qual houve uma redução de pelo menos 95% na taxa de crescimento bacteriano. A maioria das cepas apresentaram elevado crescimento em concentrações baixas dos metais, principalmente em cobre e zinco por serem utilizados como micronutrientes no desenvolvimento dos microrganismos. O chumbo, por sua vez, embora tipicamente tóxico, não afetou o crescimento bacteriano nas concentrações mais baixas devido à presença de nitrogênio na composição da fonte de chumbo utilizada, que é um nutriente essencial para os microrganismos. A resistência às concentrações mais altas dos metais foi observada para a maioria dos isolados. Não houve diferença no perfil de resistência a metais das bactérias provenientes de sistema convencional e orgânico. Dessa forma, resíduos animais como a cama de aviário abrigam bactérias resistentes a metais pesados, representando um risco potencial para o ambiente e saúde pública.

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de resistência a metais pesados em *Escherichia coli* isoladas de cama de aviário de sistema convencional

PALAVRAS-CHAVE: chumbo, cobre, resíduos animais, saúde pública, zinco.

HEAVY METAL RESISTANCE PROFILE OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM POULTRY LITTER OF DIFFERENT PRODUCTION SYSTEMS

ABSTRACT: The objective of this study was to assess the profile of heavy metal resistance in *Escherichia coli* isolated from conventional and organic poultry litter systems. The isolates were evaluated for sensitivity to copper, zinc, and lead using the broth microdilution technique with six concentrations of each metal and three replicates. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as the concentration at which there was at least a 95% reduction in the bacterial growth rate. Most strains exhibited high growth at low concentrations of metals, particularly copper and zinc, as they are used as micronutrients in the development of microbial. Lead, although typically toxic, did not affect bacterial growth at lower concentrations due to the presence of nitrogen in the composition of the lead source used, which is an essential nutrient for microorganisms. Resistance to higher concentrations of metal was observed for the majority of isolates. There was no difference in the metal resistance profile between bacteria from conventional and organic systems. Thus, animal residues such as poultry litter harbor bacteria resistant to heavy metals, representing a potential risk to the environment and public health.

KEYWORDS: animal waste, lead, copper, public health, zinc.

INTRODUÇÃO

Há uma crescente expansão do setor avícola no Brasil e isso está diretamente relacionado a alta demanda populacional (AGROCERES, 2022). No entanto, à medida que a avicultura se expande, novos desafios surgem e é essencial enfrentá-los para garantir a sustentabilidade do meio ambiente e a segurança dos produtos. Um desses desafios é o gerenciamento dos resíduos gerados na produção avícola como a cama de aviário.

A cama de aviário 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). Devido seu alto valor nutricional, esse resíduo pode ser aproveitamento na agricultura como fertilizante orgânico e/ou condicionador de solo, sendo assim, uma alternativa sustentável para a disposição desses resíduos no ambiente (THYAGARAJAN et al., 2013). Apesar de tais benefícios, esse resíduo pode conter microrganismos patogênicos, como bactérias da espécie *Escherichia coli* e, excesso de nutrientes e substâncias químicas, como metais pesados, que podem causar contaminação da água e do solo e problemas de saúde pública (PARVAGE et al., 2015).

Metais pesados como cobre (Cu) e zinco (Zn) são amplamente adicionados à ração animal para diversos fins (OLIVEIRA, 2019). Porém, como são pouco absorvidos pelo organismo animal, são facilmente expelidos, podendo contaminar o solo e a água por meio da eliminação direta das excretas do animal ou por meio da utilização do esterco

animal como fertilizante (YAZDANKHAH et al., 2018). Vale ressaltar ainda que a exposição contínua a metais pesados no ambiente pode ocasionar mecanismos de resistência na comunidade microbiana natural (SILVA, 2011).

As bactérias da espécie *Escherichia coli* habitam comensalmente o trato gastrointestinal de animais. No entanto, algumas cepas dessa espécie são capazes de causar infecções sendo frequentemente relatadas em casos de infecções intestinais e urinárias (LEMOS, 2023). Microrganismos que são expostos a contaminação ambiental por metais pesados estão sujeitos a co-seleção da resistência a antimicrobianos e metais pesados. Tal fato constitui um grave potencial de ameaça saúde pública, uma vez que bactérias resistentes a antimicrobianos limitam a eficiência destes, dificultando o tratamento de infecções (IMRAM et al., 2019). Assim, o uso de metais pesados na alimentação dos animais pode induzir uma pressão seletiva sobre as bactérias da espécie *Escherichia coli*, aumentando o risco de desenvolver resistência a metais pesados e, conseqüentemente a antimicrobianos, dificultando o tratamento de infecções causadas por esse microrganismo.

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

MATERIAL E MÉTODOS

O crescimento de 25 cepas bacterianas da espécie *Escherichia coli* previamente isoladas e identificadas por Ferreira et al. (2021), provenientes da compostagem de cama de aviário do sistema convencional (CAC) e orgânico (CAO) de produção, foi avaliado em meio contendo 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 μL por poço, composto por 97,5% de caldo TSB e 2,5% de inóculo. Seis concentrações de soluções de sulfato de cobre pentahidratado (0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8 e 9,6 g.L^{-1}), sulfato de zinco heptahidratado (0,18; 0,36; 0,72; 1,44; 2,88 e 5,76 g.L^{-1}) e nitrato de chumbo (0,09; 0,18; 0,36; 0,72; 1,44 e 2,88 g.L^{-1}) 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 capaz de inibir 95% do crescimento bacteriano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Independente do sistema de produção, os isolados de *Escherichia coli* apresentaram curva de crescimento semelhante nas diferentes concentrações de metais pesados avaliados (Figura 1). Como esperado, nas concentrações mais baixas (0,6 g.L⁻¹ de cobre e 0,36 g.L⁻¹ de zinco e chumbo) houve elevado crescimento bacteriano. O cobre e o zinco são micronutrientes essenciais para a saúde de todos os organismos vivos, mesmo em baixas concentrações (AUGUSTO, 2022). Dessa forma, estes metais atuaram como aditivo/nutriente para o desenvolvimento das bactérias. Já o chumbo, é considerado um metal não essencial pois não possui uma função biológica estabelecida, sendo sua acumulação prejudicial. No presente estudo, a fonte de chumbo utilizada foi o nitrato, um sal que se dissocia em meio aquoso e, durante essa dissociação, um dos íons liberados é o nitrato, uma das principais formas de nitrogênio inorgânico disponíveis. Esse nitrogênio, por sua vez, é um macronutriente crucial para todos os organismos pois desempenha um papel fundamental na síntese de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. Portanto, esse aporte adicional de nitrogênio no meio favoreceu o crescimento bacteriano nas concentrações mais baixas de chumbo, mascarando assim os efeitos tóxicos desse metal (EDISCIPLINAS, 2023).

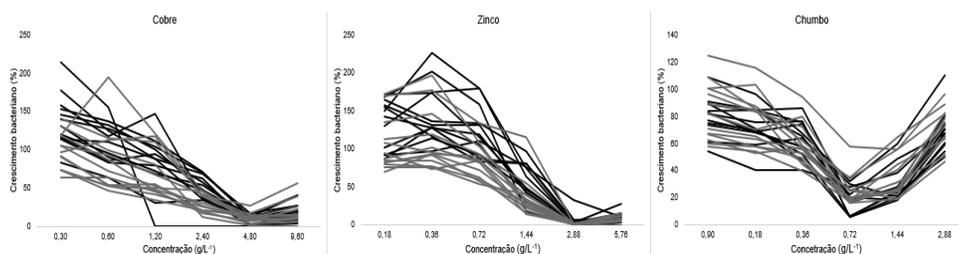


Figura 1: Curva de crescimento de isolados de *Escherichia coli* provenientes de camas de aviário convencional (cinza) e orgânica (preto) em diferentes concentrações de cobre, zinco e chumbo.

A curva de crescimento apresentou uma tendência de decréscimo à medida que as concentrações aumentaram até atingir um ponto mínimo na curva (Figura 1). O ponto mais baixo na curva coincidiu com as concentrações nas quais houve maior número de isolados em que atingiram a CIM, ou seja, em 4,8 g.L⁻¹ para o cobre, 2,88 g.L⁻¹ para o zinco e 0,72 g.L⁻¹ para o chumbo (Figura 1 e Tabela 1). 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 conseqüente ausência do crescimento bacteriano à medida que aumenta a concentração dos metais.

Vale ressaltar ainda que independente do metal testado foi possível observar um aumento no crescimento bacteriano dos isolados avaliados nas concentrações posteriores a de menor crescimento (9,6 g.L⁻¹ de cobre, 5,76 g.L⁻¹ de zinco e 2,88 g.L⁻¹ de chumbo).

Tal fato pode estar relacionado a precipitação do metal, tornando-o indisponível no meio. À medida que maiores quantidades de sais contendo metal são adicionadas, ocorre um aumento na 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).

Para o metal cobre, apenas 25% dos isolados provenientes de CAO alcançaram a CIM, sendo 8% na concentração de 1,2 g/L e 17% na concentração de 4,8 g/L. Dentre os isolados de CAC apenas 23% alcançaram a CIM. Já para o metal zinco, 83% dos isolados de CAO e 100% dos isolados de CAC atingiram a CIM. Para o chumbo apenas 25% dos isolados provenientes de CAO atingiu a CIM, enquanto nenhum isolado do sistema CAC chegou a CIM (Tabela 1). Independente do sistema de produção, a maioria dos isolados não atingiram a CIM nos metais cobre e chumbo (Tabela 1). Ou seja, apresentaram crescimento até na concentração mais alta testada, não sendo possível determinar a CIM. Tal fato indica uma elevada resistência dos isolados bacterianos aos metais pesados, o que já era esperado para os isolados provenientes do sistema de produção animal convencional pelo uso frequente de metais pesados como aditivos alimentares (ZHANG et al., 2012).

Tabela 1: Percentual de isolados de *Escherichia coli* provenientes de camas de aviário convencional (CAC) e orgânica (CAO) com concentração inibitória mínima (CIM) chumbo, cobre e zinco determinada

Sistema de produção	Nº	Cobre (g.L ⁻¹)					
		0,3	0,6	1,2	2,4	4,8	≥9,6
CAC	13	*	*	*	*	23	77
CAO	12	*	*	8	*	17	75
Sistema de produção	Nº	Zinco (g.L ⁻¹)					
		0,2	0,4	0,72	1,44	2,88	≥5,76
CAC	13	*	*	*	*	100	*
CAO	12	*	*	*	*	83	17
Sistema de produção	Nº	Chumbo (g.L ⁻¹)					
		0,9	0,18	0,36	0,72	1,44	≥2,88
CAC	13	*	*	*	*	*	100
CAO	12	*	*	*	25	*	75

*Concentrações que não apresentaram isolados que atingiram a CIM. Nº = Quantidade de isolados

CONCLUSÕES

Bactérias isoladas de camas de aviário de diferentes sistemas de produção apresentaram um padrão de crescimento semelhante em relação ao cobre, zinco e chumbo. Baixas concentrações desses metais pesados favoreceram o crescimento bacteriano, indicando seu potencial como micronutrientes. A maioria das bactérias mostrou alta resistência aos metais pesados. Portanto, independente do sistema de produção, resíduos animais como a cama de aviário abrigam bactérias da espécie *Escherichia coli* resistentes a metais pesados, o que representa um risco para o meio ambiente e a saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROCERES. **Avicultura brasileira, passado, presente e futuro** (2022). Disponível em: <https://agroceresmultimix.com.br/blog/avicultura-brasileira-passado-presente-e-futuro/>. Acesso em: 1 jul. 2022.
- AUGUSTO, B. M. G. **Metais de Transição e o Sistema Nervoso Central: Toxicidade, Uso em Diagnóstico e Opções Terapêuticas**. 2022. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica) – Universidade do Algarve, Faro, Portugal. 2022.
- BARON, S. **Medical microbiology** (4th edition), University of Texas Medical Branch, Galveston, 1996.
- EDISCIPLINAS. **Metabolismo e fatores que interferem no crescimento microbiano** (2023). Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5328292/mod_resource/content/1/Metabolismo%20Microbiano.pdf. Acesso em: 2 jul. 2023.
- FERREIRA, P. F. A. et al. Bacteria and antimicrobial resistance profile during the composting process of wastes from animal production. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-11, 2023.
- IMRAN, M.; DAS, K. R.; NAIK, M. M. 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.
- LEMOS, M. **Escherichia coli (E. coli): o que é, sintomas, transmissão e tratamento**. Tuasaude, 2023. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/escherichia-coli/>. Acesso em 05 de novembro de 2023.
- OLIVEIRA, C. C. D. **Ocorrência de genes de resistência a antimicrobianos em solos de área agrícola e de reserva legal em Nova Friburgo, RJ**. 2019. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2019
- PARVAGE, M. M.; ULÉN, B.; KIRCHMANN, H. Are horse paddocks threatening water quality through excess loading of nutrients. **Journal of Environmental Management**, v. 147, p. 306-313, 2015.
- SHEORAN, A. S.; SHEORAN, V. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: a critical review. **Minerals engineering**, v. 19, n. 2, p. 105-116, 2006.
- SILVA, V. S. Métodos e segurança sanitária na reutilização de cama de aviários. In: PALHARES, J. C. P.; KUNZ, A. **Manejo ambiental na avicultura**. Embrapa Suínos e Aves: ALICE, 2011.

THYAGARAJAN, D.; BARATHI, M.; SAKTHIVADIVU, R. Scope of poultry waste utilization. **IOSR J Agric Vet Sci**, v. 6, n. 5, p. 29-35, 2013.

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

YAZDANKHAH, S.; SKJERVE, E.; WASTESON, Y. 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.