

# INFLUÊNCIA DO ZINCO NA RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS EM BACTÉRIAS PROVENIENTES DE RESÍDUOS ANIMAIS

Data de aceite: 01/04/2024

### **Lislane Gonçalves de Almeida**

Estudante de graduação em Biologia  
(UFRRJ)

### **Paula Fernanda Alves Ferreira**

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

### **Davi Chinarelli Campos**

Estudante de 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 -  
Ciência do solo (UFRRJ)

### **Irene da Silva Coelho**

Professora do Departamento de  
Microbiologia e Imunologia Veterinária  
(UFRRJ)

**RESUMO:** O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do zinco na resistência a carbapenêmicos em bactérias provenientes de resíduos animais durante o processo de compostagem. Cento e duas cepas bacterianas, isoladas durante o processo

de compostagem de cama de cavalo e camas de aviário de sistema convencional e orgânico de produção, foram analisadas através de ensaio de difusão em disco para detecção de resistência fenotípica a imipenem e meropenem na presença e ausência de zinco. Dentre os 102 isolados, 29,4% foram sensíveis a imipenem na ausência de zinco e permaneceram sensíveis na presença do metal, enquanto somente 8,8% dos isolados avaliados, sendo estes todos de *Proteus mirabilis*, apresentaram resistência a imipenem na ausência de zinco e permaneceram resistentes na presença do metal. Cerca de 61,8% dos isolados apresentaram sensibilidade a imipenem e tornaram-se resistentes na presença do metal, sendo estes selecionados para serem avaliados quanto a resistência ao meropenem. Desses 63 isolados, cerca de 25,4% apresentaram sensibilidade a meropenem e tornaram-se resistentes na presença de zinco. É possível que esses isolados possuam como mecanismo de resistência a produção metalobetalactamases. Dessa forma, conclui-se que resíduos animais contêm bactérias resistentes a antimicrobianos e que o zinco influencia no comportamento da resistência bacteriana a carbapenêmicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** antimicrobianos, imipenem, meropenem, metal pesado, resíduos animais.

## ZINC INFLUENCE TO CARBAPENEMIC RESISTANCE IN BACTERIA FROM ANIMAL WASTE

**ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the influence of zinc on resistance to carbapenems in bacteria from animal waste during the composting process. One hundred and two bacterial strains, isolated during the composting process of horse litter and poultry litter from conventional and organic production systems, were analyzed using a disk diffusion assay to detect phenotypic resistance to imipenem and meropenem in the presence and absence of zinc. Among the 102 isolates, 29.4% were sensitive to imipenem in the absence of zinc and remained sensitive in the presence of the metal, while only 8.8% of the isolates evaluated, all of which were *Proteus mirabilis*, showed resistance to imipenem in the absence of zinc and remained resistant in the presence of metal. Around 61.8% of the isolates were sensitive to imipenem and became resistant in the presence of the metal, and these were selected to be evaluated for resistance to meropenem. Of these 63 isolates, approximately 25.4% were sensitive to meropenem and became resistant in the presence of zinc. It is possible that these isolates have metalloβ-lactamase production as a resistance mechanism. Therefore, it is concluded that animal waste contains bacteria resistant to antimicrobials and that zinc influences the behavior of bacterial resistance to carbapenems.

**KEYWORDS:** animal waste, antimicrobials, heavy metal, imipenem, meropenem

## INTRODUÇÃO

Resíduos provenientes da produção animal são amplamente utilizados na agricultura. A grande vantagem da utilização destes resíduos como fertilizantes orgânicos relaciona-se com o fornecimento de nutrientes e/ou com benefícios ligados ao seu conteúdo orgânico, que pode manter, ou mesmo elevar, o teor de matéria orgânica do solo, proporcionando benefícios ao solo e conseqüentemente às plantas (PIRES; MATTIAZZO, 2008). Apesar disso, se os resíduos não forem manejados de forma adequada, podem ser um veículo de contaminação ambiental pois contêm microrganismos patogênicos e determinantes de resistência a antimicrobianos.

A resistência a antimicrobianos é considerada um desafio global pela Organização Mundial da Saúde, tanto para a saúde humana quanto animal (MARTONE-ROCHA et al., 2023), devido ao seu potencial de limitar a eficácia do tratamento de doenças infecciosas, resultando no aumento da taxa de morbidade e mortalidade e no custo do tratamento. Vale ressaltar que a resistência aos antimicrobianos é um processo natural dos microrganismos, entretanto, a utilização indiscriminada desses agentes pode aumentar a sua seleção. Outro fator que pode contribuir para a persistência da resistência bacteriana a antimicrobianos é o acúmulo de metais pesados no solo, como o zinco. Esse acúmulo, por muitas vezes, ocorre devido ao uso recorrente e em excesso de insumos agrícolas, como defensivos agrícolas e fertilizantes químicos (MINARI et al., 2017).

A resistência a antimicrobianos é frequentemente associada a resistência a metais pesados. No ambiente, a pressão seletiva pela presença de metais pesados contribui para a co-seleção direta de resistência aos antimicrobianos. Segundo YAZDANKHAH et al. (2018), esse fenômeno já foi bastante relatado na literatura e pode ocorrer por mecanismos de co-resistência e resistência cruzada.

Considerando que metais pesados como o zinco e determinantes de resistência aos antimicrobianos estão presentes no solo, e que a utilização de resíduos animais na agricultura pode incrementar ainda mais tais contaminantes, causando alterações no ecossistema e constituindo um grave potencial de ameaça para a saúde pública, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do zinco na resistência a carbapenêmicos em bactérias provenientes de resíduos animais durante o processo de compostagem.

## MATERIAL E MÉTODOS

Cento e duas cepas bacterianas foram isoladas durante o processo de compostagem de cama de aviário convencional (CAC), cama de aviário orgânico (CAO) e cama de cavalo (CC) (FERREIRA et al., 2021). Após o isolamento, as cepas foram identificadas pela técnica MALDI-TOF no Laboratório Integrado de Microbiologia (LIM), Instituto de Microbiologia Paulo Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e, em seguida, foi realizado o ensaio de difusão em disco para detecção fenotípica da resistência aos antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos na presença de zinco, conforme os padrões estabelecidos pelo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BRCAS, 2017).

A concentração de zinco utilizada neste experimento foi determinada a partir do experimento de concentração inibitória mínima dessas bactérias ao zinco, realizado por SALDANHA (2023). Assim, foi utilizada a concentração de  $0,36 \text{ g.L}^{-1}$  de zinco, sendo esta a concentração anterior a que apresentou inibição do crescimento bacteriano ( $0,72 \text{ g.L}^{-1}$ ). Para o teste de difusão em disco foi preparado um inóculo contendo  $1,5 \times 10^8$  células/mL, ajustados segundo a escala 0,5 de McFarland. Essa suspensão bacteriana (0,1 mL) foi distribuída por toda a superfície de placas de ágar Mueller Hinton com e sem a presença de zinco, onde foram depositados discos dos antimicrobianos. Após incubação por 18 horas a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , os diâmetros dos halos formados ao redor dos discos foram medidos, em milímetros. Para interpretação dos resultados foram considerados os pontos de corte estabelecidos pelo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing e Clinical and Laboratory Standards Institute (BRCAS, 2019).

Inicialmente, as 102 cepas foram avaliadas quanto a resistência ao imipenem (IMP) na presença e ausência de zinco. Após resultado, foram selecionadas somente as cepas que tornaram-se resistentes ao imipenem na presença de zinco para serem avaliadas quanto a resistência ao meropenem (MER) na presença e ausência de zinco.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 102 isolados, 29,4% (30/102) foram sensíveis a imipenem na ausência de zinco e permaneceram sensíveis na presença do metal (Tabela 1). Estes isolados pertencem à sete espécies, sendo elas, *Enterobacter cloacae* (10%, 1/10), *Escherichia coli* (14%, 5/37), *Klebsiella aerogenes* (100%, 3/3), *Klebsiella pneumoniae* (81%, 13/16), *Klebsiella variicola* (100%, 2/2), *Proteus mirabilis* (14%, 3/21) e *Serratia marcescens* (100%, 3/3) (Tabela 1). Somente 8,8% (9/102) dos isolados, todos pertencentes à espécie *Proteus mirabilis*, apresentaram resistência a imipenem na ausência de zinco e permaneceram resistentes na presença do metal (Tabela 1). Cerca de 61,8% (63/102) dos isolados apresentaram sensibilidade a imipenem na ausência do zinco e tornaram-se resistentes na presença do metal, sendo estas *Citrobacter freundii* (100%, 1/1), *Enterobacter asburiae* (100%, 3/3), *Enterobacter cloacae* (90%, 9/10), *Enterobacter kobei* (100%, 1/1), *Escherichia coli* (87%, 32/37), *Klebsiella pneumoniae* (19%, 3/16), *Proteus mirabilis* (43%, 9/21), *Providencia stuartii* (100%, 1/1), *Acinetobacter baumannii* (100%, 1/1) e *Pseudomonas aeruginosa* (100%, 3/3) (Tabela 1). Nenhum dos isolados se tornou sensível na presença de zinco quando comparado ao controle, ou seja, na ausência do zinco (Tabela 1).

Tabela 1: Percentagem de bactérias que tornaram-se resistentes (R - cinza) e sensíveis (S - verde) aos carbapenêmicos na presença de zinco e bactérias que permaneceram resistentes (R - azul) e sensíveis (S - rosa) na presença e ausência do zinco. Isolados que tornaram-se resistentes a imipenem na presença de zinco foram testados quanto a resistência a meropenem.

	N	IMIPENEM				N	MEROPENEM			
		R	S	R	S		R	S	R	S
<i>Citrobacter freundii</i>	1	100	*	*	*	1	100	*	*	*
<i>Enterobacter asburiae</i>	3	100	*	*	*	3	67	*	*	33
<i>Enterobacter cloacae</i>	10	90	*	*	10	9	45	11	22	22
<i>Enterobacter kobei</i>	1	100	*	*	*	1	100	*	*	*
<i>Escherichia coli</i>	37	87	*	*	13	32	*	3	9	88
<i>Klebsiella aerogenes</i>	3	*	*	*	100	*	*	*	*	*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	19	*	*	81	3	67	*	33	*
<i>Klebsiella variicola</i>	2	*	*	*	100	*	*	*	*	*
<i>Proteus mirabilis</i>	21	43	*	43	14	9	56	11	11	22
<i>Providencia stuartii</i>	1	100	*	*	*	1	*	*	100	*
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	100	*	*	*	1	*	*	100	*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	100	*	*	*	3	33	33	33	*
<i>Serratia marcescens</i>	3	*	*	*	100	*	*	*	*	*
TOTAL DE ISOLADOS (n)	102	63	0	9	30	63	16	4	10	33
TOTAL DE ISOLADOS (%)	100	61,8	0	8,8	29,4	100	25,4	6,3	15,9	52,4

\*N = número de isolados

Dos 102 isolados bacterianos, 63 se tornaram resistentes a imipenem na presença de zinco e, estes foram selecionados para serem avaliados quanto a resistência ao meropenem. O imipenem, meropenem e ertapenem são antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos e adentram a célula bacteriana através de proteínas transmembranas chamadas porinas, e possuem ação bactericida ao inibir a síntese da parede celular ligando-se a proteínas ligantes de penicilinas (PBPs) (BASSETTI et al., 2009). Entretanto, o meropenem oferece a melhor combinação entre sensibilidade e especificidade em termos de detecção de produtores de carbapenemase e é mais eficiente contra bactérias gram-negativas devido à presença de um anel de pirrolidina no carbono 2 (BRCAST, 2018).

Das 63 cepas bacterianas testadas quanto a resistência a meropenem, 52,4% (33/63) foram sensíveis a este carbapenêmico na ausência de zinco e permaneceram sensíveis na presença do metal, com destaque para *E. coli* (88%, 28/32), enquanto 15,9% (10/63) apresentaram resistência a meropenem na ausência de zinco e permaneceram resistentes na presença do metal. Pitkin et al. (1997), relata que o carbapenêmico meropenem possui uma atividade *in vitro* superior a imipenem contra bactérias gram-negativas, como é o caso do presente estudo onde todas as bactérias avaliadas são gram negativas.

Cerca de 25,4% (16/63) dos isolados apresentaram sensibilidade a meropenem e tornaram-se resistentes na presença do metal. Estes isolados pertencem à *Citrobacter freundii* (100%, 1/1), *Enterobacter asburiae* (67%, 2/3), *Enterobacter cloacae* (45%, 4/9), *Enterobacter kobei* (100%, 1/1), *Klebsiella pneumoniae* (67%, 2/3), *Proteus mirabilis* (56%, 5/9) e *Pseudomonas aeruginosa* (33%, 1/3). Apenas 6,3% (4/63) se tornaram sensíveis a meropenem na presença de zinco quando comparado ao controle, ou seja, na ausência do zinco, sendo estes isolados de *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Na presença de zinco, os isolados de *Citrobacter freundii* e *Enterobacter kobei* tornaram-se resistentes tanto a imipenem como meropenem. Além destes, muitos isolados já apresentavam resistência a estes carbapenêmicos mesmo na ausência do metal.

A resistência bacteriana a carbapenêmicos pode ocorrer através de bombas de efluxo, mutações que alteram a expressão e/ou funcionamento das porinas e proteínas ligantes de penicilinas, ou através da aquisição de enzimas betalactamases que hidrolisam os carbapenêmicos (PAPP-WALLACE et al., 2011). Essas enzimas são chamadas carbapenemases e dentro das betalactamases elas dividem-se em dois grupos, sendo as serina-betalactamases, como KPC e OXA-48 e, as metalo-betalactamases, como VIM, NDM e IMP. As metalo-betalactamases (MBLs) hidrolisam uma ampla gama de antimicrobianos, exceto os monobactâmicos e, necessitam de íons de zinco como cofator de sua atividade catalítica (MURPHY et al., 2003). A partir disso, especula-se que as bactérias que mantiveram a resistência (10/63) ou tornaram-se resistentes (16/63) a meropenem na presença de zinco, possuem como mecanismo de resistência a produção de MBLs. Porém, o mecanismo relacionado à resistência das bactérias aos carbapenêmicos ainda será elucidado.

Diante do exposto, fica evidente que resíduos animais contêm bactérias resistentes a antimicrobianos como os carbapenêmicos e, quando esses resíduos animais são utilizados como fertilizantes orgânicos, podem contaminar os solos. A presença de metais pesados como o zinco no solo pode favorecer a persistência das bactérias resistentes e favorecer sua transferência para bactérias comensais e patogênicas de humanos e animais, o que pode resultar em risco a saúde pública.

## CONCLUSÕES

Resíduos animais contêm bactérias resistentes a carbapenêmicos e o zinco influencia o comportamento da resistência bacteriana, podendo fazer com que bactérias sensíveis tornem-se resistentes e bactérias resistentes tornem-se sensíveis na presença desse metal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASSETTI, M. et al. Current Status of Newer Carbapenems. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 564–575, 2009.

BRCAS. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica. São Paulo. 2018.

BRCAS. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. 2019.

BRCAS. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. Teste sensibilidade aos antimicrobianos Método de disco-difusão EUCAST. Versão 6.0, 2017.

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.

MARTONE-ROCHA, S. et al. Antimicrobial profile of non-typhoidal Salmonella isolated from raw sewage in the Metropolitan Region of São Paulo, Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 17, n. 01, p. 86-92, 2023.

MINARI, G. D. et al. Agricultural management of an Oxisol affects accumulation of heavy metals. **Chemosphere**, v. 185, n. , p. 344-350, 2017.

MURPHY, T. A. et al. Biochemical Characterization of the Acquired Metallo- $\beta$ -Lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 582–587, 2003.

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: Past, Present, and Future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4943–4960, 2011.

PIRES, A. M. M.; MATTIAZZO, M. E. Avaliação da viabilidade do uso de resíduos na agricultura. **Embrapa Meio Ambiente-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2008.

PITKIN, D. H.; SHEIKH, W.; NADLER, H. L. Comparative In Vitro Activity of Meropenem Versus Other Extended-Spectrum Antimicrobials Against Randomly Chosen and Selected Resistant Clinical Isolates Tested in 26 North American Centers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. supl. 2, p. S238–S248, 1997.

SALDANHA, G. R. **Perfil de resistência a metais pesados em bactérias provenientes de cama de aviário de diferentes sistemas de produção**. 2023. 30p. Monografia (Graduação em Agronomia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2021.

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.