



PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A BIOCIDAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE BIODIGESTOR ANAERÓBIO

Vitor José da Silva Pereira¹, Kássia Vidal Menezes², Talita de Jesus Cattem Moreno²,
Marcelo Henrique Otenio³, Mariana Drummond Costa Ignacchiti², Juliana Alves
Resende²

¹Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Campus Alegre, Alegre, Brasil
(vitorjospereira@gmail.com)

²Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Campus Alegre, Alegre, Brasil

³Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Brasil

Resumo: A utilização dos efluentes de biodigestores anaeróbios como biofertilizantes e ou seu descarte indevido, pode representar um problema para a saúde pública. Pouco é conhecido acerca da segurança sanitária destes efluentes. O objetivo do trabalho é analisar a susceptibilidade de linhagens de *Escherichia coli* de afluentes e efluentes, correlacionando com o risco clínico-microbiológico. Dentre os biocidas testados houve diferença estatística somente entre os de halos de inibição para clorexidina 2%.

Palavras-chave: Biodigestão anaeróbia; resistência bacteriana; saúde única.

INTRODUÇÃO

A pecuária é uma atividade amplamente desenvolvida no território brasileiro, destacando-se como um dos principais pilares econômicos (Teixeira e Hespagnol, 2014). A expansão da pecuária tem por consequência o aumento da produção de dejetos animais, os quais podem representar um problema de segurança ambiental e para a saúde pública.

Com o crescimento da cadeia produtiva da pecuária surge o desafio de conciliar o descarte seguro de grandes volumes de dejetos animais produzidos (Karim et al., 2005). Em ambientes de produção agrícola estes dejetos podem ser biomassa importante para o processo de biodigestão anaeróbia, com produção de biogás e biofertilizantes. A biodigestão anaeróbia é um processo que vem ganhando destaque, tornando-se uma alternativa viável para o tratamento e manejo dos dejetos animais em grandes e ou pequena escala (Kinyua et al., 2016).

A biodigestão anaeróbia consiste na degradação da matéria orgânica pela ação de microrganismos, em um sistema fechado e na ausência de oxigênio (Santos e Lima, 2016). Ao final do processo, têm-se a redução de sólidos voláteis, produção de biogás e um efluente clarificado e estabilizado microbiologicamente, que pode ser utilizado como biofertilizante (Borges et al., 2016; Soares, 2018). A utilização dos efluentes de biodigestores anaeróbios como biofertilizantes ou o seu descarte diretamente no solo ou em ecossistemas aquáticos pode representar um problema para a saúde pública, pois pouco é conhecido acerca da segurança sanitária destes efluentes.

Ao longo dos anos, tem sido relatado um aumento no uso de antimicrobianos e biocidas na pecuária. O uso destes compostos na criação animal, em sua maioria, é para fins profiláticos e assegurar a produtividade e a competitividade do setor (Loayza et al., 2020).

Os antimicrobianos são utilizados profilaticamente em animais saudáveis, para interromper o desenvolvimento de uma infecção ou para promover o crescimento e acelerar o ganho de peso nos animais (Fao e Iaea, 2019). Destaca-se que o uso de antimicrobianos na assistência à saúde humana e animal está sob intensa vigilância. Fato que não acontece com o uso de biocidas, esses compostos não são monitorados regularmente, e a quantidade de produtos aplicados ou utilizados permanece sem fiscalização. É possível que a enorme quantidade de biocidas disseminados no ambiente possa, por si só, induzir um risco biológico (SCENIHR, 2009).

Considerando que a maioria destes compostos antimicrobianos e biocidas utilizados na medicina humana e veterinária são liberados inalterados no meio ambiente, as preocupações com o impacto ecológico de seus resíduos no ambiente é crescente. Portanto, o uso excessivo de agentes antimicrobianos, bem como biocidas, na pecuária pode oferecer riscos à saúde pública, por promover um aumento significativo na prevalência de microrganismos com múltipla resistência a antimicrobianos.

A diminuição da susceptibilidade aos biocidas vem ganhando espaço, e há evidências de co-seleção silenciosa junto com os antimicrobianos, promovendo a evolução de bactérias potencialmente



patogênicas (Ghanem e Haddadin, 2018; SCENIHR, 2009). Embora a resistência aos antibióticos seja um tema amplamente estudado, a análise da susceptibilidade bacteriana a biocidas é escassa.

A *E. coli* é um microrganismo que está presente tanto no meio ambiente (solo e água), como também na microbiota intestinal de humanos e animais, como um comensal e, usualmente, permanece no lúmen intestinal do hospedeiro (Méric et al., 2016). A persistência de linhagens de *E. coli* resistentes no ambiente é um problema de saúde pública, pois esta bactéria pode circular entre humanos e animais seja por meio da alimentação, água e do meio ambiente, sendo sua transmissão influenciada por migrações humana e animal (Estrela, 2018).

Tendo em vista o cenário atual, onde a disseminação de bactérias multirresistentes tem limitado as opções terapêuticas para o combate às infecções, a busca por conhecimento sobre a susceptibilidade e resistência é de extrema importância, a fim de traçar novas estratégias de controle sobre estes microrganismos. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as características fisiológicas relacionados a susceptibilidade aos biocidas de linhagens de *E. coli* isoladas de afluentes e efluentes de um biodigestor anaeróbio operado com dejetos bovinos em temperatura ambiente localizado na Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora/MG.

MATERIAL E MÉTODOS

Diferentes amostras de afluentes e efluentes foram coletadas a partir de um biodigestor operado em sistema contínuo, mantido em temperatura ambiente. O substrato utilizado para abastecimento do biodigestor é proveniente de dejetos de bovinos leiteiros do Campo Experimental José Henrique Brusqui, em Coronel Pacheco - MG pertencente à Embrapa Gado de Leite. A partir destas amostras foram isoladas 100 linhagens de *E. coli*, sendo 50 do afluente e 50 do efluente. Inicialmente, foram feitos repiques das amostras em meio seletivo - Ágar Eosina Azul de Metileno. Os isolados foram armazenados em freezer a -80°C até a realização dos ensaios.

A susceptibilidade aos biocidas foi avaliada conforme técnica disco-difusão (CLSI, 2019), com adaptações. Foram avaliados os biocidas: hipoclorito de sódio 2%, diglicolato de clorexidina 2% e iodopolividona 10%. Os biocidas foram selecionados em função da sua utilização na rotina dos hospitais e por seu uso disseminado na população.

Os inóculos foram ajustados para o padrão 0,5 da escala de MacFarland. As suspensões bacterianas foram semeadas sobre a superfície das placas contendo meio ágar Mueller Hinton. Foram adicionados discos de papel filtro estéril (6mm) e

inoculado 5 μL dos biocidas selecionados. As placas foram incubadas por 24h em estufa a 35°C , em seguida foram feitas as medições dos halos de inibição gerados em torno dos discos de papel filtro. A linhagem controle, *Escherichia coli* ATCC 25922 foi avaliada e submetida as mesmas condições de ensaio.

Os resultados foram avaliados através da fórmula estatística da análise de variância (ANOVA). A variação nos resultados dos testes, foi analisada pelo teste T-student, sendo considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$ (95%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliadas 100 linhagens de *E. coli* isoladas a partir do processo de biodigestão, no intuito de analisar se este processo é capaz de alterar as susceptibilidades aos biocidas utilizados na rotina hospitalar e doméstica.

Pela Figura 1 é possível observar um resultado da inibição do crescimento microbiano formado pela adição dos biocidas: Hipoclorito de Sódio 2%; Diglicolato de Clorexidina 2% e Iodopolividona 10%.



Figura 1. Efeito antimicrobiano dos biocidas sobre linhagens de *E. coli* isoladas do afluente e efluente de biodigestor anaeróbio operados em temperatura ambiente.

Legenda: IO = iodopolividona; HIP = hipoclorito de sódio; CLO = diglicolato de clorexidina.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1. Ao comparar a média dos halos de inibição entre o grupo afluente e efluente, para diglicolato de clorexidina 2% é possível verificar uma redução significativa na inibição do crescimento no grupo efluente, evidenciando uma menor suscetibilidade neste grupo. Este resultado sugere uma menor susceptibilidade à clorexidina após o processo de biodigestão. Para os biocidas, hipoclorito de sódio 2% e iodopolividona 10%, não foi verificada diferenças significativas entre os grupos.



Tabela 1. Avaliação da susceptibilidade aos biocidas de amostras de *Escherichia coli* isoladas dos afluentes e efluentes de biodigestores operados em temperatura ambiente.

Biocidas	Média do diâmetro do halo de inibição (mm) e desvio padrão		Valor de <i>p</i>
	Afluente (n=50)	Efluente (n=50)	
Iodopolividona 10%	6,04 (±0,167)	7,09 (±0,069)	0,251
Hipoclorito de sódio 2%	6,72 (±0,085)	7,18 (±0,079)	0,864
Clorexidina 2%	19,23 (±0,293)	17,93 (±0,431)	0,014*

Fonte: autor

Os biocidas avaliados neste trabalho são comumente utilizados para controlar o crescimento de microrganismos patogênicos ou para eliminá-los de objetos, superfícies ou da pele. A eficácia da ação de antissépticos e desinfetantes variam com os diferentes tipos de microrganismos (Machado et al., 2010).

A definição de resistência biocida permanece um tanto incerto, alguns sugerem que a resistência é uma diminuição na suscetibilidade, enquanto outros sugerem que as bactérias que sobrevivem à exposição biocida em qualquer concentração utilizável são consideradas resistentes (Meade et al., 2021). Segundo Bock (2019) espécies Gram negativas, como *E. coli*, são menos permeáveis aos biocidas devido à presença de uma membrana externa e camada de lipopolissacarídeos. As bactérias podem modificar sua membrana, regular as bombas de efluxo e iniciar a formação de biofilme em resposta à exposição a biocidas.

A redução na susceptibilidade aos biocidas, bem como a capacidade de permanência de bactérias patogênicas, em superfícies de fácil dispersão pode estar contribuindo com a co-seleção silenciosa aos antimicrobianos, tornando-se um problema mundial de saúde única. Esta contribuição, apesar de algumas evidências, permanece não comprovada (Ghanem e Haddadin, 2018).

A disseminação no ambiente de efluentes com linhagens bacterianas que expressam menor susceptibilidade ao diglicolato de clorexidina, suscita questionamentos quanto a segurança microbiológica e posterior uso destes efluentes. É importante salientar que estudos adicionais serão necessários.

CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos neste estudo quanto ao perfil de susceptibilidade aos biocidas, mostram que as linhagens de *E. coli* isoladas dos

efluentes, foram menos susceptíveis ao diglicolato de clorexidina 2% do que as linhagens isoladas dos afluentes. Este resultado sugere possivelmente como o processo de biodigestão é capaz de alterar as características dos microrganismos que serão liberados no ambiente.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), da Embrapa Gado de Leite, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES - Edital 03/2021; Projeto 428/2021).

REFERÊNCIAS

- Bock, L. J. Bacterial biocide resistance: a new scourge of the infectious disease world?. *Archives of Disease in Childhood*, v.104, n.11, p. 1029-1033, 2019.
- Borges, A. C. P. et al. Renewable energy: a contextualization of the biomass as power supply. *REDE: Revista Eletrônica do PRODEMA*, v. 10, n. 02, p. 23–36, 2016.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100. Wayne, PA: CLSI. 2019.
- Estrela, T. S. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. Brasil, Ministério da Saúde, Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde. *Saúde e Política Externa*: v. 20, p. 1998-2018, 2018.
- Fao; Iaea. Antimicrobial movement from agricultural areas to the environment: The missing link. A role for nuclear techniques. Food And Agriculture Organization Of The United Nations, v. 13, 2019.
- Ghanem, B.; Haddadin, R. N. Multiple drug resistance and biocide resistance in *Escherichia coli* environmental isolates from hospital and household settings. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v. 7, n. 1, p. 47, 2018.
- Karim, K. et al. Anaerobic digestion of animal waste: Effect of mode of mixing. *Water Research*, St. Louis, USA, v. 39, n. 15, p. 3597–3606, 2005.
- Kinyua, M. N. et al. Review of small-scale tubular anaerobic digesters treating livestock waste in the developing world. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 58, p. 896-910, 2016.
- Loayza, F. et al. Factors obscuring the role of *E. coli* from domestic animals in the global antimicrobial



resistance crisis: an evidence-based review. *International journal of environmental research and public health*, v. 17, n. 9, p. 3061, 2020.

Machado, T. et al. Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. *Revista do Instituto Adolfo Lutz, Porto Alegre*, v. 69, n. 4, p. 475–481, 2010.

Meade, E. et al. Biocidal resistance in clinically relevant microbial species: A major public health risk. *Pathogens*, v. 10, n. 5, p. 598, 2021

Méric, G. et al. From Escherich to the *Escherichia coli* genome. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 6, p. 634–636, 2016.

Santos, R. B; Lima, A. K. C. Análise comparativa do biogás: processo em biodigestores e de aterro sanitário. *Revista Eletrônica de Energia*, v. 6, n. 1, p. 48-57, 2016.

Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. January, p. 1–118, 2009. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/opinions/en/biocides-antibiotic-resistance/about-biocidesantibiotic-resistance.htm>

Soares, L. Análise de projetos e percepção ambiental de discentes da UNIFAL de Poços de sólidos Project analysis and environmental perception of UNIFAL students from Poços de Caldas related to biodigestion as a sustainable alternative to solid waste. *Brazilian Applied Science Review, Campinas*, v. 2, n. 2, p. 621–624, 2018.

Teixeira, J. C.; HESPANHOL, A, N. A trajetória da pecuária bovina brasileira the trajectory of Brazil ' s beef cattle la trayectoria de la ganadería brasileña. *Caderno Prudentino de Geografia*, v. 1, n. 36, p. 26–38, 2014.