



Ocorrência de genes de resistência a betalactâmicos em solos agrícolas e de reserva legal em Nova Friburgo – RJ

Occurrence of beta-lactam resistance genes in agricultural and legal reserve soils in Nova Friburgo– RJ

BERTHOLOTO, Danielli Monsores¹; PATRICIO, Thereza Cristina da Costa²; AVILA, Isabel Arjonas Fernandes³; SANT' ANNA, Gustavo Souza Lima⁴; COELHO, Shana de Mattos de Oliveira⁵; COELHO, Irene da Silva⁶

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, danibertholoto@gmail.com; ²Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, therezacristina8466@gmail.com; ³Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, isabelarjonas@gmail.com; ⁴Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, gsouzalimas@gmail.com; ⁵Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, shana_mattos@hotmail.com; ⁶Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, irenecs@yahoo.com

RESUMO EXPANDIDO

Eixo Temático: Manejo de Agroecossistemas

Resumo: A resistência aos antimicrobianos é considerada um problema de saúde pública global, e a compreensão de sua ocorrência em ambientes naturais e agrícolas são de grande relevância para garantir o manejo sustentável da agricultura. Assim, este estudo buscou avaliar a presença de genes que codificam betalactamases em solos agrícolas e de reserva legal na região de Nova Friburgo, RJ. Foi realizada a amplificação dos genes de resistência a betalactâmicos: *blaSHV*, *blaTEM*, *blaCTX-M*, *blaOXA-23*, *blaOXA-24*, *blaOXA-51*, *blaOXA-58*. O gene *blaSHV* foi detectado nas propriedades de cultivo de hortaliças e nas áreas de reserva legal em 20% e 70%, respectivamente. Os genes *blaOXA-24*, *blaOXA-51* e *blaOXA-58* foram detectados somente nas áreas de reserva legal em 20%, 10% e 20%, respectivamente. Estes resultados indicam que ambientes naturais podem incrementar genes de resistência no ecossistema e alertam que ações antropogênicas que levam a exposição desses solos possam intensificar o quadro.

Palavras-chave: ambientes naturais; betalactamases; manejo sustentável; resistoma ambiental; saúde única.

Introdução:

Os solos compreendem uma grande parte da diversidade de microrganismos, que contribuem para várias funções cruciais do ecossistema. Além disso, são considerados reservatórios naturais de genes de resistência a antimicrobianos (CARVALHO et al., 2016; KNAPP et al., 2010). Evidências apontam que a proximidade existente entre ambientes naturais e ambientes agrícolas favorece a transferência do resistoma para bactérias comensais e patógenos de humanos e animais, afetando a segurança de alimentos provenientes de sistemas de produção (HOELZER et al., 2017; REULAND et al., 2014). Associado a isso, a aplicação de resíduos animais em solos agrícolas configura um fator determinante na intensificação da resistência antimicrobiana, uma vez que substâncias antibióticas não são plenamente metabolizadas pelo organismo animal (FERREIRA et al. 2023).



Dentre os antimicrobianos, comumente utilizados no tratamento de infecções em humanos e animais, encontram-se os betalactâmicos. No entanto, a ocorrência da resistência a estes fármacos têm aumentado nos últimos anos, o que pode limitar a sua utilização. Um dos mecanismos de resistência mais eficazes a esses fármacos é a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), que levam à resistência a cefalosporinas de terceira geração e monobactam, estando também frequentemente relacionada a genes de origem plasmidial que são transferíveis entre diferentes espécies bacterianas (VELDMAN et al., 2014). Essas enzimas são codificadas por genes *bla* presentes em elementos genéticos móveis como transposons e integrons de bactérias Gram-negativas. Dentre os principais genes que codificam ESBL presentes em amostras de solos agrícolas, estão *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e o *bla*_{OXA}. Além destes, os genes. *bla*_{OXA} que conferem resistência a vários antimicrobianos, como as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, também merecem destaque (ANDRADE & DARINI, 2017).

Nesse sentido, é importante identificar os genes de resistência que são introduzidos e os que ocorrem naturalmente no ambiente, a fim de priorizar a produção sustentável de culturas agrícolas, já que o fluxo de genes de resistência em animais e humanos também pode afetar diretamente a transmissão para os diferentes reservatórios ambientais. Diante disso, este trabalho buscou avaliar a presença de genes de resistência a betalactâmicos em solos de áreas agrícolas que receberam cama de aviário fresca como adubo orgânico e solos de reserva legal localizadas na cidade de Nova Friburgo, RJ, Brasil.

Metodologia:

A área de estudo está localizada na microbacia de Barracão dos Mendes, Nova Friburgo, região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, latitude 22° 16' 55'' e longitude 42° 31' 52''. A coleta de solos foi realizada em propriedades agrícolas com produção intensiva de hortaliças adubadas com cama de aviário fresco e respectivas áreas de reserva legal. Foram coletadas 10 amostras de solo para cada área de estudo, sendo 20 amostras no total. As amostras identificadas como P1, P3, P4, P6, P8, P9, P11, P14, P15 e P16 foram provenientes de áreas com cultivo intensivo de hortaliças e as amostras M1, M4, M6, M8, M9, M11, M12, M14, M15, M16 de áreas com remanescentes de mata (reserva legal). Cada amostra foi constituída por trinta subamostras, coletadas de 0-20 cm de profundidade, em cada ponto escolhido.

O DNA total foi extraído a partir de 0,25g de solo com o kit Power Soil DNA Isolation® (MO Bio Laboratories Inc., Carlsbad, CA), segundo protocolo fornecido pelo fabricante. O DNA extraído das amostras de solo foi utilizado como molde para amplificação do gene que codifica 16S rDNA (SUZUKI et al., 1996), os genes relacionados à produção de betalactamases do tipo ESBL, *bla*_{SHV} (SHAHID, 2010), *bla*_{TEM} (MINARINI et al., 2007) e *bla*_{CTX-M} (GESER et al., 2012), e os genes relacionados à produção de betalactamases do tipo carbapenemases ou oxacilinases, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-58}, (CHEN et al., 2018).



Resultados e Discussão:

Considerando a detecção dos genes de resistência relacionados à produção de betalactamases do tipo ESBL, o gene *bla*_{SHV} foi detectado nos solos das áreas de produção agrícola P4 e P9, e nas áreas de reserva legal M4, M8, M11, M12, M14, M15 e M16 (Tabela 1). Os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} não foram encontrados em nenhuma das amostras de solo avaliadas.

Tabela 1. Detecção dos genes 16S rDNA, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51} e *bla*_{OXA-58} em solos de áreas com cultivo de hortaliças adubadas com cama de aviário e de áreas de reserva legal da bacia hidrográfica de Barracão dos Mendes, em Nova Friburgo-RJ.

Áreas	Genes							
	16S rDNA	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-51}	<i>bla</i> _{OXA-58}
P1	+	-	-	-	-	-	-	-
P3	+	-	-	-	-	-	-	-
P4	+	+	-	-	-	-	-	-
P6	+	-	-	-	-	-	-	-
P8	+	-	-	-	-	-	-	-
P9	+	+	-	-	-	-	-	-
P11	+	-	-	-	-	-	-	-
P14	+	-	-	-	-	-	-	-
P15	+	-	-	-	-	-	-	-
P16	+	-	-	-	-	-	-	-
M1	+	-	-	-	-	+	-	+
M4	+	+	-	-	-	-	-	+
M6	+	-	-	-	-	-	-	-
M8	+	+	-	-	-	-	-	-
M9	+	-	-	-	-	-	-	-
M11	+	+	-	-	-	-	+	-
M12	+	+	-	-	-	+	-	-
M14	+	+	-	-	-	+	-	-
M15	+	+	-	-	-	+	-	-
M16	+	+	-	-	-	+	-	-

P = Áreas de cultivo agrícolas; M = Áreas de Reserva Legal, com remanescente de mata; Presença (+) e ausência (-) de gene.

Genes de resistência relacionados à produção de betalactamases do tipo carbapenemases ou oxacilinases foram detectados somente nas áreas de reserva legal. O gene *bla*_{OXA-24} foi detectado em M1 e M11, o gene *bla*_{OXA-51} foi detectado apenas em M11 e o gene *bla*_{OXA-58} foi detectado em M1 e M4. O gene *bla*_{OXA-23} não foi encontrado em nenhuma das amostras de solos avaliadas. Genes que codificam betalactamases de espectro estendido do tipo ESBL foram detectados nos solos de cultivos agrícolas e de reserva legal. Foram identificados genes da classe A (gene



bla_{SHV}) em amostras de solo do sistema agrícola e genes da classe A (gene *bla_{SHV}*) e D (genes *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-51}*, *bla_{OXA-58}*) em amostras de reserva legal. Enzimas destas classes conferem resistência a vários antibióticos, como as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (ANDRADE & DARINI, 2017).

Os resultados deste estudo demonstraram maior ocorrência dos genes que codificam betalactamases de espectro estendido em áreas de reserva legal, quando comparadas às áreas de sistema agrícola. Outros estudos sobre a detecção de genes que codificam betalactamases em amostras de solo, também apresentaram resultados similares aos deste trabalho. Graham et al. (2016), descrevem a presença de genes do tipo *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* tanto em solos agrícolas como em solos florestais. Genes que codificam betalactamases do tipo *bla_{SHV}* foram encontrados em amostras de solos provenientes de área de preservação e de área agrícola, distantes entre si por aproximadamente 42 km (FURLAN et al., 2017). Alterações no DNA genômico permitem a ocorrência de transformações no processo evolutivo de cepas bacterianas, já que as suscetíveis acabam sendo eliminadas pelos antimicrobianos, permanecendo as bactérias resistentes (MCEWEN; COLLIGNON, 2018). Assim, os dados apresentados corroboram com a hipótese de que ambientes naturais podem incrementar genes de resistência aos antimicrobianos no ambiente, devido a características estruturais inerentes às bactérias e a diferentes pressões de seleção ao qual são expostas.

Conclusões:

Este estudo demonstrou a presença de genes de resistência a betalactâmicos nos diferentes ambientes estudados, trazendo um alerta quanto ao uso indiscriminado desta classe de antimicrobianos. As amostras de solo da reserva legal apresentaram maior diversidade de genes de resistência quando comparada às amostras provenientes do ambiente agrícola, despertando a atenção para a ocorrência natural de resistência em ambientes de vegetação nativa e a preocupação de que ações antropogênicas que levam a exposição desses solos possam intensificar o quadro. Nesse sentido, trabalhos como esse são importantes para elucidar o papel dos solos como fonte e reservatório de resistência a antimicrobianos, e ponderar os riscos para os sistemas agrícolas de produção em uma perspectiva *One Health*, uma vez que a saúde humana, animal e ambiental estão interconectadas.

Referências bibliográficas:

ANDRADE, Leandro N.; DARINI, Ana Lúcia C. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que blábláblá é esse? **Journal Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 16-25, 2017.

CARVALHO, Teotonio S., JESUS, Ederson C., BARLOW, Jos, GARDNER, Toby A., SOARES, Isaac C., TIEDJE, James M., MOREIRA, Fatima M.S. Land use



intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria. **Ecology**, 97: 2760-2771, 2016.

CHEN, Hsing-Yu; YANG, Ya-Sung; HSU, Wei-Jane; CHIUEH, Tzong-Shi; SUN, Jun-Ren. Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter nosocomialis* strain ST410 harbouring plasmid-borne blaOXA-72 gene in Taiwan. **Clinical Microbiology and Infection**, v.24, n.9, p.1023-1024, 2018.

FERREIRA, Paula. Fernanda. A., XAVIER, Júlia. F., NUNES, Juliana F., FONSECA, Isabela P., COELHO, Shana. M. O., SOARES DE SOUZA, Miliane. M., COELHO, Irene. S. Bacteria and antimicrobial resistance profile during the composting process of wastes from animal production. **Brazilian Journal of Microbiology**, 54(2), 1157–1167, 2023.

FURLAN, João Pedro R. & STEHLING, Eliana G. Presence of β -Lactamases Encoding Genes in Soil Samples from Different Origins. **Water Air Soil Pollut**, v.228, n.125, 2017.

GESER, Nadine; STEPHAN, Roger; HÄCHLER Herbert. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 21, 2012.

GRAHAM David W.; KNAPP Charles W.; CHRISTENSEN Bent T.; MCCLUSKEY, Séanín.; DOLFING, Jan. Appearance of β -lactam Resistance Genes in Agricultural Soil sand Clinical Isolates over the 20th Century. **Scientific Reports**. Feb 16; 6: 21550, 2016.

HOELZER, Karin; WONG, Nora; THOMAS, Joe; TALKINGTON, Kathy; JUNGMAN, Elizabeth; COUKELL, Allan. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence? **BMC Veterinary Research**, v.13, n.1, p.211, 2017.

KNAPP, Charles W.; DOLFING, Jan; EHLERT, Phillip A. I.; GRAHAM, David W. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. **Environmental Science & Technology**, v. 44, p. 580–587, 2010.

MCEWEN, Scott A.; COLLIGNON, Peter J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **American Society for Microbiology**. Estados Unidos. 2018.

MINARINI, Luciene A. R.; GALES, Ana C.; PALAZZO, Izabel C. V.; DARINI, Ana Lucia C. Prevalence of community-occurring extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Current Microbiology**, v. 54, p. 335–341. 2007.



REULAND Elien A.; NAIEMI, Nashwn al; RAADSEN, Susanne A.; SAVELKOUL, Paul H.; KLUYTMANS, Jan; VANDENDROUCKE-GRAULS, Christina M. J. E. Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables. **Clinical Microbiology and Infection**, v.33, n.10, pp. 1843-1846, 2014.

SHAHID, Mohammad. Citrobacter spp. Simultaneously harboring blaCTX-M, blaTEM, blaSHV, blaampC, and insertion sequences IS26 and orf513: an evolutionary phenomenon of recent concern for antibiotic resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.5, p.1833-1838, 2010.

SUZUKI, T. Marcelino; S. J. GIOVANNONI. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.625-630, 1996.

VELDMAN Kees.; KANT Arie; DIERIKX Cindy; VAN Essen. Z. A.; WIT, Ben; MEVIUS Dik Enterobacteriaceae resistant to third-generation cephalosporins and quinolones in fresh culinary herbs imported from Southeast Asia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 72-77, 2014.