RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E TRIAGEM FENOTÍPICA DE ESBL EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS DE SOLOS DE CAFEZAIS

Bernardo Aparecido Buqueroni Mateini[1], Pedro Henrique de Almeida Satil Gonçalves[1], Cleveland Soriano Neto[1], Kênia Valéria dos Santos[2], Mariana Drummond Costa Ignacchiti[1], Juliana Alves Resende[1]

[1]Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde – CCENS, Alto Universitário, s/n, Guararema – 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, mateininado@gmail.com, almeidahsg@gmail.com, csorianoneto@gmail.com, mariana.ignacchiti@ufes.br, juliana.resende@ufes.br

[2]Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Avenida Marechal Campos, 1468, Maruípe – 29040-090 – Vitória-ES, Brasil, kenia.santos@ufes.br.

Resumo

A resistência aos antimicrobianos (RAM) em ambientes agrícolas constitui uma questão relevante para a Saúde Única, e solos de cafezais ainda são pouco investigados como reservatórios de bactérias resistentes. Este estudo caracterizou bactérias Gram-negativas recuperadas de solos de duas propriedades cafeeiras com histórico de fertilização com esterco, avaliando identificação taxonômica, suscetibilidade a antimicrobianos e triagem fenotípica de ESBL. Foram obtidos 26 isolados, os quais todos foram identificados, com predominância de *Acinetobacter* spp. e presença frequente de *Escherichia coli* e *Yokenella regensburgei*. Nove isolados (34,6%) foram classificados como multidroga-resistentes (MDR) e três (11,5%) apresentaram fenótipo sugestivo de produção de ESBL. Todos os isolados apresentaram perfil de suscetibilidade ao meropenem e à gentamicina. A ocorrência de MDR e de fenótipos sugestivos de ESBL evidencia a relevância do solo de cafezais como compartimento ambiental de bactérias resistentes e reforça a importância da vigilância da RAM sob a perspectiva da Saúde Única.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana. Solo agrícola. ESBL. MALDI-TOF/MS. Saúde Única.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Farmácia.

Introdução

A cafeicultura apresenta grande relevância econômica e social no Espírito Santo (Conab, 2023). O solo constitui um dos ambientes microbianos mais diversos e abriga bactérias naturalmente portadoras de determinantes de resistência, compondo um importante reservatório ambiental do resistoma (Han *et al.*, 2022). Em sistemas agrícolas, práticas de manejo, especialmente a fertilização com resíduos de origem animal, podem modificar a estrutura das comunidades microbianas e favorecer a manutenção de bactérias resistentes no ambiente.

A resistência aos antimicrobianos (RAM) é um fenômeno evolutivo amplamente distribuído em comunidades microbianas. Genes de resistência presentes em bactérias ambientais podem estar associados a elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, favorecendo sua circulação entre diferentes populações bacterianas (Bhat *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2025). Entre os fenótipos de maior relevância, destaca-se a produção de β-lactamases de espectro estendido (ESBL), associada à redução da atividade de cefalosporinas de amplo espectro e do aztreonam. A importância desse mecanismo é reforçada pela inclusão de Enterobacterales resistentes às cefalosporinas de terceira geração entre os grupos de prioridade crítica da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2024).

Estudos demonstram que a aplicação de esterco pode alterar de forma persistente a comunidade microbiana e o resistoma do solo (Shawver *et al.*, 2021), e bactérias resistentes têm sido identificadas em diferentes ambientes agrícolas, inclusive no Espírito Santo (Mothé *et al.*, 2025). Entretanto, informações específicas sobre a ocorrência de bactérias Gram-negativas multirresistentes e fenótipos relacionados à produção de ESBL em solos de cafezais permanecem limitadas.

Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar bactérias Gram-negativas recuperadas de solos de cafezais, determinar seus perfis fenotípicos de suscetibilidade a antimicrobianos de relevância clínica e investigar a ocorrência de fenótipos sugestivos de produção de ESBL.

Metodologia

As amostras de solo foram coletadas em duas propriedades rurais produtoras de café, com histórico de fertilização com esterco, localizadas nos municípios de Santa Maria de Jetibá e Alegre, Espírito Santo. Em cada propriedade, foram coletados aproximadamente 100 g de solo, em profundidade de 10 a 15 cm, com auxílio de trado cilíndrico. Para o enriquecimento, 25 g de cada amostra foram homogeneizados em 225 mL de caldo nutriente e incubados por 24 horas, a 37 °C, sob agitação de 150 rpm.

Após o enriquecimento, alíquotas das culturas foram semeadas por espalhamento em Ágar EMB (eosina azul de metileno) e incubadas a 37 °C por 24 horas. As colônias selecionadas foram subcultivadas em *CHROMagar™ Orientation Medium* (BD, Maryland, EUA) para triagem presuntiva com base no morfotipo colonial. Colônias representativas foram purificadas e submetidas à coloração de Gram. As culturas puras foram criopreservadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) acrescido de 20% de glicerol.

A identificação taxonômica foi realizada por espectrometria de massas por dessorção/ionização a laser assistida por matriz com analisador de tempo de voo (MALDI-TOF/MS), utilizando o sistema MALDI Biotyper® Sirius (Bruker Daltonics).

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliado por disco-difusão, segundo a metodologia padronizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2025). Suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e ajustadas ao padrão 0,5 de McFarland, sendo posteriormente semeadas em Ágar Mueller-Hinton. Após aplicação dos discos, as placas foram incubadas a 35 °C por 18 a 24 horas e os diâmetros dos halos foram mensurados em milímetros. Foram avaliados: gentamicina (GEN), cloranfenicol (CLO), levofloxacino (LVX), tetraciclina (TET), amoxicilina (AMO), ceftriaxona (CRO), amoxicilina associada ao ácido clavulânico (AMC), cefepime (CPM), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), aztreonam (ATM) e meropenem (MER). Os resultados foram interpretados de acordo com os pontos de corte do CLSI aplicáveis ao respectivo grupo taxonômico e ao antimicrobiano testado.

Para a classificação de multidroga-resistência, adotou-se a definição de Magiorakos *et al.* (2012), segundo a qual MDR corresponde à não suscetibilidade a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas. Assim, as categorias intermediárias (I) e resistente (R) foram consideradas como não suscetíveis para a definição de MDR. Adicionalmente, a frequência de isolados resistentes (R) a agentes de três ou mais classes foi apresentada de forma descritiva, permitindo comparar a classificação baseada exclusivamente em resistência com a definição padronizada de MDR.

A triagem fenotípica de ESBL foi realizada pelo teste de sinergismo de duplo disco. O disco de amoxicilina/ácido clavulânico foi posicionado no centro da placa e, a 25-30 mm de distância centro a centro, foram dispostos discos de ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), cefepime (CPM), ceftriaxona (CRO) e aztreonam (ATM). Após incubação a 35 ± 2 °C por 16 a 18 horas, o aumento ou a distorção da zona de inibição em direção ao clavulanato foi considerado fenótipo sugestivo de produção de ESBL. *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 foram empregadas como controles negativo e positivo, respectivamente.

Resultados

Foram obtidos 26 isolados bacterianos, seis provenientes da propriedade A, em Santa Maria de Jetibá (A1-A6), e 20 da propriedade B, em Araraí, Alegre (B1-B20). Oito isolados foram classificados fenotipicamente como fermentadores de lactose e 18 como não fermentadores. A coloração de Gram confirmou morfologia compatível com bacilos ou cocobacilos Gram-negativos. Três isolados (B7, B11 e B12; 11,5%) apresentaram sinergismo com clavulanato, caracterizando fenótipo sugestivo de produção de ESBL. Os diâmetros dos halos obtidos no teste de disco-difusão estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Diâmetros dos halos de inibição (mm) obtidos pelo método de disco-difusão.

Código	GEN	LVX	CLO	CAZ	MER	CRO	AMC	ATM	AMO	CPM	CTX	TET
A1	23	35	28	29	33	34	*	29	X	31	29	23
A2	22	29	30	27	30	35	*	35	20	33	34	25
A3	19	29	26	25	28	29	10	29	X	27	27	25
A4	23	30	21	25	30	30	22	31	12	30	31	21
A5	20	30	25	25	30	32	X	30	X	33	33	25
A6	17	28	25	26	29	31	21	29	21	30	31	24
B1	21	29	28	28	31	34	*	31	12	35	32	27
B2	19	23	19	19	28	27	X	28	*	29	29	20
B3	17	22	24	25	26	26	16	25	6	28	22	22
B4	17	24	22	21	25	26	23	25	20	29	29	24
B5	19	29	28	28	28	26	*	28	17	32	32	24
B6	18	28	21	25	28	27	X	30	X	30	29	21
B7	23	27	15	20	23	18	19	15	13	21	21	24
B8	18	28	26	26	26	28	*	34	24	31	31	24
B9	19	26	27	24	27	28	*	30	20	31	27	23
B10	18	26	28	27	26	24	24	26	13	29	28	23
B11	21	28	18	20	23	20	18	14	X	20	18	24
B12	15	20	22	21	24	27	6	27	X	27	*	*
B13	20	30	9	20	22	17	15	10	9	19	18	19
B14	19	25	6	19	24	17	17	14	6	19	15	20
B15	19	28	25	29	29	30	*	28	18	34	28	25
B16	18	31	28	28	30	29	*	32	34	34	33	24
B17	18	30	12	17	22	23	12	11	*	22	21	21
B18	18	26	23	28	32	30	10	29	6	32	29	23
B19	21	28	X	17	24	14	11	6	11	16	19	20
B20	21	27	17	15	24	17	15	11	X	17	16	20
E.C	18	*	21	28	30	28	*	28	20	29	31	25
K. P	18	29	21	22	28	27	X	30	X	30	29	22

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Nota: X = ausência de zona de inibição além do diâmetro do disco; * = medida não obtida; *E. coli* ATCC 25922 (E.C.); *K. pneumoniae* ATCC 700603 (K.P.).

Considerando exclusivamente a categoria resistente (R), quatro isolados (B13, B14, B17 e B19; 15,4%) apresentaram resistência a pelo menos um agente em três ou mais classes. Pela definição padronizada de MDR, que considera a não suscetibilidade (I ou R), nove isolados (B3, B7, B11, B12, B13, B14, B17, B19 e B20; 34,6%) foram classificados como multidroga-resistentes. Esse resultado demonstra que mais de um terço da população bacteriana avaliada apresentou redução de suscetibilidade envolvendo múltiplas classes de antimicrobianos.

A identificação por MALDI-TOF/MS foi obtida para todos os 26 isolados (100%). *Acinetobacter* foi o gênero mais representado (n = 7; 26,92% dos isolados identificados), incluindo *A. pittii* (n = 4), *A. vivianii* (n = 2) e *A. baumannii* (n = 1). *Escherichia coli* e *Yokenella regensburgei* foram identificadas em cinco isolados cada, seguidas por *Enterobacter asburiae* e *Citrobacter freundii* (três isolados cada), além de *Leclercia adecarboxylata*, *Raoultella ornithinolytica* e *Enterobacter kobei* (um isolado cada). Entre os fermentadores de lactose, a resistência foi mais frequente para amoxicilina (4/8; 50%), seguida de amoxicilina/ácido clavulânico (2/8; 25%) e cefotaxima (1/8; 12,5%). Entre os não fermentadores de lactose, destacaram-se resistência à amoxicilina (12/18; 66,7%), aztreonam (7/18; 38,9%), amoxicilina/ácido clavulânico (6/18; 33,3%) e cloranfenicol (4/18; 22,2%). Todos os isolados foram classificados como suscetíveis ao meropenem e à gentamicina segundo os critérios interpretativos adotados.

Discussão

Os resultados evidenciaram uma comunidade cultivável de bacilos Gram-negativos taxonomicamente diversa nos solos de cafezais avaliados. *Acinetobacter* foi o gênero mais frequente,

enquanto *Escherichia coli*, *Yokenella regensburgei*, *Enterobacter asburiae*, *Citrobacter freundii*, *Leclercia adecarboxylata*, *Raoultella ornithinolytica* e *Enterobacter kobei* demonstraram a coexistência de táxons de ampla distribuição ambiental e de espécies associadas ao trato gastrointestinal (François *et al.*, 2021; Hajjar *et al.*, 2020; Marsh *et al.*, 2020; Emery *et al.*, 2022; Colangelo *et al.*, 2023). Esse perfil é particularmente relevante em propriedades com histórico de fertilização com esterco, uma vez que resíduos de origem animal podem modificar a composição da microbiota do solo e introduzir microrganismos de origem entérica (Black *et al.*, 2021).

O achado de maior impacto foi a identificação de nove isolados MDR, correspondendo a 34,6% da população avaliada. A resistência concentrou-se principalmente em β-lactâmicos, com destaque para amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico e aztreonam, demonstrando que bactérias recuperadas do solo agrícola podem apresentar fenótipos de não suscetibilidade a diferentes classes de antimicrobianos de importância clínica. Resultados semelhantes têm sido descritos em solos agrícolas submetidos a diferentes práticas de fertilização (Mothé *et al.*, 2025; Ransirini *et al.*, 2025; Dare *et al.*, 2026), reforçando o ambiente agrícola como compartimento relevante para a vigilância da RAM.

A diferença entre os quatro isolados que apresentaram resistência categórica a agentes de pelo menos três classes e os nove classificados como MDR demonstra a importância da definição de Magiorakos *et al.* (2012), que incorpora a categoria intermediária ao conceito de não suscetibilidade. A aplicação desse critério ampliou a detecção de perfis com redução de suscetibilidade de 15,4% para 34,6%, evitando a subestimação de fenótipos que envolvem múltiplas classes antimicrobianas. Esse aspecto é especialmente importante em estudos ambientais, nos quais a vigilância busca reconhecer precocemente populações bacterianas com alterações de suscetibilidade.

Além da multirresistência, três isolados (11,5%) apresentaram sinergismo com clavulanato compatível com fenótipo sugestivo de produção de ESBL. A detecção desses perfis em bactérias oriundas de solo agrícola amplia a relevância do achado, uma vez que ESBL está associada à redução de suscetibilidade a cefalosporinas de amplo espectro e constitui um importante mecanismo de resistência. A associação, no mesmo conjunto de isolados, entre MDR e fenótipos sugestivos de ESBL reforça a necessidade de incluir solos agrícolas em estratégias de vigilância ambiental da RAM sob a perspectiva da Saúde Única.

Por outro lado, a suscetibilidade observada ao meropenem e à gentamicina em todos os isolados representa um achado positivo, especialmente considerando a importância terapêutica dessas classes e a prioridade atribuída à resistência aos carbapenêmicos (Simner *et al.*, 2024; WHO, 2024). Em conjunto, os resultados demonstram a coexistência de fenótipos de resistência relevantes e preservação da atividade de antimicrobianos importantes, fornecendo uma caracterização útil do cenário local. A confirmação molecular dos principais fenótipos identificados constitui uma etapa complementar capaz de aprofundar a caracterização dos mecanismos envolvidos.

Conclusão

O estudo evidenciou que solos de cafezais podem abrigar uma população diversificada de bactérias Gram-negativas com fenótipos de resistência de relevância sanitária. A identificação taxonômica alcançou 100% dos isolados, com predominância de *Acinetobacter* e presença de espécies de interesse em Saúde Única. Nove isolados (34,6%) foram classificados como MDR e três (11,5%) apresentaram fenótipo sugestivo de produção de ESBL, demonstrando a ocorrência de perfis de resistência a múltiplas classes no ambiente agrícola. Em contraste, todos os isolados mantiveram suscetibilidade ao meropenem e à gentamicina. Esses achados fortalecem a compreensão do solo agrícola como reservatório ambiental de bactérias resistentes e sustentam a importância do monitoramento da RAM em sistemas de produção cafeeira, integrado às estratégias de Saúde Única.

Referências

BHAT, B. A. *et al.* Integrons in the development of antimicrobial resistance: critical review and perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 1231938, 2023. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1231938. Disponível em: https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1231938/full. Acesso em: 02 ago. 2026.

BLACK, Z. *et al.* The fate of foodborne pathogens in manure treated soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 781357, 2021. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.781357. Disponível em: https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.781357/full. Acesso em: 02 ago. 2026.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 35. ed. Wayne: CLSI, 2025. (CLSI supplement M100). Disponível em: https://clsi.org/shop/standards/m100/. Acesso em: 04 ago. 2026.

COLANGELO, C. *et al.* A rare case of multidrug-resistant *Leclercia adecarboxylata* catheter-related bloodstream infection and an updated brief literature review. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, e2023052, 2023. DOI: https://doi.org/10.4084/MJHID.2023.052. Disponível em: https://www.mjhid.org/index.php/mjhid/article/view/5429. Acesso em: 12 ago. 2026.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de café**. Brasília: CONAB, 2023. Disponível em: https://www.conab.gov.br/. Acesso em: 18 ago. 2026.

DARE, A. P. *et al.* Detection of biofilm formation and antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Burkholderia* sp. isolated from agricultural soil. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 50, 73, 2026. DOI: https://doi.org/10.1186/s42269-026-01463-2. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1186/s42269-026-01463-2. Acesso em: 12 ago. 2026.

EMERY, B.; FULLERTON, H.; BOSSAK, B. Resistance on the rise: assessment of antibiotic-resistant indicator organisms in Shem Creek, Charleston, South Carolina. **Dialogues in Health**, v. 1, 100063, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.dialog.2022.100063. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772653322000636?via%3Dihub. Acesso em: 18 ago. 2026.

FRANÇOIS, C. J. *et al.* Draft genome sequence of *Enterobacter asburiae* NCR1, a plant growth-promoting rhizobacterium isolated from a cadmium-contaminated environment. **Microbiology Resource Announcements**, v. 10, n. 35, e00478-21, 2021. DOI: https://doi.org/10.1128/MRA.00478-21. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/10.1128/mra.00478-21. Acesso em: 15 ago. 2026.

HAJJAR, R. *et al. Raoultella ornithinolytica*: emergence and resistance. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1091-1104, 2020. DOI: https://doi.org/10.2147/idr.s191387. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32346300/. Acesso em: 15 ago. 2026.

HAN, B. *et al.* The source, fate and prospect of antibiotic resistance genes in soil: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 976657, 2022. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.976657. Disponível em: https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.976657/full. Acesso em: 02 ago. 2026.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Disponível em: https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.org/article/S1198-743X(14)61632-3/fulltext. Acesso em: 04 ago. 2026.

MARSH, A. J. *et al.* Genome sequence of *Citrobacter freundii* AMC0703, isolated from the intestinal lumen of an 11-year-old organ donor. **Microbiology Resource Announcements**, v. 9, n. 46, e00994-20, 2020. DOI: https://doi.org/10.1128/MRA.00994-20. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/10.1128/mra.00994-20. Acesso em: 04 ago. 2026.

MOTHÉ, D. A. C. *et al.* Antimicrobial-resistant bacteria in environmental samples from a rural district focused on large-scale agricultural production. **Tropical Medicine & International Health**, v. 30, n.

12, p. 1269-1282, 2025. DOI: https://doi.org/10.1111/tmi.70033. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tmi.70033. Acesso em: 08 ago. 2026.

RANSIRINI, A. M. *et al.* Aged Turkey manure shapes microbial diversity and antibiotic resistance genes in soil and plants under fertilization. **Scientific Reports**, v. 15, 20463, 2025. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-025-05110-0. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41598-025-05110-0. Acesso em: 08 ago. 2026.

SHAWVER, S. *et al.* Application of manure from cattle administered antibiotics has sustained multi-year impacts on soil resistome and microbial community structure. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 157, 108252, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108252. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071721001255?via%3Dihub. Acesso em: 20 ago. 2026.

SIMNER, P. J.; PITOUT, J. D. D.; DINGLE, T. C. Laboratory detection of carbapenemases among Gram-negative organisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 37, n. 4, e00054-22, 2024. DOI: https://doi.org/10.1128/cmr.00054-22. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00054-22. Acesso em: 20 ago. 2026.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance**. Geneva: WHO, 2024. Disponível em: https://iris.who.int/. Acesso em: 6 ago. 2026.

ZHAO, Y. *et al.* Global soil antibiotic resistance genes are associated with increasing risk and connectivity to human resistome. **Nature Communications**, v. 16, 61606, 2025. DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-025-61606-3. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41467-025-61606-3. Acesso em: 25 ago. 2026.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores ainda agradecem ao Grupo Aplicado em Microbiologia (GraM) pelo apoio à realização deste trabalho.