RESPOSTA *IN VITRO* A BIOCIDAS DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE SOLOS DE CAFEICULTURA

Pedro Henrique de Almeida Satil Gonçalves[1], Bernardo Aparecido Buqueroni M ateini[1], Cleveland Soriano Neto[1], Rodrigo Cayô da Silva[2], Mariana Drummond C osta 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, almeidahsg@gmail.com, mateininado@gmail.com, csorianoneto@gmail.com, mariana.ignacchiti@ufes.br, juliana. resende@ufes.br.
[2]Universidade Federal de São Paulo/Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Rua São Nicolau, 210, Centro – 09913-030 – Diadema-SP, Brasil, rodrigo.silva@unifesp.br.

Resumo
Este estudo caracterizou a resposta *in vitro* a biocidas de bactérias Gram-negativas recuperadas de s olos de cafeicultura após seleção em Ágar MacConkey. Dos 74 isolados submetidos à identificação p or MALDI-TOF/MS, 68 apresentaram identificação confiável em nível de gênero e/ou espécie, com predominância de Enterobacterales. A resposta ao peróxido de hidrogênio 3%, digluconato de clorexidina 2%, hipoclorito de sódio 2% e iodopovidona 10% foi avaliada por disco-difusão. Para cada agente, os isolados ambientais foram comparados às linhagens-padrão ATCC submetidas às mesmas condições experimentais, estabelecendo um referencial fenotípico reprodutível. Não foram detectadas diferenças significativas para clorexidina e peróxido de hidrogênio ($p > 0,05$), enquanto hipoclorito de sódio ($p < 0,05$) e iodopovidona ($p < 0,01$) apresentaram diferenças. Os resultados caracterizam a resposta fenotípica dos isolados e reforçam a relevância do monitoramento de bactérias ambientais frente a biocidas no contexto da Saúde Única.

Palavras-chave: Biocidas. Cafeicultura. Bactérias Gram-negativas. MALDI-TOF/MS. Saúde Única.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Farmácia.

Introdução

A cafeicultura constitui uma atividade de grande importância econômica e social para o Brasil. No Espírito Santo, a atividade é responsável por cerca de 400 mil empregos diretos e indiretos, estando presente em aproximadamente 60 mil das 90 mil propriedades agrícolas do estado, que se destaca c omo o segundo maior produtor de café do Brasil (Incaper, s.d.).

Diante dessa relevância econômica e social, torna-se importante compreender os impactos ambientais e sanitários associados às práticas de manejo adotadas na cafeicultura. Entre essas práticas, destaca-se o uso de fertilizantes orgânicos de origem animal. A aplicação de esterco e outros resíduos animais, especialmente quando realizada sem tratamento ou manejo adequado, pode introduzir no sistema solo-água resíduos de antimicrobianos, bactérias resistentes e genes de resistência a antimicrobianos (ARGs), favorecendo a manutenção e a disseminação da resistência no ambiente agrícola (Checcucci *et al.*, 2020).

Além dos antimicrobianos, agentes biocidas utilizados em processos de higienização e desinfecção podem exercer pressões seletivas sobre populações bacterianas, tornando relevante a avaliação de r espostas fenotípicas a esses compostos no ambiente. Estudos com enterobactérias provenientes de sistemas associados à produção animal têm demonstrado variação na resposta a biocidas e reforçado a necessidade de integrar esse monitoramento à vigilância da resistência aos antimicrobianos (Jones; Joshi, 2021; Menezes *et al.*, 2024). No contexto da Saúde Única, a caracterização de bactérias cultiváveis recuperadas de solos agrícolas pode contribuir para a vigilância de microrganismos de interesse ambiental e sanitário (Miller; Ferreira; Lejeune, 2022). Diante disso, este estudo teve como o bjetivo caracterizar bactérias Gram-negativas recuperadas de solos de áreas cafeeiras e avaliar sua r esposta *in vitro* a diferentes biocidas.

Metodologia

Foram coletadas amostras de solo (50 g, a 15 cm de profundidade) em cinco propriedades cafeeiras com históricos de adubação com esterco animal, localizadas no município de Alegre (ES). Os pontos/matrizes de coleta abrangeram área com maior aporte de matéria orgânica próxima aos cafeeiros, rizosfera (a 15 cm do caule), borda da lavoura e adubo. As amostras foram transportadas s ob refrigeração e processadas em laboratório em até 24 horas. Para o enriquecimento não seletivo, alíquotas de 25 g foram homogeneizadas em 225 mL de caldo nutriente e incubadas em *shaker* de bancada a 37 °C por 24 horas, sob agitação de 150 rpm.

Após o enriquecimento, as suspensões foram semeadas em placas de Ágar MacConkey e incubadas a 37 °C por 24 horas. As colônias obtidas foram subcultivadas em *CHROMagar™ Orientation* (BD, Maryland, EUA) e incubadas nas mesmas condições para triagem morfológica presuntiva. Colônias representativas foram purificadas por repiques sucessivos e confirmadas como b actérias Gram-negativas pela coloração de Gram. Os isolados puros foram criopreservados em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) acrescido de 20% (v/v) de glicerol e mantidos a -80 °C.

A caracterização taxonômica dos isolados bacterianos 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). Para a interpretação dos *scores* de identificação, foram adotados os seguintes parâmetros: *score* ≥ 2,0, correspondente à identificação confiável em nível de espécie; *score* entre 1,7 e 1,99, correspondente à identificação em nível de gênero e *score* < 1,7, considerado não confiável. Os isolados com *score* < 1,7 foram excluídos das análises subsequentes.

A resposta dos isolados aos biocidas foi avaliada por disco-difusão, adotando-se, com adaptações, princípios de padronização descritos por Menezes *et al.* (2024) para preparo do inóculo, meio de cultura e condições de incubação. Foram testados peróxido de hidrogênio 3%, iodopovidona 10%, hipoclorito de sódio 2% e digluconato de clorexidina 2%. Suspensões bacterianas obtidas a partir de culturas em Ágar BHI foram padronizadas em solução salina estéril (NaCl 0,9%) até turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Os inóculos foram semeados em Ágar Mueller-Hinton. Sobre o meio, foram depositados discos de papel estéril (*Whatman*, 6 mm de diâmetro) impregnados com 5 µL de cada biocida. Após incubação a 35 °C por 24 horas, os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados em milímetros. Foram utilizadas como linhagens de referência *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Como a difusão no ágar varia entre compostos, os diâmetros dos halos não foram empregados para comparar a atividade entre os biocidas distintos. Para cada biocida, contudo, os isolados ambientais e as linhagens ATCC foram submetidos às mesmas condições de concentração, volume aplicado, meio, inóculo, incubação e leitura, permitindo a comparação intraagente dos halos c omo referencial fenotípico experimental.

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Considerando a distribuição não normal observada na maioria dos grupos ($p < 0,05$), foram empregados testes não paramétricos. Para cada biocida, os diâmetros dos halos dos isolados ambientais foram comparados ao respectivo referencial obtido com as linhagens-padrão ATCC pelo teste de Wilcoxon para uma amostra. Para avaliar possíveis diferenças na resposta aos biocidas entre as propriedades de origem ou entre as matrizes de isolamento, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis às medianas dos halos de cada isolado. O *software* R versão 4.5.3 foi utilizado em todas as análises, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os gráficos foram elaborados com o pacote *ggplot2*.

Resultados

Dos 74 isolados submetidos à identificação por MALDI-TOF/MS, 68 apresentaram *scores* compatíveis com identificação confiável, dos quais 52 foram identificados em nível de espécie e 16 em nível de gênero. Foram reconhecidas 16 espécies distribuídas em três ordens (Tabela 1). Considerando que o isolamento foi precedido por cultivo em Ágar MacConkey, os isolados representam uma fração cultivável previamente selecionada pela capacidade de crescimento nesse meio. Enterobacterales foi a ordem mais representativa, correspondendo a 80,9% dos isolados (n = 55), seguida por Moraxellales (n = 12; 17,6%) e Lysobacterales (n = 1; 1,5%). Entre as espécies identificadas, destacaram-se *Citrobacter freundii* (n = 11; 16,2%), *Enterobacter asburiae* (n = 9; 13,2%), *Escherichia coli* (n = 7; 10, 3%) e *Yokenella regensburgei* (n = 3; 4,4%). Moraxellales foi representada exclusivamente pelo gênero

Acinetobacter spp. (n = 12; 17,6%), enquanto Lysobacterales foi representada por um isolado de *Stenotrophomonas* sp. (n = 1; 1,5%).

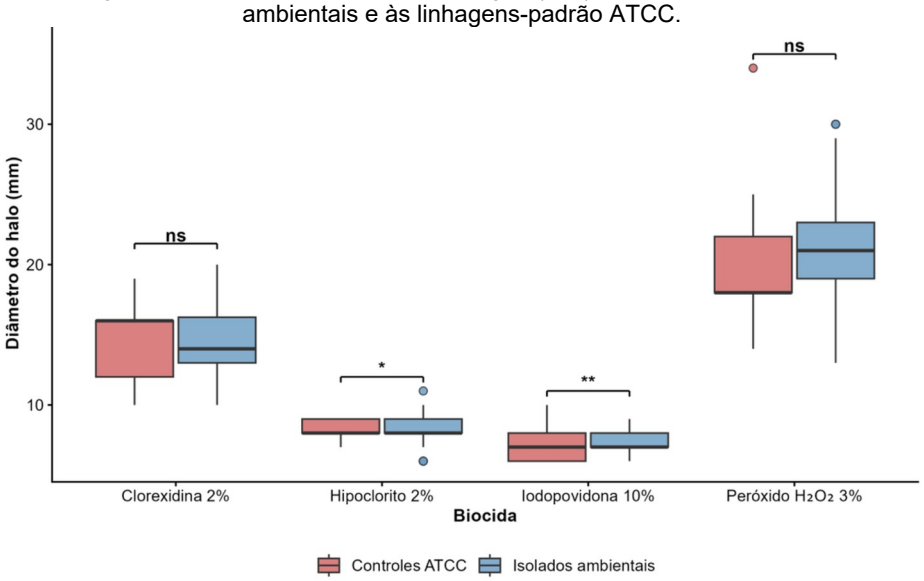
Tabela 1 - Identificação taxonômica por MALDI-TOF/MS e frequências absoluta (n) e relativa (%) dos isolados bacterianos recuperados de solos de cafeicultura (n = 68).

Ordem	**Táxon identificado**	**n**	**%**
Enterobacterales	*Citrobacter freundii*	11	16,2
	Enterobacter asburiae	9	13,2
	Escherichia coli	7	10,3
	Enterobacter sp.	5	7,4
	Yokenella regensburgei	3	4,4
	Yokenella sp.	4	5,9
	Citrobacter braakii	2	2,9
	Klebsiella aerogenes	2	2,9
	Klebsiella pneumoniae	2	2,9
	Leclercia adecarboxylata	2	2,9
	Leclercia sp.	2	2,9
	Serratia marcescens	2	2,9
	Enterobacter bugandensis	1	1,5
	Enterobacter kobei	1	1,5
	Klebsiella variicola	1	1,5
	Raoultella sp.	1	1,5
	Subtotal	**55**	**80,9**
Moraxellales	*Acinetobacter pittii*	5	7,4
	Acinetobacter baumannii	2	2,9
	Acinetobacter sp.	3	4,4
	Acinetobacter seifertii	1	1,5
	Acinetobacter soli	1	1,5
	Subtotal	**12**	**17,6**
Lysobacterales	*Stenotrophomonas sp.*	1	1,5
	Subtotal	**1**	**1,5**
	Total	**68**	**100**

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Os diâmetros dos halos variaram conforme o biocida avaliado; descritivamente, os maiores valores entre os isolados ambientais foram observados para o peróxido de hidrogênio 3%, seguido da clorexidina 2%, enquanto hipoclorito de sódio 2% e iodopovidona 10% apresentaram menores valores. Essas diferenças não foram utilizadas para inferir maior ou menor potencial de inibição entre os compostos, devido às diferenças de difusão no ágar. Na comparação intraagente entre os isolados a mbientais e as linhagens de referência ATCC, não foram detectadas diferenças significativas para clorexidina 2% e peróxido de hidrogênio 3% ($p > 0,05$). Para hipoclorito de sódio 2% ($p < 0,05$) e iodopovidona 10% ($p < 0,01$), foram observadas diferenças significativas entre os isolados e o referencial ATCC (Figura 1).

Figura 1 – Distribuição dos diâmetros dos halos de inibição (mm) produzidos por biocidas frente aos isolados ambientais e às linhagens-padrão ATCC.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.
Nota: ns = não significativo ($p > 0,05$); * = significativo ($p \leq 0,05$); ** = altamente significativo ($p \leq 0,01$).

Adicionalmente, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos diâmetros dos halos de inibição entre os isolados provenientes das quatro propriedades incluídas na análise comparativa ($p = 0,31$), nem entre as diferentes matrizes de coleta ($p = 0,61$).

Discussão

A diversidade taxonômica observada entre os 68 isolados é compatível com a heterogeneidade descrita para solos agrícolas, cujas comunidades bacterianas podem ser influenciadas pelo uso da terra, pelo manejo e pela fertilização (Lee *et al.*, 2020). Entretanto, os isolados deste estudo representam apenas a fração cultivável capaz de crescer nas condições empregadas. O uso de Ágar MacConkey introduziu um viés de seleção para bactérias Gram-negativas, especialmente Enterobacterales, devendo esse aspecto ser considerado na interpretação da diversidade recuperada.

A identificação por MALDI-TOF/MS evidenciou táxons de ampla distribuição ambiental e outros de interesse sanitário. *Acinetobacter* spp. e *Stenotrophomonas* sp., bem como *Enterobacter asburiae* e *Citrobacter* spp., incluem linhagens já descritas em associação com a rizosfera e com características promotoras do crescimento vegetal (Saikia *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2024; Diwan *et al.*, 2025). Por outro lado, a recuperação de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. merece atenção por sua associação frequente com fontes fecais e por seu interesse em Saúde Única. Contudo, a presença desses táxons não permite atribuir sua origem diretamente à fertilização com esterco, pois o estudo não realizou rastreamento de fonte nem demonstrou associação entre o tipo de adubação e a ocorrência dos diferentes táxons. Assim os achados devem ser interpretados como evidência da presença de bactérias de interesse ambiental e sanitário na fração cultivável analisada, e não como demonstração de introdução causal pelo adubo animal.

Os diferentes diâmetros de halo observados devem ser interpretados considerando a dependência da difusão em disco das propriedades físico-químicas de cada composto. O peróxido de hidrogênio atua principalmente por estresse oxidativo, enquanto hipoclorito e iodopovidona exercem ação oxidante por mecanismos distintos; a clorexidina, por sua vez, interage com componentes da membrana celular (Jones; Joshi, 2021; Babalska; Korbecka-Paczkowska; Karpiński, 2021; Cieplik *et al.*, 2019). Assim, h alos obtidos com moléculas diferentes não constituem uma medida direta de eficácia comparativa entre biocidas, pois taxa de difusão, tamanho molecular e características da formulação interferem na zona de inibição. Por outro lado, a comparação é informativa quando realizada dentro de um mesmo biocida, mantendo constantes concentração, volume impregnado, meio, densidade do inóculo, incubação e leitura. Nessas condições, as linhagens-padrão ATCC funcionam como referencial experimental, permitindo avaliar se a distribuição dos halos dos isolados ambientais se afasta daquela observada p

ara controles processados sob o mesmo protocolo e favorecendo a reprodutibilidade entre estudos. A relevância de avaliar a resposta de enterobactérias ambientais a biocidas também é evidenciada por Menezes *et al.* (2024), que observaram variação nos perfis de resistência a biocidas em isolados provenientes da digestão anaeróbia de águas residuárias da bovinocultura.

A ausência de diferenças entre propriedades e matrizes de coleta indica que, nas condições e no t amanho amostral avaliados, não foi detectada associação entre a origem dos isolados e os diâmetros dos halos. Esse resultado deve ser interpretado com cautela, sobretudo porque o delineamento não f oi estruturado para estabelecer causalidade entre o tipo de fertilização e a resposta aos biocidas. Em outro contexto agrícola, Sukhum *et al.* (2021) observaram que comunidades de solo permaneceram taxonomicamente e funcionalmente distintas das comunidades de esterco após a aplicação do fertilizante, evidenciando que os efeitos do manejo sobre a microbiota e o resistoma dependem do sistema avaliado. No presente estudo, a comparação entre isolados ambientais e linhagens ATCC foi realizada separadamente para cada biocida e sob condições experimentais equivalentes, fornecendo um referencial fenotípico para interpretação dos halos. Entretanto, como não existem pontos de corte padronizados para esses agentes nas condições testadas, diferenças ou semelhanças em relação às linhagens de referência não devem ser convertidas diretamente em categorias de resistência ou suscetibilidade, nem utilizadas isoladamente para inferir mecanismos moleculares de resistência (Eldahshan *et al.*, 2026).

Entre as limitações do estudo, destaca-se a perda de isolados em estoque da Propriedade 4, da q ual apenas um isolado permaneceu viável; por esse motivo, essa propriedade foi excluída das análises comparativas. O número reduzido de isolados por táxon também impediu comparações estatísticas p or espécie. Além disso, embora a técnica de disco-difusão permita comparações intraagente quando as condições experimentais são mantidas constantes, não há pontos de corte validados para classificar resistência ou suscetibilidade aos biocidas avaliados, não sendo apropriada para comparar diretamente a eficácia de compostos distintos. Assim, os resultados devem ser interpretados como uma caracterização fenotípica comparativa dos diâmetros de inibição nas condições experimentais adotadas

Conclusão

Foram recuperadas bactérias Gram-negativas taxonomicamente diversas de solos de cafeicultura, com predomínio de Enterobacterales. Na comparação realizada separadamente para cada biocida, o s isolados ambientais apresentaram diâmetros de halo semelhantes aos das linhagens ATCC para clorexidina 2% e peróxido de hidrogênio 3% ($p > 0,05$), enquanto diferenças foram detectadas para hipoclorito de sódio 2% ($p < 0,05$) e iodopovidona 10% ($p < 0,01$). Considerando que a difusão no ágar difere entre compostos, esses resultados não permitem estabelecer uma hierarquia de eficácia entre os biocidas. Entretanto, a utilização de linhagens-padrão processadas sob as mesmas condições fornece um referencial reprodutível para a avaliação intraagente da resposta fenotípica dos isolados. Os achados reforçam a relevância da vigilância de bactérias ambientais frente a agentes biocidas no contexto da Saúde Única.

Referências

BABALSKA, Z. Ł.; KORBECKA-PACZKOWSKA, M.; KARPIŃSKI, T. M. Wound antiseptics and European guidelines for antiseptic application in wound treatment. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 12, 1253, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/ph14121253.

CHECCUCCI, A. *et al*. Exploring the animal waste resistome: the spread of antimicrobial resistance genes through the use of livestock manure. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 1416, 2020. DOI: https: //doi.org/10.3389/fmicb.2020.01416.

CIEPLIK, F. *et al*. Resistance toward chlorhexidine in oral bacteria - is there cause for concern? **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 587, 2019. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00587.

DIWAN, J. R. *et al*. Genome characterization of *Acinetobacter* species from the rice rhizosphere: a potential plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). **Current Genetics**, v. 71, 27, 2025. DOI: https: //doi.org/10.1007/s00294-025-01330-z.

ELDAHSHAN, M. M. *et al*. Cationic biocide susceptibility and tolerance-associated genes in clinical, environmental, and commensal *Enterococcus* isolates. **Scientific Reports**, v. 16, 15063, 2026. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-026-51663-z.

HUANG, L.; CHEN, Y.; WANG, X. *Yokenella regensburgei* infection in an immunocompetent patient. **Clinical Laboratory**, v. 70, n. 3, 2024. DOI: https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2023.230916.

INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL (INCAPER). **Cafeicultura**. [S. l.], [20--]. Disponível em: https://incaper.es.gov.br/cafeicultura. Acesso em: 11 ago. 2026.

JONES, I. A.; JOSHI, L. T. Biocide use in the antimicrobial era: a review. **Molecules**, v. 26, n. 8, 2276, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules26082276.

LEE, S. A. *et al*. Different types of agricultural land use drive distinct soil bacterial communities. **Scientific Reports**, v. 10, 17418, 2020. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-020-74193-8.

MENEZES, K. V. *et al*. Enterobacteria in anaerobic digestion of dairy cattle wastewater: assessing virulence and resistance for One Health security. **Water Research**, v. 252, 121192, 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121192.

MICHELON, W. *et al*. Enterobacteria survival, percolation, and leaching on soil fertilized with swine manure. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 7, 5283, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/ijerph20075283.

MILLER, S. A.; FERREIRA, J. P.; LEJEUNE, J. T. Antimicrobial use and resistance in plant agriculture: a One Health perspective. **Agriculture**, v. 12, n. 2, 289, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/agriculture12020289.

SAIKIA, J. *et al*. De novo genomic analysis of *Enterobacter asburiae* EBRJ12, a plant growth-promoting rhizobacterium isolated from the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Applied Microbiology**, v. 134, n. 2, lxac090, 2023. DOI: https://doi.org/10.1093/jambio/lxac090.

SUKHUM, K. V. *et al*. Manure microbial communities and resistance profiles reconfigure after transition to manure pits and differ from those in fertilized field soil. **mBio**, v. 12, n. 3, e00798-21, 2021. DOI: https://doi.org/10.1128/mbio.00798-21.

ZHAO, Y. *et al*. A comprehensive comparative genomic analysis revealed that plant growth promoting traits are ubiquitous in strains of *Stenotrophomonas*. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 1395477, 2024. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1395477.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da 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.