

CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO SOLO: AVALIAÇÃO DO DECAIMENTO DE *Escherichia coli* EM PLANOSSOLO HÁPLICO NO SEMIÁRIDO PARAIBANO

George Rodrigues Lambais¹
Eulália Margarethe da Costa Melo²
Érica Olandini Lambais³
Maria Andressa Nicácio de Lima⁴
Salomão de Sousa Medeiros⁵

INTRODUÇÃO

A prática do reúso de água tem se mostrado uma alternativa promissora como estratégia de convivência com a escassez hídrica na produção agrícola do semiárido brasileiro, principalmente em propriedades rurais de pequeno e médio porte dessa região. Entretanto, a utilização de esgotos domésticos na agricultura pode apresentar riscos à saúde pública e/ou ambientais caso não seja adotado um sistema de tratamento e manejo sanitário adequado. Diante disso, um dos principais fatores a serem estudados é o tempo de permanência da bactéria *Escherichia coli* (indicador de contaminação fecal) em solos irrigados com esse tipo de água. O presente estudo teve por objetivo avaliar o decaimento de *E. coli* em um tipo de solo do semiárido brasileiro. Para avaliação da cinética de decaimento bacteriano no solo foram utilizadas colônias de *E. coli*, isoladas de um sistema de tratamento de esgoto em operação no Instituto Nacional do Semiárido (INSA/MCTIC). Através das técnicas de plaqueamento e cultivo da bactéria alvo em laboratório, foi possível obter uma solução líquida com a concentração de *E. coli* em torno de $3,7 \times 10^9$ UFC mL⁻¹. Essa suspensão bacteriana foi utilizada para inocular a população de bactérias no solo a ser estudado. A persistência das bactérias no solo foi determinada com a realização de contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) pelo método da diluição em série e incubados em placas. As coletas de solo para análises foram realizadas nos seguintes tempos: T0 (dia da inoculação); T1 (3 dias após a inoculação = DAI); T2 (6 DAI); T3 (9 DAI) e T4 (27 DAI). A concentração inicial de *E. coli* no solo foi de $1,1 \times 10^9$ UFC g⁻¹, com o seguinte decaimento: $2,8 \times 10^8$ UFC g⁻¹ aos 3 DAI, $8,1 \times 10^7$ UFC g⁻¹ aos 6 DAI, $3,0 \times 10^6$ UFC g⁻¹ aos 9 DAI e $1,3 \times 10^2$ UFC g⁻¹ aos 27 DAI. Sendo assim, entre o início e o fim do experimento houve um decréscimo de 7 unidades log e a taxa de decaimento foi de $0,6$ d⁻¹. Um mês após a contaminação do solo, a concentração de *E. coli* encontrada foi baixa, demonstrando a velocidade de inativação dessa bactéria para esse tipo de solo avaliado. Entretanto, sugere-se que trabalhos futuros sejam realizados em condições de campo e com outros tipos de solos encontrados nessa região.

¹ Pesquisador do Núcleo de Recursos Hídricos do Instituto Nacional do Semiárido – INSA/MCTIC, george.lambais@insa.gov.br;

² Graduanda do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, eulaliameo91@gmail.com;

³ Pesquisadora do Núcleo de Solos e Mineralogia do Instituto Nacional do Semiárido – INSA/MCTIC, erica.lambais@insa.gov.br;

⁴ Graduanda do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, andressa-bio2015.2@hotmail.com;

⁵ Pesquisador do Núcleo de Recursos Hídricos do Instituto Nacional do Semiárido – INSA/MCTIC, salomao.medeiros@insa.gov.br

DESENVOLVIMENTO

Segundo dados do Instituto Trata Brasil (2019), o subsolo brasileiro recebe uma carga anual de esgoto em torno 4,3 milhões de m³, que corresponde à soma do esgoto vindo da falta de redes de coleta e de vazamentos por falta de manutenção. A produção de esgoto bruto no Semiárido brasileiro (SAB) alcançou a marca de 423 milhões de m³/ano, onde cerca 72% desse valor não é coletado (MEDEIROS et al., 2014). Grande parte desses efluentes domésticos vem sendo utilizados na agricultura em zonas rurais e periurbanas do SAB. Entretanto, em muitos casos, a prática do reúso agrícola é realizada de maneira inadequada, como por exemplo, a utilização de esgotos domésticos sem tratamento. Esses efluentes líquidos não tratados, quando lançados no ambiente, podem comprometer gravemente a saúde pública e o ecossistema por conterem diversos tipos de microrganismos patogênicos. Para obter informações sobre os níveis de contaminação de uma determinada matriz (água, solo ou vegetais), onde ocorre esse tipo de prática, é necessário que haja um monitoramento microbiológico de organismos patógenos presentes na amostra a ser investigada.

Para o monitoramento desses agentes patogênicos no ambiente são utilizados microrganismos indicadores de contaminação, onde são utilizados critérios que selecionam grupos ou espécies que quando se encontram presentes, fornecem informações sobre a contaminação de origem fecal por serem encontrados no conteúdo intestinal do homem e animais homeotérmicos. Os indicadores bacteriológicos utilizados para esse tipo de monitoramento pertencem ao grupo dos Enterococcus e Enterobacteriaceae, onde os coliformes termotolerantes são os mais utilizados. A *E. coli* é a única espécie termotolerante cujo habitat exclusivo é o intestino humano e de animais homeotérmicos, com concentrações elevadas, sendo considerada o mais específico indicador de contaminação fecal e de possível existência de outros organismos patogênicos, conforme descrito nas legislações vigentes no país (ANVISA, 2004; CONAMA, 2005).

A presença dessa classe de bactérias em amostras ambientais indica a qualidade sanitária do solo, água e/ou vegetais. Muitos pesquisadores têm avaliado a sobrevivência de *E. coli* em diferentes ambientes, incluindo água salgada, doce, sedimentos aquáticos, e principalmente nos solos (TOOP et al., 2003; ISHII & SADOWSKY, 2008; SEMENOV et al., 2008; OVERBEEK et al., 2010). As características desfavoráveis, encontradas fora do trato digestivo de animais homeotérmicos, tendem a diminuir o tempo de permanência dessas bactérias fecais no ambiente, entretanto, algumas estirpes podem sobreviver por períodos relativamente longos diante dessas condições (FENLON et al., 2002; YAO et al., 2013). Uma vez que misturada ao solo, a *E. coli* pode permanecer viável por vários meses (JONES, 1999). Estudos demonstraram que, quando depositada no solo, a *E. coli* pode sobreviver, reproduzir e movimentar-se por um período de até dois meses, possibilitando a contaminação do lençol freático por lixiviamento (ELVING, 2009).

A dinâmica de sobrevivência e transporte de *E. coli* no meio ambiente é influenciada por uma série de fenômenos complexos devido as interações dos processos que regulam essa movimentação no solo, tais como a taxa de infiltração de água, alteração nas propriedades físico-químicas, competição com bactérias nativas, fluxo de água, filtração física e retenção de células bacterianas através das partículas do solo, estirpe bacteriana e estado fisiológico das células (UNC et al., 2003; 2004; ZALESKI et al., 2005; RODRIGUES, et al., 2011), dentro outros. Assim, em condições favoráveis de pH, temperatura e nutrientes, a sobrevivência das bactérias fecais podem se estender por vários meses após a contaminação no solo.

Diante do exposto, torna-se necessário o desenvolvimento e aprimoramento de estudos com o foco de conhecimento sobre a cinética do decaimento bacteriano nos mais diversos

tipos de solo, principalmente em regiões semiáridas. Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar o decaimento de *E. coli* em um Planossolo Háptico na região do semiárido paraibano.

METODOLOGIA

O experimento foi conduzido entre os meses de Julho e Agosto de 2019, no Laboratório de Microbiologia Ambiental do INSA/MCTIC, localizado no município de Campina Grande-PB (7°16'36.8"S; 35°58'01.2"O). O solo utilizado no experimento é classificado como Planossolo Háptico eutrófico típico, com as seguintes características físico-químicas: Areia = 787 g kg⁻¹; Silte = 157 g kg⁻¹; Argila = 56 g kg⁻¹; pH = 5,7; CE = 152 μS cm⁻¹; P = 7,0 mg kg⁻¹; H+Al = 1,7 cmol_c kg⁻¹; Ca²⁺ = 1,1 cmol_c kg⁻¹; Mg²⁺ = 0,1 cmol_c kg⁻¹; Na⁺ = 0,1 cmol_c kg⁻¹; K⁺ = 0,3 cmol_c kg⁻¹ e SB = 2,1 cmol_c kg⁻¹.

A partir de amostras do sistema de tratamento de águas residuárias, instalado na sede administrativa do INSA, foi possível isolar colônias de *E. coli* para elaboração do estudo. Para melhor compreensão, o experimento será descrito em etapas, conforme detalhamento abaixo. Materiais e equipamentos utilizados no experimento foram devidamente esterelizados.

Etapa I – Identificação e isolamento bacteriano: amostras de esgoto doméstico, coletado e tratado na Instituição, são analisadas periodicamente no laboratório citado. Dessa forma, alíquotas desses efluentes foram testadas para crescimento de bactérias do grupo Coliformes e, conseqüentemente para *E. coli*. Para realizar esse procedimento, foi utilizada a técnica de plaqueamento por espalhamento em superfície (*spread plate*), onde alíquotas de 100 μL do efluente diluído foram depositadas na superfície do meio de cultura, contido em placas de Petri, e espalhadas com auxílio da alça de Drigalski. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35° C (±0,5) durante 24 horas. O Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB Levine), utilizado nessa etapa, é um meio de cultura diferencial que inibe o crescimento de bactérias gram positivas e indica se a bactéria é fermentadora ou não de lactose, onde as colônias de *E. coli* são facilmente identificáveis por apresentarem coloração verde metálico.

Etapa II – Cultivo e multiplicação bacteriana: após o período de incubação, foram isoladas colônias de *E. coli* através da alça de platina (1 μL). A colônia recuperada com a alça foi inoculada, em forma de estrias, em uma nova placa com meio EMB. As colônias que cresceram nas placas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura líquido. Utilizou-se o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) para favorecer o crescimento bacteriano. Os tubos de ensaio contendo o meio de cultura líquido e as colônias de *E. coli* foram incubados durante 48 horas a 35° C (±0,5). Ao final desse procedimento, obteve-se uma suspensão de *E. coli* em meio líquido para ser utilizada na próxima etapa.

Etapa III – Inoculação bacteriana no solo: utilizaram-se vasos de plásticos de 800 mL preenchidos com solo peneirado e esterilizado, onde foram depositadas as suspensões bacterianas, com uma densidade de *E. coli* em torno de 3,7x10⁹ UFC mL⁻¹, até atingir a capacidade campo do solo. Os vasos foram mantidos em ambiente aberto com exposição solar durante todo o experimento.

Etapa IV – Contagem de bactérias no solo: para cada avaliação foram coletados 10 gramas de solo e diluídos em 90 mL de solução salina 0,9%, seguindo o sistema de diluição seriada até 10⁻⁶. Realizou-se o plaqueamento de cada diluição em meio EMB, seguido de incubação a 35° C (±0,5) por 24 horas. As quantificações de *E. coli* no solo foram realizadas no 3°, 6°, 9° e 27° dia após a inoculação. Os valores foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de solo (UFC g⁻¹). O valor de *E. coli* no início do experimento (tempo zero) foi de 1,1x10⁹ UFC g⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível observar que após a contaminação do solo com a concentração de *E. coli* de $1,1 \times 10^9$ UFC g^{-1} , em menos de uma semana (6 DAI) houve um decréscimo 1,1 unidades log na população dessa bactéria no solo. Aos 9 DAI, a redução foi de 1,7 unidades log, em relação ao 6 DAI, chegando aos valores de $3,0 \times 10^6$ UFC g^{-1} . Aos 27 DAI a concentração de *E. coli* no solo foi de $1,3 \times 10^2$ UFC g^{-1} , onde o decréscimo foi de 6,9 unidades log em relação ao início do experimento. Através desses resultados, foi possível encontrar o valor do coeficiente de decaimento $k = 0,6 d^{-1}$. Pereira et al., (2014), avaliando a taxa de sobrevivência de *E. coli* em um Cambissolo Háptico que foi irrigado com esgoto doméstico bruto, obtiveram o valor de k na faixa de $0,7 d^{-1}$. Dessa maneira, relataram que ao final de 32 dias a concentração de *E. coli* no solo foi nula, com uma remoção de 4 unidades log no experimento. Os autores atribuíram esses resultados a ação da radiação solar (UV) no solo e, conseqüentemente exercendo um efeito nocivo às bactérias aliado aos fatores de competição e predação de bactérias nativas do solo.

Uma vez que, ao final de 27 dias após a contaminação do solo, a concentração de *E. coli* encontrada foi de $1,3 \times 10^2$ UFC g^{-1} , evidencia-se o potencial desse tipo de solo na inativação de microrganismos patogênicos. Morais et al., (2016) constataram o mesmo efeito em um Argissolo Vermelho amarelo que foi irrigado com esgoto doméstico tratado no município de Apodi-RN. Por sua vez, Souza et al., (2011) obtiveram o mesmo tipo de resposta em estudos realizados com Cambissolo Háptico em Minas Gerais. Esses autores encontraram valores de $1,96 \times 10^2$ NMP g^{-1} na camada superficial do solo irrigado com esgoto doméstico não tratado. Segundo os autores, tais resultados encontram-se abaixo do limite máximo exigido pelo MAPA (2003) para o consumo de frutas frescas, que é de $5,0 \times 10^2$ NMP g^{-1} .

Por fim, vale ressaltar que informações desse tipo podem auxiliar os agricultores que utilizam a prática do reúso agrícola. Pois, a partir de resultados como esses, é possível saber o tempo de permanência da *E. coli* no solo que recebeu uma determinada concentração de contaminante microbiológico. Sendo assim, o manejo sanitário pode ser planejado com as devidas seguranças exigidas, como por exemplo, suspender a irrigação semanas antes da colheita. Os resultados obtidos com esse trabalho refletem uma realidade de contaminação microbiológica do solo com esgoto doméstico sem nenhum tipo de tratamento. Por isso, sugere-se que para toda prática de reúso de água na agricultura seja utilizados efluentes tratados com tecnologias específicas para cada finalidade, visando diminuir a população de microrganismos patogênicos depositados no meio ambiente. Sendo assim, a concentração de bactérias patogênicas que seriam depositadas no solo irrigado com esse efluente apresentaria níveis menores e, conseqüentemente o tempo de decaimento bacteriano seria mais breve.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esses resultados podem contribuir para um melhor entendimento do tempo de permanência de bactérias patogênicas em solos da região semiárida do Brasil. Além de fornecer informações que podem ser incorporadas em planos de manejos sanitários que utilizem a prática de reúso agrícola nessa região. Entretanto, sugere-se que mais estudos sejam realizados com essa temática, visando fornecer novas informações para outros tipos de solos presentes no semiárido brasileiro.

Salienta-se a importância do tratamento de esgoto doméstico antes de sua utilização na agricultura, visando principalmente proteger à saúde dos agricultores, bem como do meio ambiente e a qualidade sanitária da produção agrícola.

Palavras-chave: Semiárido brasileiro, Poluição do solo, Coliformes, Reúso agrícola.

REFERÊNCIAS

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). 2004. Ministério da Saúde, Brasil. Resolução n° 518, 25 de março de 2004.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). 2005. Ministério do Meio Ambiente. Resolução n° 357, de 17 de março de 2005.

ELVING, J.; OTTOSON, J. R.; VINNERAS, B.; ALBIHN, A. Growth potential of faecal bacteria in simulated psychrophilic/mesophilic zones during composting of organic waste. *Journal Applied Microbiology*, v.108, p.1974-1981, 2009.

FENLON, D.R.; OGDEN, I. D.; VINTEN, A.; SVOBODA, I. The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Journal Applied Microbiology* v.88, 149–156, 2000.

ISHII, S.; KSOLL, W. B.; HICKS, R.E.; SADOWSKY, M. J. Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in Temperate soils from Lake Superior Watersheds. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, p. 612-621, 2006.

Instituto Trata Brasil. Águas subterrâneas e saneamento básico. Disponível em: <<http://www.tratabrasil.org.br/estudos/estudos-itb/itb/aguas-subterraneas-e-saneamento-basico>>. Acesso em: 15 de outubro. 2019.

JONES, D.L. Potential health risks associated with the persistence of *Escherichia coli* O157 in agricultural environments. *Soil Use and Management*, v.15, p.76-83, 1999.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução Normativa N° 62, de 26 de agosto de 2003.

MEDEIROS, S. S.; SALCEDO, I. H.; SANTOS, D. B.; BATISTA, R. O.; SANTOS JR, J. A.; LIMA, R. C. C.; MARIN, A. M. P. Esgotamento sanitário: panorama para o semiárido brasileiro. Campina Grande: INSA, 2014. 63 p.

MORAIS, M. A.; FERREIRA NETO, M.; SILVA, G. F.; LIRA, R. B.; BRITO, R. F.; MIGUEL, L. C. V. Contaminação microbiológica no perfil do solo por águas residuárias. *Revista Holos*, v.3, p.76-83, 2016.

PEREIRA, M. S.; MATOS, A. T.; MATOS, M. P.; AGUIAR, P. L. Decaimento de bactérias do grupo coliformes em solos com cobertura vegetal e nu. *Revista Engenharia na Agricultura*, v.22, p.575-582, 2014.

OVERBEEK, L.S.; FRANZ, E.; SEMENOV, A. V.; DE VOS, O. V.; VAN BRUGGEN, A.H.C. The effect of the native bacterial community structure on the predictability of *E.coli* O157:H7 survival in manure-amended soil. *Letters in Applied Microbiology*, v.50, p.425-430, 2010.

RODRIGUES, H.J.B. et al. Variabilidade quantitativa de população microbiana associada às condições microclimáticas observadas em solo de floresta tropical úmida *Revista Brasileira*

de Meteorologia, v.26, n.4, 629–638, 2011.

SEMENOV, A.V., FRANZ, E., VAN OVERBEEK, L., TERMORSHUIZEN, A.J., VAN BRUGGEN, A. Estimating the stability of *Escherichia coli* O157: H7 survival in manure-amended soils with different management histories. *Environmental Microbiology*, v.10, p.1450-1459, 2008.

SOUZA, J. A. A.; BATISTA, R. O.; RAMOS, M. M.; SOARES, A. A. Contaminação microbiológica do perfil do solo com esgoto sanitário. *Revista Acta Scientiarum Technology*, v.33, p.5-8, 2011.

TOPP,E.,WELSH, M., TIEN,Y-C., DANG,A., LAZAROVITS,G., CONN, K., ZHU,H. Strain-dependent variability in growth and survival of *Escherichia coli* in agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology*, v.44, p.303-308, 2003.

UNC, A.; GOSS, M. J. Movement of faecal bacteria through the vadose zone. *Water, Air and Soil Pollution*, v.149, p.327–337, 2003.

UNC, A.; GOSS, M. Transport of bacteria from manure and protection of water resources. *Applied Soil Ecology*, v.25, p.1-18, 2004.

YAO, Z., WEI, G., WANG, H., WU, L., WU, J., XU, J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soils from vegetable fields with different cultivation patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, v.79, p.1755-1756, 2013.

ZALESKI, K.J.; JOSEPHSON, K. L.; GERBA, C.; PEPPER, I. L. Survival, growth, and regrowth of enteric indicator and pathogenic bacteria in biosolids, compost, soil, and land applied biosolids. *Journal of Residuals Science and Technology*, 2, 49–63, 2005.