

Artículo original

Avaliação de indicadores de contaminação microbiana em solos tratados com esterco de aves

Alisson Dias Borges, Sarah Diana Guedes Garcia de Carvalho Borges, Dora Inés Kozusny-Andreani*, Roberto Andreani Junior

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais da Universidade Brasil- Fernandópolis (SP), Brasil.

Recibido 25 de febrero de 2018; aceptado 16 de mayo de 2018

Resumo: Objetivou-se neste estudo avaliar a presença de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em solos tratados com esterco de galinha e dos frutos de berinjela produzidos nos mesmos e verificar a resistência aos antibióticos. Para tanto foram determinados os micro-organismos presentes no solo e nos frutos de berinjela cultivados no mesmo e determinados os padrões de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos. Realizaram-se amostragens de solo de seis hortas, antes, durante e no final do cultivo de berinjela, quando foram colhidas amostras de frutos para verificação da provável contaminação cruzada. As bactérias isoladas foram avaliadas quanto à resistência aos antibióticos. Verificou-se que todos os solos e frutos de berinjela apresentaram maior ou menor grau de contaminação por coliformes termotolerantes e *E. coli* e *Salmonella* spp., evidenciando diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). A maioria dos isolados se caracterizou pela multiresistência aos antibióticos.

Palavras chave: coliformes, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., resistência à antibióticos, horta.

Evaluación de indicadores de contaminación microbiana en suelos tratados con estiércol de aves

Resumen: El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de coliformes totales, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en suelos tratados con estiércol de gallina y en los frutos de berenjena producidos en el mismo y comprobar la resistencia a los antibióticos. Para ello se determinaron los microorganismos presentes en el suelo y los frutos de berenjena allí cultivados y se determinaron los estándares de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados bacterianos. Se tomaron muestras del suelo de seis huertos, antes, durante y al final de la cosecha de berenjenas, cuando se tomaron muestras de fruta para comprobar la probable contaminación cruzada. Se evaluó la resistencia a los antibióticos de las bacterias aisladas. Se encontró que todas las muestras de suelo y de berenjena mostraron mayor o menor grado de contaminación por coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., evidenciando diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$). La mayoría de los aislados se caracterizaron por ser multiresistentes a los antibióticos.

Palabras clave: coliformes, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., resistencia a antibióticos, huerta.

Evaluation of microbial contamination indicators in soils treated with poultry manure

Abstract: The aim of this study was to evaluate the presence of total coliforms, thermotolerant coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in soils treated with chicken manure and the eggplant fruits produced in them and verify the antibiotic resistance. For this purpose, the micro-organisms present in the soil and in the eggplant fruits grown in the soil were determined as well as the antimicrobial susceptibility patterns of the bacterial isolates. Soil samples were taken from six orchards before, during and at the end of the eggplant crop, when fruit samples were taken to verify probable cross-contamination. The bacteria isolated were evaluated for antibiotic resistance. It was verified that all soils and eggplant fruits showed a greater or lesser degree of contamination by thermotolerant coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp., evidencing significant statistical differences ($p < 0.05$). The majority of the isolates were characterized by multiresistance to antibiotics.

Keywords: coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., resistance to antibiotics, orchard.

* Correspondencia:

E-mail: doraines@terra.com.br

Introdução

O solo é considerado um dos recursos naturais mais valiosos, em função de suas propriedades físicas, químicas e biológicas. As propriedades físicas auxiliam na filtração e lixiviação devido à penetração e movimentação de água nos poros, gerando condições para que os processos químicos e biológicos possam ocorrer. Estes atributos do solo em conjunto são responsáveis pelos principais mecanismos de atenuação de poluentes [1].

O solo pode ser contaminado por diferentes fontes poluidoras de origens distintas, tais como as atividades agrícolas, as industriais e os resíduos sólidos, que causam efeitos diversos no meio, os quais podem ser transitórios ou permanentes. A contaminação do solo é um grande problema ambiental devido à ameaça ecológica que representa, afetando o crescimento e sanidade das plantas, a qualidade e a quantidade da produção agrícola, provocando sua erosão e causando desertificação. A poluição do solo pode, também, ter graves efeitos sobre a contaminação das águas superficiais e subterrâneas, tornando-se uma séria ameaça para o meio ambiente e o ecossistema [2].

Em diversos países a aplicação de esterco na agricultura é uma prática comum. A sua utilização como adubo orgânico, é a opção mais econômica e prática para melhorar a qualidade do solo, proporcionando assim uma fonte adicional de nutrientes para o crescimento das plantas. Esta prática é frequente, especialmente, na agricultura orgânica na qual os fertilizantes sintéticos não podem ser utilizados. No entanto o emprego de esterco na forma líquida ou pastosa requer a observância do intervalo de segurança adequado, caso contrário uma carga elevada de bactérias patogênicas e vírus podem ser introduzidos ao solo, o que representa uma ameaça à saúde humana e animal, assim como ao meio ambiente [3-7].

A sobrevivência e a inativação de micro-organismos patogênicos no solo dependem de fatores ambientais, físico-químicos e biológicos. A sobrevivência de bactérias patogênicas no solo é dependente do gênero ou da espécie, assim coliformes termotolerantes sobrevivem mais tempo no solo do que *Salmonella* spp., uma vez que eles têm a capacidade de suportar condições ambientais adversas como a radiação solar, variações de temperatura e precipitação [8,9]. A temperatura, o teor de água e o pH foram sugeridos como os fatores mais importantes que controlam a sobrevivência bacteriana. O aumento da quantidade de água causa diminuição nas taxas de morte microbiana no solo, e em solos ácidos há menor sobrevivência de bactérias entéricas [10]. No entanto, um aumento na temperatura pode elevar as taxas de crescimento de *Escherichia coli* na água, porém pode reduzir o seu tempo de sobrevivência [11].

Os coliformes termotolerantes estão presentes em grandes números nas fezes, em concentrações aproximadamente de 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de conteúdo intestinal, a espécie *E. coli* é a principal bactéria deste grupo e representa 1% do total de bactérias intestinais [12]. Estas bactérias são encontradas naturalmente na água,

no solo e na vegetação [13]. Pachepsky *et al* [10] consideram que o esterco é a principal fonte de contaminação do solo e de águas subterrâneas por coliformes termotolerantes, em ambientes agrícolas. A chuva é responsável pela formação de suspensões de bactérias (incluindo as estirpes patogênicas) e de partículas de esterco, ocorrendo assim infiltração no solo e, estes infiltrados podem ser transportados para as águas subterrâneas. Devido à presença no solo de poros de diferentes tamanhos as bactérias e as partículas podem mover-se a longa distância por meio destes poros interconectados [14].

A utilização de esterco no solo como fertilizante orgânico pode provocar, além da contaminação com bactérias patogênicas, a disseminação de genes de resistência aos antibióticos [15]. As bactérias do solo podem conter genes de resistência a antibióticos (ARGs) responsáveis por diferentes mecanismos que lhes permitem superar os antimicrobianos naturais presentes no ambiente. Este conjunto de genes pode ser transferido para a comunidade microbiana, muitas vezes ecológica e taxonomicamente distante [16]. O surgimento destas bactérias multirresistentes é consequência da forte pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos em ambientes clínicos, agropecuários e ecossistemas naturais contaminados com antibióticos. As forças seletivas que impulsionam o processo evolutivo foram determinantes nas mudanças nas últimas décadas, resultando em ecossistemas naturais com um grande número de genes de resistência [17].

A resistência aos antibióticos representa um problema de saúde pública global, exigindo uma melhor compreensão da ecologia dos genes de resistência a antibióticos, sua seleção e sua propagação no ambiente [18]. Embora as pesquisas relacionadas à resistência bacteriana aos antibióticos foram realizadas em patógenos humanos clinicamente relevantes, demonstrou-se que genes de resistência a antibióticos (ARG) têm origens ambientais, e que a introdução e acúmulo de antimicrobianos no ambiente facilita a sua propagação. Como consequência, ARGs podem ser encontrados em quase todos os ambientes e são considerados poluentes emergentes [19].

Os patógenos resistentes aos antibióticos são de grande importância para a saúde humana, no entanto os reservatórios ambientais dos determinantes da resistência são pouco conhecidos. A identificação das fontes de genes de resistência, sua distribuição ambiental e como a ação antropogênica afeta na sua propagação, poderia auxiliar no estabelecimento de estratégias para combater a resistência bacteriana aos antibióticos [20]. Neste contexto objetivou-se neste estudo avaliar a presença de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Salmonella* spp. em solos de hortas comerciais e em frutos de berinjela, assim como o dano potencial que estas bactérias patogênicas poderiam causar nos seres humanos devido à resistência aos antibióticos. Para tanto foram determinados os micro-organismos presentes no solo e nos frutos de berinjela cultivados nos mesmos, e foram determinando os padrões de susceptibilidade e resistência antimicrobiana dos micro-

organismos isolados.

Materiais e métodos

Características da área de estudo: Este estudo foi realizado na cidade de Caraguatutuba, localizada no litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil, na mesorregião do Vale do Paraíba entre as coordenadas 23° 37' 31" S e 45° 24' 44" W. Segundo o Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura [21], a classificação climática de Köpen-Geiger é Af, com clima tropical chuvoso, sem estação seca. A temperatura média anual é de 24,9 °C, variando entre 18,2 °C e 31,6 °C e a precipitação média anual é de 1.758 mm.

Foram selecionadas seis hortas comerciais, localizadas na região sul do município, na zona rural. A área de estudo não apresentava nas suas proximidades rios, riachos, lagos e mata fechada, e não foi observada criação de gado, e a cultura predominante era a berinjela (*Solanum melongena* L). No preparo do solo, os produtores realizaram fertilização química com NKP contendo a formulação 04-12-08, e cinco hortas receberam 5 L m⁻² de esterco de galinha compostado.

Amostragem do solo: As áreas de amostragem em cada horta foram delimitadas de forma aleatória e demarcadas com a finalidade de coletar o solo sempre no mesmo lugar, minimizando interferências nos resultados. As amostras de solo foram retiradas na profundidade de 0-10 cm, onde as características sanitárias do solo sofrem maior influência causada pelas atividades agrícolas [22].

As amostras foram obtidas em três períodos, a primeira no plantio de berinjela, a segunda aos 60 dias e a última aos 120 dias, no momento da colheita. Cada área de amostragem foi de 1m², onde foram colhidas 5 sub amostras de 100 g, as quais foram misturadas, totalizando 500 g. Em cada horta foram colhidas quatro amostras por período [22]. As amostras retidas com trado Uhland, desinfetado previamente com álcool 70%, depositadas em recipiente estéril e identificado, foram armazenadas em caixas isotérmicas (temperatura interna 3 °C) e transportadas para laboratório para análise microbiológica, realizada no prazo máximo de 24 horas.

Amostragens de frutos de berinjela: Com o objetivo de avaliar a provável contaminação cruzada solo/frutos de berinjela se colheram amostras, que coincidiram com o último dia de amostragem do solo. Os frutos foram retirados das plantas de forma aleatória, utilizando-se tesouras esterilizadas. Cada fruto foi embalado individualmente em sacos plásticos esterilizados, identificados e armazenados em caixas isotérmicas (temperatura interna 3 °C) e em seguida transportadas para laboratório para análise microbiológica.

Análises microbiológicas do solo: Para as análises microbiológicas dez gramas do solo peneirado foram pesados e dissolvidos em frascos de vidro com 90 mL de solução salina, completando um volume de 100 mL, em

seguida foram colocados em agitador mecânico durante 15 minutos para promover o desprendimento das bactérias das partículas do solo. De cada amostra foram realizadas diluições seriadas em água peptonada tamponada (0,1%) estéril [23].

Para a detecção de coliformes totais e termotolerantes, *E. coli* e *Salmonella* spp., alíquotas de 0,1 mL das amostras diluídas em série (de 10⁻³ a 10⁻⁶) foram espalhadas em ágar MacConkey (Oxoid®), *Salmonella-Shigella* ágar (Oxoid®), Levine ágar (Oxoid®) e ágar nutriente (Himedia®). As placas foram incubadas a 35 °C durante 24-48 h, quando se procedeu a contagem das colônias. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC), exceto *Salmonella* spp. que foi avaliada pela presença ou ausência [23]. Os isolados foram identificados por métodos bioquímicos, utilizando-se o sistema API 20E (Analytical Profile Index, bioMérieux). Uma vez identificados os isolados foram cultivados em tubos contendo ágar nutriente e armazenados em refrigerador (5 °C) para realização dos testes de susceptibilidade aos antibióticos.

O grau de contaminação microbiana do solo foi determinada pelo método adaptado, descrito por Trawińska *et al.* [7]: a) solo limpo de 0,0-1,0 (0 log UFC g⁻¹); b) solo ligeiramente contaminado de 1,0-100,0 (0-2 log UFC g⁻¹); c) solo moderadamente contaminado de 100,0-1.000,0 (2-3 log UFC g⁻¹); d) solo fortemente contaminado >1.000, 0 (>3 log CFU g⁻¹).

Análises microbiológicas de frutos de berinjela: As análises microbiológicas realizadas seguiram os protocolos propostos por Silva *et al* [24]. Vinte e cinco gramas do fruto de berinjela foram pesados, triturados e dissolvidos em frascos de vidro com 225 mL de solução água peptonada, em seguida foram homogeneizados. De cada amostra foram realizadas diluições seriadas em água peptonada tamponada (0,1%) estéril. Para determinação dos coliformes, 1 mL das diluições foram inoculadas em triplicata em Caldo Bile Verde Brilhante 2% Lactose (Oxoid®). Após incubação durante 24-48 h a 37 °C, as culturas positivas foram utilizadas para determinar o NMP g⁻¹. As culturas positivas foram inoculadas em meio seletivo Levine ágar, para isolar colônias únicas, as quais foram identificadas por correlação a aparência colonial, coloração de Gram, reação oxidase, e reações bioquímicas utilizando sistema API 20E (bioMérieux).

Salmonella spp. foi detectada em caldo Rappaport-Vassiliadis (Oxoid®). Depois semeadas em ágar sulfito de bismuto e *Salmonella-Shigella* ágar (Oxoid®). Após incubação durante 24-48 h a 37 °C, as culturas positivas foram identificadas pela utilização do sistema API 20E (BioMérieux).

As colônias foram quantificadas e os resultados apresentados pelas UFC g⁻¹, exceto para *Salmonella* spp. que foi avaliada pela presença ou ausência desta bactéria [24].

Susceptibilidade bacteriana aos antimicrobianos: Para

avaliação da susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*, se utilizou o método de Kirby Bauer modificado, tal como recomendado pelo CLSI [25]. Foram avaliados os antimicrobianos: amicacina (30µg), ampicilina (10µg), aztreonam (15µg), cefaclor (30µg), cefazolina (30µg), cefalexina (30µg), cefalotina (30µg), cefepime (30µg), cefotaxime (30µg), ceftazidima (30µg), ceftriaxona (30µg), ciprofloxacina (5µg), clindamicina (2µg), cloranfenicol (30µg) e tetraciclina (30µg). Os resultados foram interpretados de acordo com os protocolos estabelecidos pelo CLSI [25]. Após 18 h de incubação, os isolados foram classificados como suscetíveis ou resistentes, de acordo com diâmetro dos halos formados ao redor dos discos.

O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) foi calculado conforme a metodologia descrita por Krumperman [26]. O IRMA foi calculado pela razão entre o número de antibióticos aos quais o isolado foi resistente e o número de antibióticos ao qual o isolado foi exposto. Quando o IRMA é superior a 0,2 caracteriza multirresistência.

Avaliação estatística dos resultados: A análise dos dados foi realizada usando o programa estatístico SPSS versão 13.0, executando testes de normalidade e análises de variância (ANOVA) para determinar se existem diferenças significativas na concentração de indicadores microbianos de contaminação nos solos das hortas e nos frutos de berinjela. Foi utilizado um nível de significância de 0,05.

Resultados e discussão

Na tabela 1 são apresentados os resultados de contaminação por coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Salmonella* spp., de solos, tratados com esterco de galinha, de seis hortas comerciais produtoras de berinjela. Verificou-se contaminação expressiva por coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Salmonella* spp. O uso de excremento de aves compostado indevidamente como adubo orgânico na agricultura, pode causar contaminação do solo com micro-organismos patogênicos e por consequência das frutas e hortaliças cultivadas no mesmo, que quando consumidas cruas podem causar doenças transmitidas por alimentos (DTA). Alguns desses micro-organismos se tornaram uma preocupação para a saúde pública e a qualidade ambiental, pois podem contaminar as fontes de água e o solo, infectar os seres humanos e outros animais pelo contato da pele e do consumo de alimentos ou água contaminados [1,3-5,7]. Portanto, é necessário avaliar este fator de risco para identificar os possíveis efeitos de contaminação em áreas de produção.

Os coliformes totais são abundantes nos ambientes naturais, encontrados com frequência no solo, enquanto que na água a sua presença não é habitual. Os coliformes incluem os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Serratia*, *Hafnia*, entre outros. [12,23]. *E. coli* normalmente se origina nos intestinos de mamíferos, possuem uma vida útil curta em comparação com outras bactérias coliformes. A sua

Tabela 1. Valores médios da concentração de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em solo de hortas tratado com esterco de galinha. Caraguatatuba – SP.

| Micro-organismos | Hortas | Meses de análise | | |
|---|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | Abril | Junho | Agosto |
| Coliformes totais (UFC g ⁻¹) | 1 | 4,4 x 10 ⁶ | 4,3 x 10 ⁶ | 4,0 x 10 ⁶ |
| | 2 | 3,2 x 10 ⁶ | 3,0 x 10 ⁶ | 3,5 x 10 ⁶ |
| | 3 | 5,3 x 10 ² | 5,5 x 10 ² | 5,3 x 10 ² |
| | 4 | 1,5 x 10 ⁷ | 1,3 x 10 ⁷ | 1,0 x 10 ⁷ |
| | 5 | 1,2 x 10 ⁷ | 1,2 x 10 ⁷ | 1,4 x 10 ⁷ |
| | 6 | 1,5 x 10 ⁷ | 1,3 x 10 ⁷ | 1,0 x 10 ⁷ |
| Coliformes termotolerantes (UFC g ⁻¹) | 1 | 1,6 x 10 ⁵ | 1,2 x 10 ⁵ | 1,5 x 10 ⁶ |
| | 2 | 0,6 x 10 ⁶ | 0,3 x 10 ⁶ | 0,3 x 10 ⁶ |
| | 3 | 3,0 x 10 ² | 3,5 x 10 | 2,0 x 10 |
| | 4 | 2,4 x 10 ⁶ | 2,0 x 10 ⁶ | 2,5 x 10 ⁶ |
| | 5 | 2,2 x 10 ⁶ | 2,4 x 10 ⁶ | 3,3 x 10 ⁶ |
| | 6 | 1,6 x 10 ⁶ | 1,6 x 10 ⁶ | 1,1 x 10 ⁶ |
| <i>Escherichia coli</i> (UFC g ⁻¹) | 1 | 0,9 x 10 ⁵ | 1,0 x 10 ⁵ | 1,0 x 10 ⁶ |
| | 2 | 6,6 x 10 ⁵ | 6,3 x 10 ⁵ | 6,6 x 10 ⁵ |
| | 3 | 1,0 x 10 ² | 1,3 x 10 ² | 1,0 x 10 ² |
| | 4 | 0,3 x 10 ⁶ | 0,4 x 10 ⁶ | 0,6 x 10 ⁶ |
| | 5 | 1,0 x 10 ⁶ | 1,3 x 10 ⁶ | 1,3 x 10 ⁶ |
| | 6 | 0,3 x 10 ⁶ | 0,3 x 10 ⁶ | 0,1 x 10 ⁶ |
| <i>Salmonella</i> spp. (UFC g ⁻¹) | 1 | 2,4 x 10 | 2,0 x 10 | 1,8 x 10 |
| | 2 | 0,3 x 10 ² | 0,1 x 10 ² | 0,2 x 10 ² |
| | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | 4 | 3,4 x 10 ² | 1,8 x 10 ² | 0,9 x 10 ² |
| | 5 | 4,5 x 10 ² | 0,7 x 10 ² | 0,7 x 10 ² |
| | 6 | 0,9 x 10 ² | 1,0 x 10 ² | 1,0 x 10 ² |

ocorrência está relacionada com a disposição inadequada de resíduos sanitários [1,6,13,14]. No entanto, os patógenos podem estar presentes em fertilizantes orgânicos após a fase termófila da compostagem, esta informação fornece dados importantes no que diz respeito aos aspectos epidemiológicos de infecções causadas por *E. coli* [5].

No preparo do solo, antes do transplante das mudas de berinjela, foi empregado esterco de galinha compostado, exceto na horta 3 que recebeu somente fertilizantes químicos e calcário. Verificou-se concentrações elevadas de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Salmonella* spp. (Tabela 1), apresentaram diferenças significativas (p<0,01) nas três amostragens. A presença destes micro-organismos provavelmente está associada ao uso de esterco de galinha compostado de forma inadequada. Os principais micro-organismos patogênicos encontrados

no esterco de frango são *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Clostridium botulinum* e vários sorotipos de *Salmonella* e *E. coli* [5,7,22]. Miller *et al* [27] demonstraram que 30% das amostras de adubo orgânico continham *E. coli*, indicando que, sob condições ótimas, o processo de compostagem pode não ser suficiente para eliminar todas as bactérias patogênicas.

Na presente pesquisa foi constatada a presença de coliformes termotolerantes em concentrações que variaram de $5,3 \times 10^2$ a $1,5 \times 10^7$ e *E. coli* entre $2,0 \times 10$ e $3,3 \times 10^6$ (Tabela 2), diferindo significativamente quando os solos das hortas foram comparados ($p < 0,01$). *Salmonella* spp. foi isolada nos solos das hortas 1, 2, 4, 5 e 6 (Tabela 1). Provavelmente, presença de coliformes e de *E. coli* no solo da horta 3, que não recebeu esterco poderia estar associada a presença de aves e animais silvestres na área de cultivo [28]. De acordo com Kostadinova *et al* [4] o esterco fresco e a cama de frango são as principais fontes de poluição do ar e do solo nas áreas de exploração avícola, visto que estes materiais contêm uma alta carga de micro-organismos, incluindo bactérias coliformes, razão pela qual estão sujeitos às exigências de controle sanitário.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 1) e utilizando a metodologia de classificação do grau de contaminação, descrita por Trawińska *et al* [7], os solos das hortas 1, 2, 4, 5 e 6 foram caracterizados como: solos fortemente contaminados por apresentarem contagem microbiana $> 1.000 \text{ UFC g}^{-1}$ ($> 3 \log \text{ CFU g}^{-1}$), enquanto que na horta 3 o solo estava moderadamente contaminado com $100 - 1.000 \text{ UFC g}^{-1}$ ($2 - 3 \log \text{ UFC g}^{-1}$). Estes resultados evidenciam que quando o esterco é frequentemente aplicado para a fertilização do solo, esta prática agrícola requer a observância do intervalo de segurança adequado. Caso contrário, uma grande carga de bactérias patogênicas podem ser introduzidos ao perfil do solo, o que representa uma grande ameaça epidemiológica e ambiental [3].

O uso de esterco compostado indevidamente como adubo orgânico para cultivo de hortaliças e frutas pode ser uma fonte de contaminação microbiana e, portanto, um problema de segurança alimentar [6,22]. Assim a relação existente

entre legumes frescos e surtos de doenças transmitidas por alimentos levaram a preocupações sobre contaminação de hortaliças com bactérias patogênicas, provenientes do uso esterco no ambiente agrícola. Fontes potenciais de contaminação incluem fezes ou esterco, aplicação de água residual na irrigação, entre outros. No entanto, sabe-se que *E. coli* podem persistir no solo ao longo de vários anos. Por esta razão são necessárias normas para garantir o uso seguro de compostos orgânicos e de águas residuais, evitando assim riscos biológicos para a população humana [9,11,29].

Na tabela 2 são apresentados os valores médios da concentração de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Salmonella* spp. em frutos de berinjela cultivados em solo tratado com esterco de galinha. Os resultados obtidos evidenciaram diferenças significativas na carga microbiana ($p < 0,01$), demonstrando que os frutos colhidos em todas as hortas estavam contaminados com coliformes termotolerantes e *E. coli*, enquanto os das hortas 1, 4 e 5 apresentaram também *Salmonella* spp.

De acordo com a resolução RDC N° 12, de 02/01/2001 [29], que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos e o limite máximo de 10^2 NMP.g^{-1} , para coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella*, por tanto os frutos produzidos nas hortas 1, 2, 4, 5 e 6 apresentaram carga microbiana superior a estabelecida pela legislação.

Obi [23] avaliou a qualidade sanitária de hortaliças (abóbora, pepino e tomate) produzidas em solos tratados com esterco animal. Pelas análises microbiológicas foram recuperados do solo e dos vegetais: *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. A contagem bacteriana total das amostras de solo variou de $5,9 \times 10^4$ a $1,75 \times 10^9 \text{ CFU g}^{-1}$, enquanto a contagem bacteriana total para as amostras de vegetais variou de $1,50 \times 10^5$ a $2,65 \times 10^9 \text{ CFU g}^{-1}$. A contagem de coliformes totais das amostras de solo foi estimada entre $1,65 \times 10^7$ e $6,9 \times 10^4 \text{ CFU g}^{-1}$, enquanto que as amostras de vegetais apresentaram de $1,20 \times 10^8$ a $7,2 \times 10^5 \text{ CFU g}^{-1}$, corroborando os resultados obtidos nesta pesquisa (Tabelas 1 e 2) evidenciando que há um alto nível de contaminação microbiana associado ao cultivo de vegetais em solos que foram tratados com esterco e que o consumo destes alimentos representa risco a saúde pública.

A presença de *Salmonella* spp. nos frutos produzidos nas hortas 1, 4 e 5 (Tabela 2) inviabiliza a sua utilização para consumo humano e animal. Segundo Hernandez *et al* [28], cepas de *S. enterica*, subespécie entérica sorovar Typhimurium, são capazes de contaminar vegetais e solo, podendo ser adquiridas diretamente das fezes de aves e de outros animais ou de produtos de origem animal, constituindo-se em um fator de risco para intoxicação ou infecção alimentar humana.

A maioria das espécies bacterianas que contaminam solos, hortaliças e frutos apresentam genes de resistência aos antibióticos (ARGs), podendo contribuir para a disseminação horizontal de resistências entre as populações bacterianas muitas vezes ecologicamente e taxonomicamente distantes [16]. Segundo Herath [30], os antibióticos estão entre as

Tabela 2. Concentração de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em frutos de berinjela cultivados em solo tratado com esterco de galinha. Caraguatatuba – SP, Brasil.

| Hortas | Micro-organismos (UFC g ⁻¹) | | | |
|--------|---|----------------------------|-------------------------|------------------------|
| | Coliformes totais | Coliformes termotolerantes | <i>Escherichia coli</i> | <i>Salmonella</i> spp. |
| 1 | $6,3 \times 10^5$ | $0,9 \times 10^3$ | $0,3 \times 10^5$ | Presença |
| 2 | $1,2 \times 10^4$ | $1,0 \times 10^3$ | $0,1 \times 10^3$ | Ausência |
| 3 | $6,0 \times 10$ | $5,0 \times 10$ | $0,4 \times 10$ | Ausência |
| 4 | $4,5 \times 10^5$ | $1,3 \times 10^4$ | $1,9 \times 10^3$ | Presença |
| 5 | $0,9 \times 10^5$ | $1,6 \times 10^4$ | $1,1 \times 10^3$ | Presença |
| 6 | $6,9 \times 10^4$ | $1,0 \times 10^4$ | $2,5 \times 10^3$ | Ausência |

drogas mais bem sucedidas utilizados para terapia humana, no entanto são extensivamente usados para animais e para fins agrícolas, assim resíduos de gerados em ambientes urbanos e rurais podem conter antibióticos e ARGs que podem contaminar ambientes naturais. A consequência mais clara da liberação de antibiótico em ambientes naturais é a seleção de bactérias resistentes. Os mesmos genes de resistência encontrados em ambientes clínicos estão atualmente disseminados nos ecossistemas intocados e sem qualquer registro de contaminação de antibióticos. Por tanto, se deduz que o efeito dos antibióticos sobre a biosfera é imensurável e pode afetar a estrutura e a atividade da microbiota do ambiente [17].

Os resultados obtidos na presente pesquisa evidenciam a incidência de bactérias resistentes aos antibióticos, nos

solos tratados com esterco de aves assim como nos frutos de berinjela produzidos nos mesmos (Tabela 3). Verificou-se que *E. coli* isoladas dos solos das seis hortas apresentaram IRMA superior a 0,2, caracterizando estas bactérias portadoras de multirresistência.

A maioria dos isolados de *E. coli* foi resistente à cefaclor (95%), a cefotaxime (90%) e a tetraciclina (83,5%), enquanto que a porcentagem de isolados resistentes a outros agentes foi menor.

Em *Salmonella* foi constada multirresistência em isolados de tres hortas (Tabela 3). Verificou-se resistência à cefaclor em todos os isolados, enquanto que para os demais antibióticos verificaram-se padrões de resistência variáveis.

Pelos resultados obtidos quanto à resistência aos antibióticos de *E. coli* e *Salmonella* spp. isoladas de berinjela

Tabela 3. Susceptibilidade (S), susceptibilidade intermediária (I), resistência (R) e índice de resistência múltipla (IRMA) a diferentes classes de antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. isoladas de solos de hortas tratados com esterco e frutos de berinjela. Caraguatatuba – SP, Brasil.

| <i>Escherichia coli</i> (isolada do solo) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|
| Hortas | Antimicrobianos | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | AMI | ATM | AMP | CFC | CFZ | CFL | CFX | CFO | CAZ | CPM | CRO | CIP | CLI | CLO | ERI | TET | IRMA | |
| 1 | S | S | S | R | R | S | S | S | S | S | R | R | S | S | S | R | 0,31 | |
| 2 | S | R | S | R | S | S | R | S | S | S | S | S | S | I | S | R | 0,25 | |
| 3 | S | S | S | R | S | R | R | S | S | I | I | S | S | S | S | R | 0,25 | |
| 4 | R | S | S | R | S | S | R | S | R | S | S | S | S | S | S | S | 0,25 | |
| 5 | S | S | S | S | R | S | I | R | I | S | S | S | R | R | R | R | 0,37 | |
| 6 | R | R | S | R | R | S | S | S | S | S | R | S | S | R | S | S | 0,37 | |
| <i>Salmonella</i> spp. (isolada do solo) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | R | 0,18 | |
| 2 | S | R | S | R | S | S | R | S | S | S | S | S | S | I | S | R | 0,25 | |
| 34 | S | S | S | R | S | R | S | S | S | I | I | S | R | S | S | S | 0,25 | |
| 5 | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | I | S | R | S | I | 0,12 | |
| 6 | S | R | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | I | R | R | 0,25 | |
| <i>Escherichia coli</i> (isolada de frutos de berinjela) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | S | R | S | S | R | S | S | R | S | S | R | R | S | S | S | R | 0,37 | |
| 2 | S | R | S | R | S | S | R | S | S | S | S | S | S | R | S | R | 0,31 | |
| 3 | S | S | S | R | S | R | R | S | S | I | R | S | S | S | S | R | 0,31 | |
| 4 | R | S | S | R | S | S | R | S | R | S | S | S | S | S | S | S | 0,25 | |
| 5 | S | S | S | S | R | S | R | R | R | S | S | S | R | R | R | R | 0,50 | |
| 6 | R | R | S | R | R | S | S | S | R | S | R | S | S | R | S | S | 0,43 | |
| <i>Salmonella</i> spp. (isolada de frutos de berinjela) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | R | 0,18 | |
| 4 | S | S | S | R | S | R | S | S | S | I | I | S | R | S | S | S | 0,25 | |
| 5 | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | R | S | R | S | I | 0,18 | |

AMI = amicacina, ATM = aztreonam, AMP = ampicilina, CFC = cefaclor, CFZ = cefazolina, CFL = cefalotina, CFX = cefotaxime, CFO = ceftioxina, CAZ = ceftazidima, COM = cefepime, CRO = ceftriaxona, CIP = ciprofloxacina, CLI = clindamicina, CLO = cloranfenicol, ERI = eritromicina, TET = tetraciclina.

(Tabela 3), constatou-se que houve correspondência com aqueles encontrados nos solos das hortas. As bactérias resistentes a antibióticos ou seus determinantes de resistência correspondentes (ARGs) são conhecidos por se espalharem para seres humanos por meio da cadeia alimentar. Vegetais frescos que são consumidos crus podem contribuir para este fenômeno, em vista que as bactérias epífitas podem desenvolver resistência a antibióticos, como consequência da grande quantidade de antibióticos utilizados na agricultura, podendo levar a contaminação vegetal com bactérias resistentes de fontes origem animal e/ou humanas [16,17].

Deve-se ressaltar que os antibióticos são usados na produção animal tanto para a promoção do crescimento e melhoria da eficiência alimentar, bem como para o tratamento terapêutico de doenças. Estes procedimentos constituem fatores de seleção de genes de resistência a antibióticos. Junto às bactérias do conteúdo gastrointestinal, são excretados também, antibióticos que não são absorvidos pelos animais. Portanto, a aplicação no solo de resíduos animais (esterco), é um meio para a entrada de antibióticos e dos determinantes genéticos de resistência (ARGs) no ambiente [17,19]. Portanto, as questões relacionadas com a contaminação ambiental e transmissão de bactérias resistentes aos antimicrobianos pelo esterco animal devem ser totalmente resolvidas, havendo necessidade de melhorar normas ambientais relativas à prática da gestão de resíduos de origem animal. Considerando os resultados da presente pesquisa, foi possível concluir que o uso de esterco de galinha como fertilizante na produção de berinjela influenciou na contagem de bactérias coliformes e *Salmonella* spp. registradas no solo e nos frutos. A contaminação, por estas bactérias patogênicas resistentes a diversos antibióticos, constitui um perigo real para a saúde pública, principalmente dos agricultores e dos consumidores dos vegetais produzidos.

Referências

1. Bashiri F, Ahmadi R, Khezri SM. Remove soil contaminants by heat treatment. *Int J Fund Arts Arch*. 2015; 1:8-12.
2. Faissal A, Ouazzani N, Parrado JR, Dary M, Manyani H, Morgado BR *et al*. Impact of fertilization by natural manure on the microbial quality of soil: Molecular approach. *Saudi J Biol Sci*. 2017; 24:1437-43.
3. Amin MMG, Forslund A, Bui XT, Juhler RK, Petersen SO, Laegsmand M. Persistence and leaching potential of microorganisms and mineral N in animal manure applied to intact soil columns. *Appl Environ Microbiol*. 2013; 79:535-42.
4. Kostadinova G, Petrov G, Denev S, Miteva CH, Stefanova R, Penev T. Microbial pollution of manure, litter, air and soil in a poultry farm. *Bulg J Agric Sci*. 2014; 20:56-65.
5. Puño-Sarmiento J, Gazal LE, Medeiros LP, Nishio EK, Kobayashi RKT, Nakazato G. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from avian organic fertilizers. *Int J Environ Res Public Health*. 2014; 11:8924-39.
6. Balk KS. Microbial contamination of vegetable crop and soil profile in arid regions under controlled application of domestic wastewater. *Saudi J Biol Sci*. 2016; 23:S83-S92.
7. Trawińska B, Chmielowiec-Korzeniowska A, Nowakowicz-Dębek B, Tymczyna L, Bombik T, Pyrz M *et al*. Evaluation of microbial contamination of feces and soil on a laying-hen farm depending on sampling site and season. *Rev Bras Zootec*. 2016; 45:190-4.
8. Oluyemi OF. Microbiological and physicochemical assessment of poultry soil samples in Akure Metropolis, Nigeria. *Int J Environ Agric Res*. 2016; 2:1-6.
9. Guber AK, Fry J, Ives RL, Rose JB. *Escherichia coli* survival in, and release from, white-tailed deer feces. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81:1-9.
10. Pachepsky YA, Sadeghi AM, Bradford SA, Shelton DR, Guber AK, Dao T. Transport and fate of manure-home pathogens: Modeling perspective. *Agric Water Manag*. 2006; 66:81-92.
11. Kiefer LA, Shelton DR, Pachepsky Y, Blaustein R, Santin-Duran M. Persistence of *Escherichia coli* introduced into streambed sediments with goose, deer and bovine animal waste. *Lett Appl Microbiol*. 2012; 55:345-53.
12. Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. *Microbiologia de Brock*. 14ª ed. Porto Alegre, RS: Artmed; 2016.
13. Akyala IA, Olufemi A, Adebola O. Implication of coliforms as a major public health problem in Nigeria. *J Public Health Epidemiol*. 2014; 6:1-7.
14. Guher AK, Pachepsky YA, Shelton DR, Yu O. Association of fecal coliforms with soil aggregates: effect of water content and bovine manure application. *Soil Sci*, 2009; 174:543-8.
15. Danilova NV, Galitskaya PY, Selivanovskaya SY. Antibiotic resistance of microorganisms in agricultural soils in Russia. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*. 2018; 107: 012054.
16. Di Cesare A, Luna GM, Vignaroli C, Pasquaroli S, Tota S, Paroncini P, *et al*. Aquaculture can promote the presence and spread of antibiotic-resistant enterococci in marine sediments. *PLOS ONE*. 2013; 8: e62838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062838>.
17. Fernandes M.R, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F *et al*. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene. *Euro Surveill*. 2016; 21(17). doi: 10.2807/1560-7917.
18. Marti E, Jofre J, Balcazar JL. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PLoS ONE*. 2013; 8(10): e78906. doi: 10.1371/journal.pone.0078906.
19. Grenni P, Ancona V, Caracciolo AB. Ecological

- effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchem J.* 2018; 136:25–39.
20. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen A, Davies, J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8:251–9.
 21. Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura. Disponível em: http://www.cpa.unicamp.br/outrasinformacoes/cli_ma_muni_121.html. Acessado em 20 jun 2017.
 22. Vivaldi GA, Camposeo S, Rubino P, Lonigro A. Microbial impact of different types of municipal wastewaters used to irrigate nectarines in Southern Italy. *Agric Ecosyst Environ.* 2013; 181:50-7.
 23. Obi CN. Bacteriological assesment of vegetables cultivated in soils treated with poultry manure and the manure-treated soil samples. *Am J Microbiol Res.* 2014; 2:189-200.
 24. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 4ª edição. São Paulo: Editora Varela; 2010.
 25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement M100-S20. Wayne (PA), USA: 2009.
 26. Krumperman PH. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol.* 1983; 46:165-70.
 27. Miller C, Heringa S, Kim J, Jiang X. Analyzing indicator microorganisms, antibiotic resistant *Escherichia coli*, and regrowth potential of foodborne pathogens in various organic fertilizers. *Foodborne Pathog Dis.* 2013; 10: 520–527.
 28. Hernandez SM, Keel, K, Sanchez S, Trees E, Gerner-Smidt P, Adams, JK, *et al.* Epidemiology of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium strain associated with a songbird outbreak. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78:7290-8.
 29. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA - BRASIL. Resolução RDC 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1.
 30. Herath EM, Palansooriya AGKN, Dandeniya WS, Jinadasa RN. An assesment of antibiotic resistant bacteria in poultry litter and agricultural soils in Kandy District, Sri Lanka Tropical Agricult Res. 2016; 27: 389–98.