

Ocorrência de bactérias multirresistentes em solos florestais no município de Curitiba – SC

Occurrence of multidrug-resistant bacteria in forest soils in Curitiba – SC

Thaís Fernandes Ronsani^{1*}, Letícia Gonçalves Camargo¹, Estela Kovalski¹, Emerson Gabriel dos Passos¹, Letícia Zapparoli Perin¹, Sonia Purin da Cruz¹

¹Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências Naturais e Sociais, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitiba, Santa Catarina, Brasil.

*Autora para correspondência: thaisronsanii@gmail.com

RESUMO

A multirresistência bacteriana representa um desafio crescente à saúde pública. Este estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de bactérias multirresistentes em solos florestais no município de Curitiba – SC. As coletas foram realizadas ao longo de um ano, abrangendo quatro estações e diversos ambientes, como floresta secundária, plantios de *Pinus* e *Eucalyptus*, áreas agrícolas e sistemas agroflorestais. Amostras de solo foram submetidas a diluição seriada, cultivo em ágar MacConkey e teste de suscetibilidade a três antibióticos (ampicilina, ciprofloxacino e tetraciclina) pelo método de disco-difusão. Os resultados mostraram uma média geral de 2.254.680 UFC g⁻¹ de solo seco, sem variação estatística entre locais ou estações. No entanto, a resistência aos antibióticos variou conforme a estação, com maiores índices no outono e inverno. Foram detectadas bactérias multirresistentes especialmente nas áreas de floresta secundária e *Pinus* adulto. Conclui-se que ambientes florestais também podem atuar como reservatórios de resistência antimicrobiana, sendo essencial sua inclusão em programas de monitoramento ambiental.

Palavras-chave: solo florestal; coliformes termotolerantes; resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a growing challenge to public health. This study aimed to evaluate the occurrence of multidrug-resistant bacteria in forest soils in the municipality of Curitiba,

SC, Brazil. Soil samples were collected over the course of one year, covering four seasons and various environments such as secondary forest, *Pinus* and *Eucalyptus* plantations, agricultural areas, and agroforestry systems. Samples were subjected to serial dilution, cultured on MacConkey agar, and tested for susceptibility to three antibiotics (ampicillin, ciprofloxacin, and tetracycline) using the disk diffusion method. Results showed an overall mean of 2,254,680 CFU g⁻¹ of dry soil, with no statistical difference between sites or seasons. However, antibiotic resistance varied significantly by season, with higher rates observed in autumn and winter. Multidrug-resistant bacteria were mainly found in secondary forest and adult *Pinus* plantation areas. It is concluded that forest environments may also act as reservoirs of antimicrobial resistance, highlighting the need to include such areas in environmental monitoring programs.

Keywords: forest soil; thermotolerant coliforms; antimicrobial resistance.

1 INTRODUÇÃO

A multirresistência bacteriana, definida como a resistência simultânea de microrganismos a múltiplas classes de antibióticos, constitui um desafio crescente à saúde pública mundial. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2014), bactérias multirresistentes reduzem drasticamente as opções terapêuticas, resultando em tratamentos menos eficazes, aumento das internações e maior taxa de mortalidade. Esse problema é agravado pelo uso indiscriminado e excessivo de antimicrobianos em diversas áreas, como a medicina humana, a veterinária e a agropecuária, favorecendo a seleção e propagação de cepas resistentes (Martins *et al.*, 2020). Dessa forma, a emergência e disseminação de bactérias multirresistentes exigem medidas urgentes e coordenadas, como a implementação de programas de uso racional de antibióticos e o fortalecimento da vigilância epidemiológica.

Embora áreas florestais tenham menor interferência humana, esses locais podem ser contaminados por resíduos de atividades agrícolas próximas, dejetos de animais silvestres ou domésticos, deposição atmosférica de partículas contaminadas e até mesmo resíduos humanos, favorecendo a seleção e disseminação desses microrganismos (Jamieson *et al.*, 2002). Além disso, durante períodos de chuva, coliformes presentes no solo podem ser transportados para corpos d'água, contribuindo para a contaminação da água usada na irrigação ou no consumo humano (Caumo *et al.*, 2010). Dessa forma, torna-se essencial o monitoramento da qualidade

microbiológica do solo. Este estudo tem como objetivo avaliar a ocorrência de bactérias multirresistentes em solos florestais no município de Curitiba – SC.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas de solo foram realizadas ao longo de um ano, abrangendo todas as estações: primavera (outubro/2023), verão (fevereiro/2024), outono (abril/2024) e inverno (julho/2024). O estudo foi conduzido no município de Curitiba, situado na Mesorregião Serrana de Santa Catarina, na sub-bacia hidrográfica do Rio Canoas, a 987 metros de altitude e com área territorial de 434,865 m² (IBGE). As amostras foram coletadas em diferentes tipos de ambientes, incluindo área agrícola, sistemas agroflorestais (SAF), floresta secundária, plantações de eucalipto e pinus (jovem e adulto) e locais próximos a cursos d'água que se encontram no mesmo município, como o Rio Pedras, Correntes, Marombas e Pessegueirinho.

As coletas de solo foram realizadas trimestralmente, representando cada estação do ano. Em cada ponto de coleta, foram obtidas três subamostras, utilizadas como repetições para análise estatística. As coletas foram preferencialmente feitas próximas a fezes de animais. Antes da retirada do solo, foi realizada a raspagem superficial para remoção de resíduos e vegetação, e a coleta ocorreu a uma profundidade de 5 a 10 cm. Cada amostra continha entre 40 e 60 gramas de solo.

Inicialmente, 10 g de solo foram diluídos em 90 ml de solução salina a 0,85%, resultando em uma diluição de 10⁻¹. Após homogeneização da suspensão, foram preparadas as diluições subsequentes, onde 1 ml da suspensão original foi transferido para um tubo contendo 9 ml de solução salina, estabelecendo assim a diluição 10⁻². Do tubo homogeneizado, 1 ml foi retirado para o próximo tubo, configurando a diluição 10⁻³, e esse processo foi repetido sucessivamente até alcançar a diluição 10⁻⁵.

Realizou-se o plaqueamento das diluições que variaram de 10⁻² até 10⁻⁵. Nesse procedimento, adicionou-se 0,1 ml das diluições preparadas anteriormente às placas de Petri contendo ágar MacConkey. A distribuição uniforme das diluições sobre as placas foi realizada utilizando uma alça de Drigalski, e após a distribuição uniforme as placas foram identificadas e levadas para estufa bacteriológica à uma temperatura de 35°C por um intervalo de 24h. Passando o intervalo de incubação, as placas foram analisadas e avaliadas de acordo com a presença de crescimento bacteriano.

A partir dos resultados da diluição seriada, foi selecionada a placa com a maior diluição que ainda apresentou crescimento bacteriano, sendo utilizada para a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), conforme descrito por Tortora *et al.* (2019). As contagens foram realizadas considerando os agregados bacterianos e expressas em UFC por grama de solo seco. Para corrigir os valores em relação à umidade, 10 g de solo foram secas em estufa a 105 °C por 48 horas. Após secagem total, uma nova pesagem permitiu calcular a umidade e ajustar os valores de UFC. Também foram considerados os fatores de diluição e o volume pipetado, garantindo a padronização dos resultados. Duas colônias por placa foram selecionadas e inoculadas em tubos contendo 5 ml de caldo Muller Hinton. O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar previamente higienizada com álcool 70% e exposta à luz UV por 5 minutos. A transferência das colônias foi feita com alça de platina esterilizada e resfriada, e os tubos foram devidamente identificados e incubados a 35 °C por 6 horas para o crescimento bacteriano.

O perfil de resistência dos isolados bacterianos foi avaliado pelo método de disco-difusão de Kirby-Bauer (1966), conforme diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2018). Foram testados três antibióticos, agrupados da seguinte forma: Ampicilina (10 µg, grupo A), Ciprofloxacina (5 µg, grupo B) e Tetraciclina (30 µg, grupo C), todos indicados no tratamento de infecções por Enterobacteriaceae. Os isolados foram classificados como sensíveis, intermediários ou resistentes.

A análise univariada foi utilizada para avaliar a quantidade de coliformes e sua resistência a antibióticos em função da sazonalidade e ponto de amostragem. Os pontos e datas de coletas foram consideradas como fonte de variação, em um delineamento inteiramente casualizado em fatorial duplo. Os dados foram submetidos à ANOVA, através do teste F, e caso diferenças significativas entre as medias fossem encontradas, a separação feita pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) com auxílio dos programas GspDex e SISVAR.

3 RESULTADOS

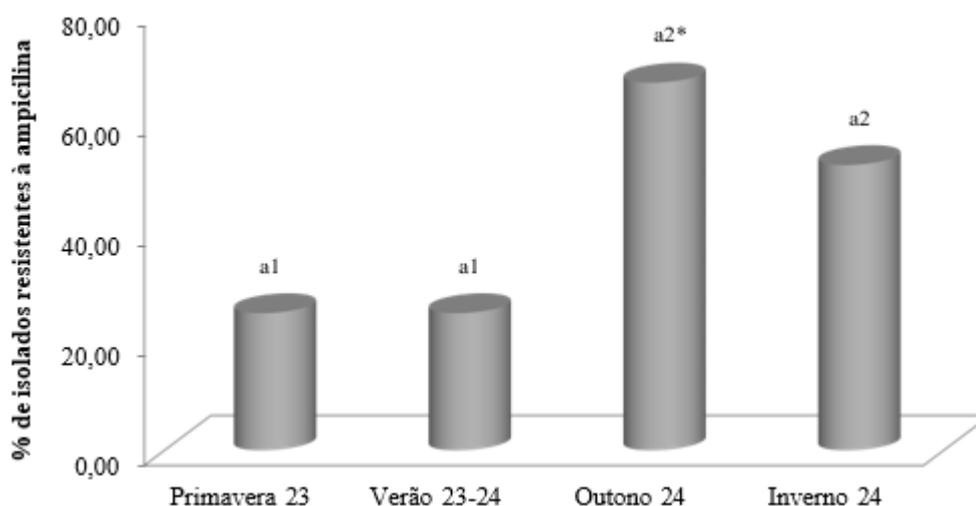
A quantidade de coliformes termotolerantes no solo foi estatisticamente igual entre locais e entre estações do ano, com média geral de 2.254.680 UFC g⁻¹ de solo seco (~Pr>F_c=0,53618). Esse é um aspecto preocupante, porque evidencia que a contaminação do

solo por esse grupo de bactérias ocorreu de maneira constante ao longo do ano, em todos os solos, independente do seu uso ou da sua cobertura vegetal.

A porcentagem de isolados resistentes aos três antibióticos avaliados foi igual entre os locais ($Pr > Fc = 0,91944$). Foi observado efeito estatístico apenas da estação do ano, ou seja, em função da coleta realizada, em relação à ampicilina ($Pr > Fc = 0,00009$), ciprofloxacino ($Pr > Fc = 0,00306$) e tetraciclina ($Pr > Fc = 0,025539$)

As maiores médias de isolados resistentes à ampicilina foram observadas no outono e no inverno (Figura 1).

Figura 1 - Porcentagem de isolados resistentes à ampicilina em coletas realizadas em quatro estações do ano entre 2023 e 2024.



* Médias seguidas pelas mesmas combinações de letras e números não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Observou-se aos resultados dos dados a presença de bactérias multirresistentes, detectadas nas coletas 2, 3 e 4 que é o período de outono e inverno, nos pontos 8 e 11, correspondentes às áreas de Floresta Secundária e Plantio de Pinus adulto. Outra observação foi que mesmo dentro do mesmo ponto (ponto 11), houve variações na resistência e UFC entre as repetições, indicando possível heterogeneidade das cepas bacterianas.

4 DISCUSSÃO

A uniformidade na quantidade de coliformes termotolerantes entre os locais e estações do ano ($Pr > Fc = 0,53618$), com média geral de 2.254.680 UFC g^{-1} de solo seco, revela uma contaminação constante nos solos. Isso sugere que mesmo áreas com menor manejo direto não estão livres da presença de microrganismos potencialmente patogênicos. Esses dados se relacionam com estudos que apontam para a ampla dispersão ambiental de coliformes, inclusive em áreas naturais ou restauradas (Rizzo *et al.*, 2013; Wellington *et al.*, 2013).

A ausência de diferença estatística entre os locais para ampicilina ($Pr > Fc = 0,91944$) indica que a resistência bacteriana é amplamente distribuída, e não limitada a áreas de uso mais intensivo. No entanto, o efeito significativo da estação do ano sobre a resistência à ampicilina ($Pr > Fc = 0,00009$), ciprofloxacino ($Pr > Fc = 0,00306$) e tetraciclina ($Pr > Fc = 0,025539$), mostra que as estações do ano influenciam o comportamento das bactérias no solo, favorecendo a presença de microrganismos mais resistentes em determinados períodos. Inclusive foi observado bactérias multirresistentes em ambientes florestais como floresta secundária e o plantio adulto de *Pinus*, principalmente nas estações de outono e inverno, nesse período as condições do ambiente favorecem a sobrevivência de bactérias mais resistentes, seja por maior estabilidade dos antibióticos no ambiente ou menor competição microbiana. Estudos anteriores também destacam que condições ambientais como temperatura e umidade influenciam a persistência e transferência de genes de resistência no solo (Baquero *et al.*, 2008; Cytryn, 2013).

A presença contínua de bactérias multirresistentes em solos florestais, pode estar relacionada a diversas rotas de contaminação, como o uso de fertilizantes orgânicos, manejo florestal ou até transporte por fauna silvestre (Graham *et al.*, 2016). Isso reforça a ideia de que áreas florestais podem atuar como reservatórios ou vias de disseminação de bactérias resistentes, representando um risco ecotoxicológico crescente.

Esses achados evidenciam a necessidade de incluir áreas florestais em programas de monitoramento de resistência antimicrobiana, considerando que essas regiões também estão inseridas em uma matriz ambiental influenciada por ações humanas diretas e indiretas.

5 CONCLUSÃO

A presença de bactérias multirresistentes em áreas florestais, incluindo ambientes como

Realização

**SIMPÓSIO
INTER
NACIONAL**



Financiamento



fapesc
Fundação de Amparo à
Pesquisa e Inovação do
Estado de Santa Catarina

Apoio



floresta secundária e plantios de *Pinus*, revela que mesmo ecossistemas considerados de menor impacto antrópico podem atuar como importantes reservatórios de resistência antimicrobiana. A constância dos coliformes termotolerantes e a detecção de isolados resistentes aos três antibióticos testados evidenciam uma contaminação disseminada e persistente, possivelmente ligada a fontes externas como manejo florestal, uso de insumos orgânicos e escoamento de água contaminada. Esses resultados reforçam a urgência de incluir ambientes florestais nos programas de vigilância da resistência bacteriana, reconhecendo que a disseminação de genes de resistência não está restrita a áreas agrícolas ou urbanas, mas pode atingir regiões naturais por meio de conexões ecológicas complexas e influências sazonais.

REFERÊNCIAS

ANSELMO, A. P. *et al.* Bactérias resistentes em alimentos escolares. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 519–528, 2016. DOI: 10.1590/1678-98652016000400010.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 260–265, 2008. DOI: 10.1016/j.copbio.2008.05.006.

CAUMO, S. *et al.* Presença de coliformes em fontes utilizadas para irrigação de hortaliças. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 1, p. 85–91, 2010.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-eighth informational supplement M100-S28**. Wayne: CLSI, 2018.

COSTA, R. A. *et al.* Uso de antibióticos e resistência bacteriana. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 8, p. 2721–2730, 2017. DOI: 10.1590/1413-81232017228.01552017.

CYTRYN, E. The soil resistome: the anthropogenic, the native, and the unknown. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 63, p. 18–23, 2013. DOI: 10.1016/j.soilbio.2013.03.009.

GRAHAM, D. W. *et al.* Antibiotic resistance gene abundances associated with waste discharges to the environment: a meta-analysis. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 14, p. 7740–7749, 2016. DOI: 10.1021/acs.est.6b00288.

JAMIESON, R. *et al.* Persistence of enteric bacteria in alluvial streams. **Water Research**, v. 36, n. 10, p. 2653–2662, 2002. DOI: 10.1016/S0043-1354(01)00450-4.

JAMIESON, R. C. *et al.* Transport and survival of fecal bacteria in agricultural soils. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 82, n. 2, p. 385–395, 2002. DOI: 10.4141/S01-056.

KIRBY, W. M. M.; BAUER, A. W. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493–496, 1966.

KRAEMER, S. A. *et al.* Antibiotic pollution in the environment: from microbial ecology to public policy. **Microorganisms, Basel**, v. 7, n. 6, p. 180, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7060180.

MARTINS, J. C. *et al.* Resistência antimicrobiana em bactérias ambientais: uma abordagem de saúde única. **Revista Ciência & Saúde**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2020.

RIZZO, L. *et al.* Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. **Science of the Total Environment**, v. 447, p. 345–360, 2013. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

WELLINGTON, E. M. H. *et al.* The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 155–165, 2013. DOI: 10.1016/S1473-3099(12)70317-1.

WHO. World Health Organization. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Geneva: WHO, 2014.