

## **Análise do decaimento de patógenos (indicadores de *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*) no solo ao longo do tempo devido a utilização de água de reúso.**

Rodrigo Bezerra Da Silva <sup>1</sup>  
Natasha Berendonk Handam <sup>2</sup>  
Adriana Sotero Martins <sup>3</sup>

**Saúde Ambiental**

### ***Resumo***

A água de reúso é definida como a reutilização de águas, estas provenientes de efluentes tratados. Este trabalho busca avaliar o decaimento de bactérias (*Escherichia coli* e *Salmonella spp.*) no solo irrigado com água de reúso, visando a utilização na agricultura. Neste experimento foi coletada amostra de água de reúso proveniente de Estação de Tratamento de Esgoto e cloração. Para verificar o decaimento de *Escherichia coli* usou-se o método de Membrana Filtrante com o meio de cultura cromogênico indicador Chromocult® Coliform Agar. Para a análise de *Salmonella spp.* foi utilizado o meio de cultura SS e para elaborar as curvas de decaimento ao longo do tempo usou-se o programa Sigmaplot. Cada grupo experimental foi composto por 4 vasos (irrigados com água de reúso e outro grupo irrigado com água potável) sendo dois contendo cobertura vegetal e dois vasos contendo apenas solo. Os resultados mostraram que em cultivos irrigados com água de reúso, o tempo de sobrevivência de *Salmonella spp.* foi o dobro em comparação aos irrigados com água potável. O tempo de sobrevivência da *E. coli* não variou entre os grupos. Nos vasos com solo nu os irrigados com água de reúso sem contaminação artificial mostraram um decaimento de *Salmonella spp.* mais rápido em relação aos irrigados com contaminação artificial. Para garantir a segurança da água de reúso para o reúso agrícola é fundamental a criação de legislação nacional específica, a fim de que cada estado possa cumprir com a lei, e assim evitar danos à saúde humana e ambiental.

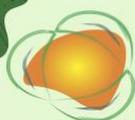
**Palavras-chave:** água de reúso, reúso agrícola, saúde coletiva, análise de decaimento de microrganismos.

---

<sup>1</sup> Graduando do Curso de Ciências Biológicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Campus Maracanã, [Rodrigobezerra2@gmail.com](mailto:Rodrigobezerra2@gmail.com)

<sup>2</sup> Doutoranda do Programa de Saúde Pública e Meio Ambiente – ENSP/FIOCRUZ - [natashabhandam@gmail.com](mailto:natashabhandam@gmail.com)

<sup>3</sup> Dra. Pesquisadora do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental - DSSA/ENSP/FIOCRUZ - [adrianasotero@ensp.fiocruz.br](mailto:adrianasotero@ensp.fiocruz.br)



## INTRODUÇÃO

Atualmente, no Brasil e no Mundo, observam-se vários exemplos da utilização de água de reúso na agricultura (MANCUSO e SANTOS, 2013). A água de reúso é definida como a reutilização de águas, estas provenientes de efluentes tratados (MORAIS et al., 2016). A agricultura é a atividade econômica que mais demanda água, e devido à escassez das fontes hídricas para esta atividade em diversas regiões, a água de reúso se torna uma alternativa para enfrentamento desse problema (URKIAGA et al., 2008).

Esta alternativa traz diversos benefícios à agricultura como fonte de nutrientes que auxiliam o crescimento de cultivos, entretanto deve-se ter segurança da qualidade sanitária para não prejudicar a saúde humana e ambiental. Este tipo de água pode conter micropoluentes, tais como produtos químicos e microorganismos, podendo oferecer riscos à saúde pública e ambiental. A utilização da água de reúso na microbiota do solo pode ou não beneficiar microrganismos, variando de acordo com a quantidade aplicada e composição da água de reúso. Quando aplicada em alta quantidade e possuir uma grande carga de nutrientes como fósforo e nitrogênio, patógenos, metais pesados e antibióticos, o solo não consegue realizar a sua função de reciclabilidade, e assim pode alterar as características do solo (LIU et al., 2013).

A análise de decaimento visa verificar o tempo de vida de microrganismos em uma dada localidade. As condições de sobrevivência dos microrganismos variam em função de alguns fatores e estímulos externos dependendo do ambiente onde vivem. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar o decaimento de bactérias (*Escherichia coli* e *Salmonella spp.*) no solo irrigado com água de reúso, visando a utilização na agricultura, garantindo a saúde pública e ambiental.

## METODOLOGIA

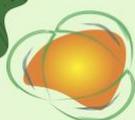
Para esse experimento foi coletada amostra de água de reúso, sendo denominada de amostra de água de reúso “clorada” - proveniente de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) e depois foi clorada, origem cidade do Rio de Janeiro, RJ.

Em torno de 5 litros de água de reúso foi coletada em galão, que possui a composição de polipropileno, devidamente esterilizados (sabão extran 5%; enxágue 10 vezes, para total remoção do sabão; rinsagem com acetona P.A.; enxágue 5 vezes com água deionizada; rinsagem com etanol P.A.; enxague 3 vezes com água deionizada). Foi transportada para o laboratório dentro de caixa refrigerada, contendo placa de gelo para melhor conservação.

Para realização desse trabalho foi construído um sistema especificamente para cultivo em bancada em laboratório, com temperatura (24 °C), e iluminação controlados, com gotejamento direcionado para irrigação dos vasos. Foram utilizados vasos de vidro esterilizados, que tinham uma pequena abertura na parte inferior para o escoamento da água inserida (água de rega), sendo colocado em cada um 320 g de solo. Todos os vasos continham solo proveniente do mesmo fornecedor, da cidade de Ihauma, Minas Gerais, MG. E o gotejamento foi controlado, de modo a fornecer a irrigação de 10 mL de água ao longo do dia, sempre mantendo o solo úmido. Cada grupo experimental foi composto por 4 vasos (irrigados com água de reúso e outro grupo irrigado com água potável).

Foi realizada análise de decaimento de patógenos sendo avaliados os indicadores *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* (FARIA, 2015). Em cada grupo experimental (irrigados com água de reúso e outro grupo irrigado com água potável) serão dois contendo cobertura vegetal, e dois vasos contendo apenas solo (grupo reúso e controle).

Durante cinco dias foi feito acréscimo de suplemento de microrganismos exógenos (*Escherichia coli* e *Salmonella spp*) ao solo, ou seja, proveniente da água de reúso sem contaminação artificial e água de reúso com contaminação artificial; e água potável com sua própria microbiota, e água potável com contaminação artificial. O procedimento foi realizado por meio de pipetagem externa com a carga conhecida de 5 UFC/mL totalizando 25 UFC/ml de microrganismos em cada um dos seguintes vasos: dois vasos do grupo do



reúso, sendo um com planta e outro apenas solo, e dois vasos do grupo controle, sendo um com planta e outro apenas solo.

No primeiro dia de acompanhamento do decaimento (após o período de suplementação, no 8º dia [T=0] foi feita a irrigação com 70 mL de água destilada em todos os vasos, e foi realizada a coleta de água de rega (água coletada que passou pelo solo após irrigação). Depois foram feitas coletas de amostras de solo, depois na 1ª, 2ª, 4ª, 6ª, 8ª, 10ª, 11ª, 14ª, 16ª, 18ª e 20ª semanas. O experimento teve acompanhamento de 140 dias e os vasos foram regados com água destilada por gotejamento.

A metodologia para verificar *Escherichia coli* foi realizada conforme o Manual da Merck (2010), utilizando o meio de cultura cromogênico indicador Chromocult® Coliform Agar (Cat. No. 1.10426.0100/500 Merck). Este foi realizado combinado com o método de Membrana Filtrante descrito em Standard Methods for the Examination of the Water and Wasterwater (APHA, 2012). E a análise de *Salmonella spp.* foi através do meio de cultura SS, sendo este o meio em que a *Salmonella spp.* aparece em maior número. Os dados da contagem das colônias de *E. coli* e *Salmonella spp.* foram inseridos em planilha Excel, considerando as diluições nos cálculos estatísticos. Foram feitas curvas de decaimento de *Escherichia coli* e de *Salmonella spp.* ao longo do tempo, utilizando o programa Sigmaplot 10.0. (PEREIRA et al., 2014).

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no SisGen sob o nº AAC8F2F, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto ao resultado da análise de decaimento de *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* no solo, no vaso com cultivo da hortalíça *Petroselinum sativum* (*salsa*) irrigado com água de reúso com contaminação artificial foi observado o tempo de decaimento de *E. coli* e *Salmonella spp.* de 106 e 91 dias, respectivamente. Enquanto que o cultivo irrigado com água potável (controle) com contaminação artificial foi observado o tempo de decaimento de *E. coli* e *Salmonella spp.* de 106 e 35 dias, respectivamente (**Figura 1**). Mostrando que o tempo de sobrevivência de *E. coli* foi similar tanto no vaso irrigado com água de reúso

quanto com água potável.

Em relação aos vasos com cultivos da hortaliza *Petroselinum sativum* que não tiveram contaminação artificial, no vaso irrigado com água de reúso foi verificado tempo de decaimento de *E. coli* e *Salmonella spp.* de 120 e 106 dias, respectivamente. Enquanto que o cultivo irrigado com água potável o tempo de decaimento foi de *E. coli* e de *Salmonella spp.* 120 e 63 dias, respectivamente (**Figura 2**).

Pode-se verificar que os tempos de decaimento de *Salmonella spp.* nos cultivos irrigados com água de reúso foram mais demorados em comparação com os cultivos irrigados com água potável. Em média o tempo de decaimento nos irrigados com água de reúso foi de 98 dias ( $\pm 10$ ), e nos vasos irrigados com água potável teve tempo médio de 49 dias ( $\pm 19$ ), ou seja, o dobro do tempo, demonstrando que a água de reúso pode estar contribuindo para a sobrevivência do gênero, pois pode conter também na própria microbiota da amostra de água de reúso a presença de *Salmonella spp.* Além disso, provavelmente pode oferecer mais nutrientes ao solo, o que favorece diretamente na manutenção da sobrevivência da microbiota. Portanto, por conta do gênero *Salmonella spp.*, para utilização de água de reúso na irrigação da agricultura, precisaria de um tempo maior de interrupção entre o período de irrigação e colheita, para que não cause agravos à saúde do agricultor que vai manusear o solo. O tempo de sobrevivência da bactéria *E. coli* foi maior em comparação com a *Salmonella spp.*, e não teve distinção em relação a irrigação com água potável. Em média o tempo de decaimento nos vasos irrigados tanto com água de reúso quanto com água potável foi de 113 dias ( $\pm 9,8$ ).

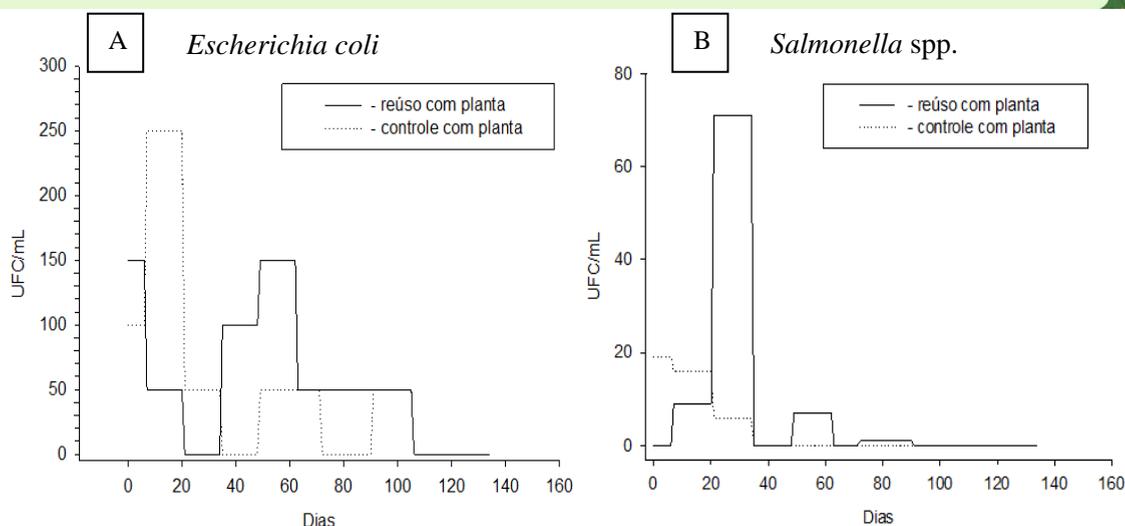
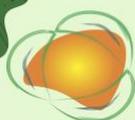


Figura 1 – Resultado da análise de decaimento de (A) *Escherichia coli* (UFC/mL) e (B) *Salmonella spp.* nos cultivos de planta com suplementação artificial de *E. coli* e *Salmonella spp.*, irrigados com água de reúso e com água potável (controle).

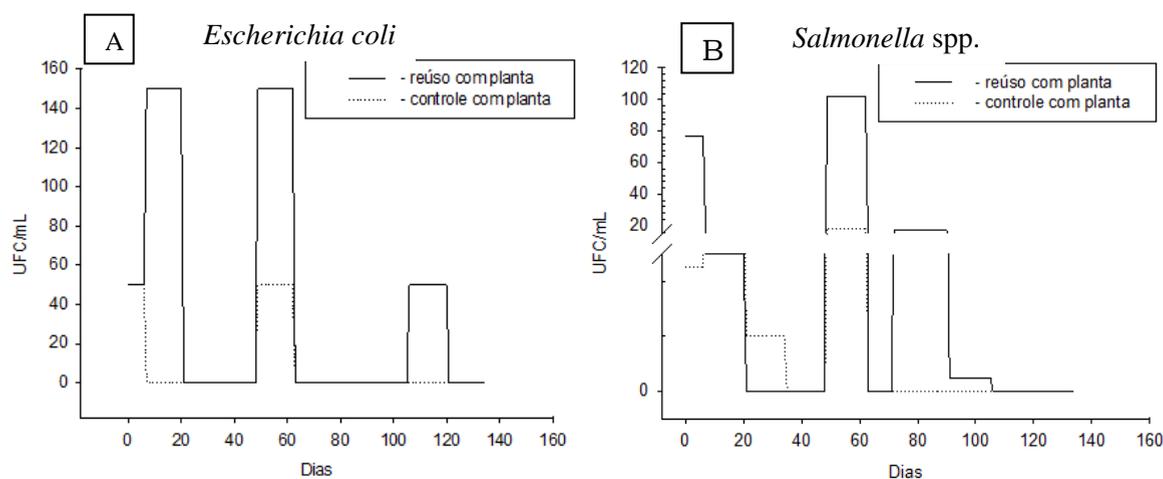


Figura 2 – Resultado da análise de decaimento de (A) *Escherichia coli* (UFC/mL) e (B) *Salmonella spp.* nos cultivos de planta, sem suplementação, irrigados com água de reúso e com água potável (controle).

Sobre o resultado da análise de decaimento no vaso com solo apenas (solo nu) irrigado com água de reúso com contaminação artificial foi observado o tempo de decaimento de *E. coli* e *Salmonella spp.* de 106 e 35 dias, respectivamente. Enquanto que

o vaso com solo nu irrigado com água potável com contaminação artificial foi verificado tempo de decaimento de *E. coli* e *Salmonella spp.* de 134 e 63 dias, respectivamente (**Figura 3**).

Em relação aos vasos com solo nu que não tiveram contaminação artificial, no vaso irrigado com água de reúso foi verificado tempo de decaimento de *E. coli* e *Salmonella spp.* de 106 e 21 dias, respectivamente. Enquanto que o cultivo irrigado com água potável o tempo de decaimento foi de *E. coli* e de *Salmonella spp.* 134 e 21 dias, respectivamente (**Figura 4**).

Em média o tempo de decaimento de *Salmonella spp.* nos irrigados com água de reúso foi de 28 dias ( $\pm 9,8$ ), e nos vasos irrigados com água potável teve tempo médio de 42 dias ( $\pm 29,6$ ). O tempo médio de decaimento de *E. coli* nos solos irrigados com água de reúso foi de 106 dias ( $\pm 0$ ), e nos irrigados com água potável teve tempo médio de 134 dias ( $\pm 0$ ).

Observa-se que o tempo de decaimento de *Salmonella spp.* nos vasos com solo apenas, que não foram contaminados artificialmente foi mais rápido em comparação com os vasos contaminados artificialmente, com tempo médio de 21 dias. O tempo de decaimento de *Salmonella spp.* nos vasos com solo nu também foi menor em comparação com vasos com cultivos de hortaliça *Petroselinum sativum* (salsa). Isto pode ser devido a maior incidência de luminosidade direta no solo, assim como de infiltração de água, o que diminui o tempo de sobrevivência desses microrganismos no solo.

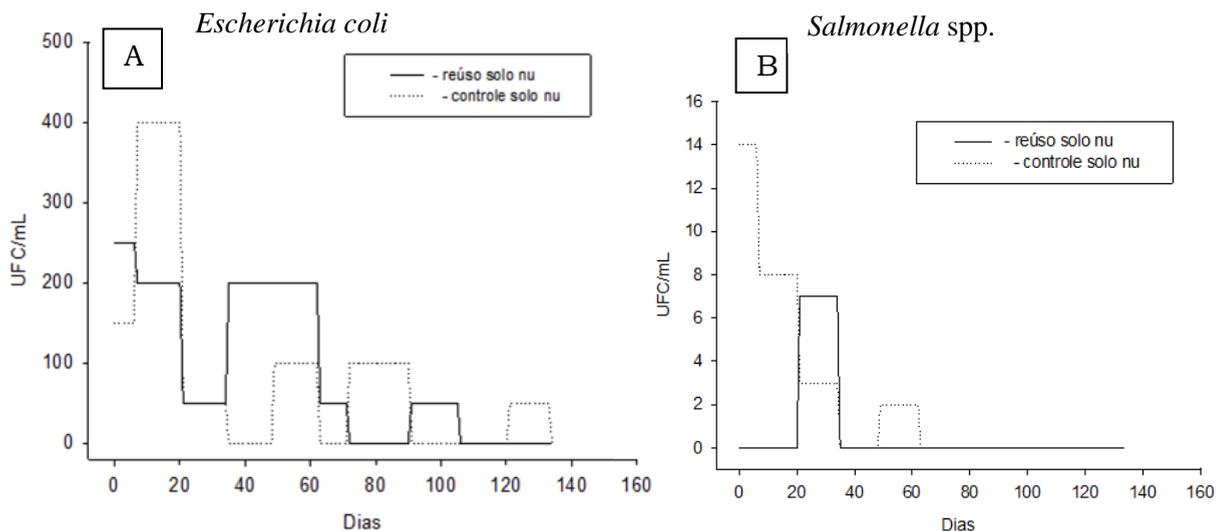
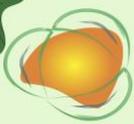


Figura 3 – Resultado da análise de decaimento de (A) *Escherichia coli* (UFC/mL) e (B) *Salmonella spp.* nos vasos com apenas solo, com suplementação artificial de *E.coli* e *Salmonella spp.*, irrigados com água de reúso e com água potável (controle).

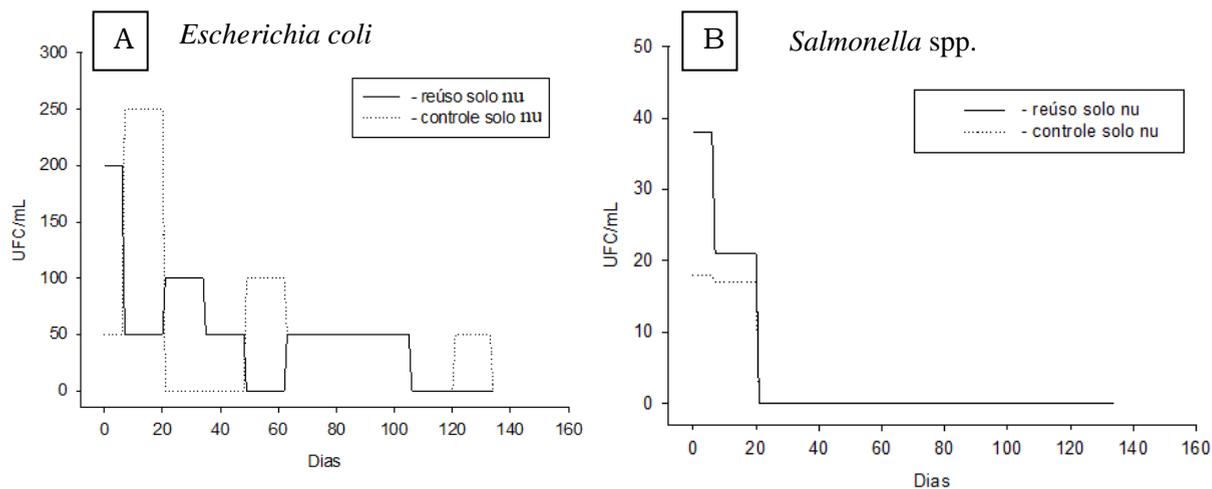


Figura 04: Resultado da análise de decaimento de (A) *Escherichia coli* (UFC/mL) e (B) *Salmonella spp.* (UFC/mL) nos vasos com apenas solo, sem suplementação, irrigados com água de reúso e com água potável (controle).

Zaleski et al. (2005) verificou em estudo um tempo de sobrevivência de *Salmonella*

*spp.* entre duas e três semanas no solo. Isso corrobora com os vasos com solo apenas sem contaminação artificial, que apresentaram decaimento de 21 dias. No entanto Thomaz-Soccol et al. (2010) verificou que o tempo de sobrevivência da *Salmonella spp.* no solo pode variar de menos de uma semana a até seis meses, dependendo das condições de umidade e temperatura a que este microrganismo está exposto.

No vaso com planta (figura 4 b) e no vaso com solo nu (Figura 6 b), irrigados com água de reúso com contaminação artificial não foi possível começar a análise de decaimento desde a primeira semana, pois apresentou ausência de *Salmonella spp.* No entanto, considerando que na segunda semana foram verificadas nesses vasos as presenças e aumento desses microrganismos, foi verificado que o decaimento foi similar ao verificado nos vasos com cultivo em relação aos vasos com solo nu, ocorrendo em 84 e 28 dias, respectivamente, de acompanhamento após sua presença.

Em estudo de Faria (2015) foram observados picos de acréscimo e decréscimo na contagem de *Salmonella spp.* ao longo do tempo, como foi verificado na maioria dos vasos do presente estudo.

A quantificação da bactéria *Escherichia coli* nos cultivos com a salsa no presente estudo apresentou picos de acréscimos e decréscimo durante as semanas estudada após o início do experimento. Os picos de acréscimos de *E. coli* podem ser justificados segundo Faria (2015) pela mudança de comportamento do gênero quando exposto aos fatores ambientais impostos. Segundo Edmonds (1976) a mortalidade desses microrganismos está diretamente relacionada com fatores como temperatura, umidade, pH, composição física do solo e competição microbiana. Dessa forma, os fatores ambientais de forma controlada do laboratório sobre os cultivos, pode ter favorecido a manutenção da *E. coli* no solo. SCHERER (2016) sugere que a irrigação de hortaliças com águas que apresentam altos níveis de coliformes podem contribuir para o aumento ou manutenção da população de microrganismos. Isto corrobora com o estudo, pois os vasos irrigados com água de reúso tiveram níveis de *E. coli* mais elevados em comparação ao grupo controle.



## CONCLUSÕES

Os resultados sobre análise de decaimento de *Salmonella spp.* nos cultivos de *Petroselinum sativum* (salsa), demonstram que o tempo de sobrevivência desses microrganismos foi o dobro em cultivos irrigados com água de reúso em comparação com os irrigados com água potável. A água de reúso pode estar influenciando na manutenção das bactérias oferecendo mais nutrientes, além disso, provavelmente, havia a presença de *Salmonella spp.* na própria amostra de água de reúso, favorecendo a sobrevivência do gênero. Enquanto que o tempo de sobrevivência da *E. coli* foi maior em comparação com a *Salmonella spp.*, e não variou em relação a irrigação com água potável. Para utilização de água de reúso na agricultura, o estudo mostrou que se deve ter um maior tempo de interrupção entre o período de irrigação e colheita para que não cause danos a saúde dos agricultores.

Os resultados encontrados nos vasos com solo nu demonstram que os irrigados com água de reúso sem contaminação artificial mostram um tempo de decaimento mais rápido de *Salmonella spp.* em relação aos irrigados com contaminação artificial. O decaimento foi mais acelerado também em comparação aos vasos com cobertura vegetal. Isto pode indicar que a incidência de luminosidade direta no solo, assim como a infiltração de água, devido à falta de cobertura vegetal diminui em maior velocidade o tempo de sobrevivência desses microrganismos no solo.

Diante disso, o estudo reforça a importância da forma de tratamento e produção de água de reúso para que a mesma possua qualidade para utilização segura, e que não afete a saúde pública e ambiental. Para uma avaliação da qualidade que possa garantir a segurança de água de reúso para utilização na irrigação da agricultura é fundamental a criação de legislação a nível nacional para reúso agrícola, que contenha origem desta água, os padrões

de qualidade sanitária, e formas de tratamento para sua produção, a fim de que em nível nacional cada Estado possa cumprir com a lei, e assim evitar danos à saúde humana e ambiental.

## A GRADECIMENTOS

Ao Programa de Apoio à Pós Graduação da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – PROAP / CAPES; ao CNPQ pelo financiamento da bolsa PIBIC; ao Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - ENSP/FIOCRUZ; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ; e ao Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - Universidade do Estado do Rio de Janeiro - IBRAG/UERJ.

## R REFERÊNCIA

APHA, American Public Health Association, **Standard methods for examination of water and waste water**. 22th ed. Washington: 2012.

DE FARIA, M. F. **Avaliação da persistência de microrganismos patogênicos em solo cultivado com eucalipto e fertilizado com lodo de esgoto sanitário**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2015.

EDMONDS R. L. (1976). **Survival of coliform bacteria in sewage sludge applied to a forest clearcut and potential movement into groundwater**. *Applied and environmental microbiology*, 32(4), 537–546. <https://doi.org/10.1128/AEM.32.4.537-546.1976>.

LIU, L. et al. **Potential effect and accumulation of veterinary antibiotics in *Phragmites australis* under hydroponic conditions**. *Ecol. Eng.*, v. 53, p. 138–143. 2013.

MANCUSO, P. C. S.; SANTOS H. F. **Reúso de Água**. Barueri, SP: Manole, 2013.

MORAIS, M. A. et al. Contaminação microbiológica no perfil do solo por águas residuárias. *Holos*, v. 3, p. 76, 23 jun. 2016.



PEREIRA, M. S. et al. **Decaimento de Bactérias do Grupo Coliformes em Solos com Cobertura Vegetal e Nu.** Revista Engenharia na Agricultura - REVENG, v. 22, n. 6, p. 575-582, 31 dez. 2014.

SCHERER, Karine et al. **Avaliação bacteriológica e físico-química de águas de irrigação, solo e alface** (*Lactuca sativa* L.). Rev. Ambient. Água, Taubaté, v. 11, n. 3, p. 665-675, 2016.

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. **Organismos patogênicos presentes em lodo de esgoto a ser aplicado no solo e a Resolução nº 375 do CONAMA.** In: COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. **Uso agrícola do lodo de esgoto: avaliação após a Resolução nº 375 do CONAMA.** Botucatu: FEPAF, 2010. p. 83-111.

URKIAGA, A. et al. **Development of analysis tools for social, economic and ecological effects of water reuse.** *Desalination*. 218:81-91. 2008.

ZALESKI, K. L. et al. **Potential regrowth and recolonization of Salmonella and indicators in biosolids and biosolid amended soil.** *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 71, pp. 3701-3708, 2005.