

Eixo Temático ET-08-013 - Poluição Ambiental

DETERMINAÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL DE ANTIBIÓTICOS FRENTE À FLORA BACTERIANA DO SOLO

Cleydson Moises da Silva, Thamiris Silva Bezerra de Sousa, Luiza Feitosa Cordeiro de Souza, Risonildo Pereira Cordeiro

Centro Universitário Tabosa de Almeida - ASCES-UNITA. Programa de Iniciação Científica.

RESUMO

Os medicamentos têm como papel principal melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Porém, seu descarte inadequado vem gerando impactos para o meio ambiente, como por exemplo, um desequilíbrio na microbiota do solo. Dentre esses microorganismos, as bactérias são as mais encontradas, elas tanto ajudam na fertilização do solo como podem causar doenças se ingeridas pelos seres humanos. Por se multiplicarem rapidamente, fazendo com que se adaptam mais rápido aos impactos ambientais ficando mais difícil de combatê-las, gerando a resistência. Com isso, o objetivo do estudo foi determinar o impacto de antibióticos na multiplicação e desenvolvimento de bactérias presentes no solo e para isso foram feitas análises bioquímicas (TSI, urease, lisina, Tetra, citrato e catalase) e coloração de gram, para identificação dos grupos existentes, e antibiogramas, para a determinação da resistência. O solo utilizado no estudo foi distribuído em duas caixas. A caixa 1 foi irrigada com água e a caixa 2 com solução contendo o antibiótico Amoxicilina (100 mg/L). A cada 15 dias as análises bioquímicas eram repetidas. Observou-se que a flora era formada de bacilos positivos e, após os 60 dias de irrigação, observou-se a presença de bacilos positivos e negativos. Os testes bioquímicos permaneceram com resultados semelhantes antes e depois do experimento, com exceção do teste de lisina. Neste teste foi possível verificar que após a irrigação, com e sem antibiótico, houve o desenvolvimento de enterobactérias. Ao longo do período de monitoramento das caixas observou-se um aumento da resistência.

PALAVRAS-CHAVE: Microrganismos, Resistência, Antibióticos, bactérias, solo, poluição.

INTRODUÇÃO

A crescente geração de resíduos sólidos está diretamente relacionada com o crescimento populacional e a falta de gerenciamento de descarte dos mesmos. Este tipo de resíduo é composto por materiais orgânicos como resto de alimentos e embalagens de papel, podem ser inorgânicos exemplificados por sacolas plásticas e recipientes de vidro e ainda podem ser biológicos como bactérias, vírus, helmintos, protozoários etc. Dentre eles, alguns compostos se destacam com elevado risco de contaminação no solo, na água e no ar, causando graves alterações na fauna e flora. Eles podem ser completamente digeridos, liberando gases como gás carbônico, metano, gás sulfídrico, dentre outros. Alguns não são digeridos ou são parcialmente digeridos resultando em compostos tóxicos e persistentes no ambiente a longo prazo. Os organismos biológicos presentes no resíduo podem causar doenças, competição, inibição ou até estímulo ao crescimento de outros seres (MAZZER; CAVALCANTI, 2004). Estas reações podem ser observadas em todos os meios, líquido, ar e solo.

O solo é composto de parte sólida, líquida e gasosa, sendo um conjunto de minerais e microrganismos ativos ou inativos, entre outros compostos. Diversos fatores ambientais como a temperatura, pH, salinidade, nutrientes, substratos orgânicos e os elementos tóxicos determinam as espécies presentes neste meio ou eles podem alterar as condições ambientais (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007). Galli em 1964 já descrevia a microbiota do solo. Os microrganismos mais encontrados no solo são os fungos, vírus, bactérias, protozoários e arqueas. Esta diversidade de seres vivos coexistem e participam de vários processos ecológicos servindo de manutenção da fertilidade e da estrutura da terra (MANFIO, 2003). As bactérias, que compõem a microbiota da

terra, têm um papel importante por serem as mais encontradas neste meio, por conter uma acelerada reprodução e mutação genética, pois se adaptam as alterações do solo mais rápido (MICHEREFF et al., 2005). Tais características microbianas estimulam a produção de técnicas mais cuidadosas na indústria de fármacos, visando melhorar seus compostos para evitar ao máximo a contaminação do solo e a mutação genética das bactérias, para que elas não fiquem mais resistentes assim sendo difíceis de combater (GALLI, 1964).

O uso de produtos químicos, como fertilizantes, com a finalidade de acabar com pragas e melhorar a produção na agricultura, podem fragilizar o solo, caso seja aplicado de forma incorreta, reduzindo a fertilidade do mesmo, contaminando rios e lençóis freáticos trazendo graves consequências para a saúde da população e ao meio ambiente (BILLA; DEZOTTI, 2003). De forma semelhante, a aplicação de resíduos sólidos tanto pode auxiliar na fertilização como também torna-lo infértil. Uma classe de resíduos se destaca pela sua complexidade e efeitos tóxicos, são os medicamentos, tanto sobras industriais quanto de uso comercial e doméstico. O mau gerenciamento após o uso gera o descarte inadequado, ocasionando um impacto ao meio ambiente e alterando suas características físico-químicas (BARCELOS et al., 2011). A principal preocupação é com a classe de antibióticos, pois estes medicamentos, se não dosados corretamente, favorecem a formação de resistência bacteriana também conhecida por multiresistência.

A multiresistência bacteriana está ligada a persistência ao uso de antimicrobianos de forma inadequada e seu uso excessivo pela população, com isso, tendo a sua eficácia reduzida, um problema que recentemente vem sendo um desafio, pois novos antimicrobianos precisam ser desenvolvidos (JACOBY, 2008). Medidas devem ser realizadas pelos prescritores para diminuir o risco da resistência, como por exemplo a posologia correta e o uso desta classe como última opção (RIBEIRO; COMARELLA, 2015). Fármacos como linezolida, doripenem, daptomicina entre outros são opções para o tratamento de infecções causadas por microrganismos multiresistentes (QUEIROZ et al., 2012). Quando esses medicamentos foram criados, pensava-se que a maioria dos problemas com as infecções teriam um fim, mas hoje não há uma só bactéria no mundo que não seja resistente a pelo menos dois antibióticos, esse é um problema que sempre deverá ser combatido, porque mesmo consumindo de forma adequada com o tempo a bactéria vai adquirindo resistência e logo o fármaco não fará mais o efeito desejado (OLIVEIRA, SILVA, 2008).

A resistência pode ser definida como a capacidade adquirida por um organismo de resistir aos efeitos de um agente quimioterápico, ao qual ele é completamente susceptível (MADIGAN et al, 2010). Os organismo tem a capazes defesa contra a ação dos antibióticos como serem desprovidos da estrutura de inibição por antibióticos, serem impermeáveis, capazes de modificar o antibiótico, tornando-o inativo, desenvolver uma via metabólica resistente e até bombear o antibiótico para fora da célula (efluxo). Esta resistência pode ser inerente a espécie ou adquirida através de mutações genéticas (plasmídeo R). Vários estímulos ambientais pode provocar o desenvolvimento da resistência nos microrganismos como radiação ultra violeta, exposição a compostos tóxicos abaixo da concentração letal, dentre outros.

Com o uso e descarte inadequado de diversos tipos de antibióticos, muitas vezes sem o acompanhamento de um profissional da área de saúde e ambiental, os princípios ativos desta classe de medicamentos podem atingir o meio ambiente. Estes fármacos em questão podem causar grave desequilíbrio na microbiota do solo, favorecendo o crescimento de uma determinada espécie mais resistente em detrimento de outras. Como cada espécie tem uma função no desenvolvimento das plantas, fixação de nutrientes e decomposição de matéria orgânica, alterações fenotípicas deste grupo podem ocasionar graves desequilíbrios ambientais. Diante do exacerbado, evidencia-se a necessidade de um estudo sobre a alteração fenotípica de microrganismos do solo frente a antibióticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi do tipo descritivo-laboratorial, analítico e observacional. Para verificar o impacto do descarte de antibiótico no solo, um certo material foi selecionado para ser exposto a

antibióticos por um período de 56 dias e, ao longo deste período, a micorbiota do solo foi avaliada.

O solo foi coletado em uma horta do Centro Universitário Tabosa de Almeida (ASCES-UNITA). Este solo é do tipo húmifero e foi analisado pelos seguintes testes bioquímicos: catalase, TSI (*Triple Sugar Iron*), TETRA, citrato, urease e lisina. Testes e coloração de gram e antibiograma foram utilizados para verificar se houve alterações na microbiota e na resistência bacteriana (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

O solo foi distribuído em duas caixas plásticas com capacidade de 24,5L com as dimensões de 33,8 x 54,4 x 19,1 cm (Largura x Comprimento x Altura), no qual foram acondicionado 14kg de solo em cada caixa. As mesmas ficaram expostas ao ar livre, sob uma cobertura transparente para evitar água de chuva. Diariamente eram adicionados 150 mL de água e de solução de amoxicilina 100 mg/L nas caixas 1 e 2, respectivamente. No momento da adição destes líquidos, um revolvimento do solo era realizado. O volume utilizado foi definido por um teste de pote prévio ao experimento e, para a seleção do antibiótico foi levado em consideração o elevado consumo pela população. Para simular uma exposição a longo prazo após um descarte inadequado, utilizou-se uma solução preparada com a dissolução de um comprimido com concentração de 500 mg/g em 2 litros de água, resultando em uma solução de 250 mg/L. Como são descartados materiais vencidos e conjuntamente com outros materiais, existe uma redução da concentração por diluição ou por deterioração. Devido a isto, a concentração utilizada foi a apresentada acima.

A cada 15 dias eram retiradas duas amostras de solo de cada caixa, cerca de 1 g. o material era colocado em um tubo de ensaio e encaminhado para o laboratório. No teste de antibiograma foi utilizado os seguintes antibióticos: nitrofurantoína (Nit), tetraciclina (Tet), penicilina (Pen), norfloxacin (Norf), cefixima (Cef), oxacilina (Oxa), ciprofloxacina (Cipro) e amoxicilina/Ácido clavulânico (Amo).

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Na avaliação dos resultados dos testes bioquímicos, pode se observar qual a característica da microbiota do solo no início do experimento e como ela ficou após o tempo de exposição ao antibiótico amoxicilina. Na Tabela 1, pode-se observados resultados obtidos no início e fim do experimento.

Tabela 1. Resultados dos testes bioquímicos nas duas caixas no início e final do experimento.

	Caixa 1 (controle)		Caixa 2 (antibiótico)	
	Início	Final	Início	Final
Coloração de Gram	Bacilo Positivo	Bacilos Positivo e negativo	Bacilos e cocos Positivos	Bacilos Positivos
Catalase	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Uréia	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
TETRA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Citrato	Positivo	Positivo	Positivo	Positivos
Lisina	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
TSI	Ácido/Ácido	Ácido/Ácido	Ácido/Ácido	Ácido/Ácido
SIM	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

O primeiro teste bioquímico avaliado foi o de coloração de Gram. No solo, no início do experimento, foi encontrado bacilos no controle e bacilos e alguns cocos na caixa com antibiótico, ambos gram positivos. Após os 56 dias de monitoramento, foi observado uma alteração na morfologia. Na caixa irrigada com água foi possível observar estruturas de bacilos gram-positivos e gram-negativas. Na Caixa 2, irrigada com solução de amoxicilina, apenas foram encontrados bacilos gram-positivos. A literatura afirma que os estafilococos são as mais

resistentes no meio ambiente e que podem sobreviver meses em amostras secas. No entanto, os bacilos prevaleceram. Os cocos foram visualizados no início do experimento, mas nos últimos dias não. Vários fatores pode ter comprometido seu desenvolvimento deste grupo como elevada umidade ou competição. Em relação a coloração de Gram, a mudança foi na caixa 1. Nesta caixa após o experimento só foram encontrados gram-positivo. Apesar de as bactérias gram-negativas serem consideradas mais resistentes aos antibióticos, a prevalência neste solo foi das gram-positivas. Todavia, na caixa 1 não foi aplicado antibiótico, logo o domínio das gram-positivas não está associada com resistência.

Nos testes de Catalase, Uréia, TETRA, citrato, TSI e SIM não houve alteração. Os grupos de microrganismos após o experimento apresentavam características semelhantes ao dos grupos iniciais. No teste de lisina houve uma mudança, no início do experimento era negativo e após o final do experimento foi positivo. Neste teste são identificados o grupo enterobactéria. A concentração inicial era muito baixa e, por isso, não detectado nos primeiros ensaios. Ao longo do experimento, este grupo conseguiu se multiplicar a ponto de ser detectados. Alguns testes bioquímicos são necessários para identificar a espécie, no entanto foi possível verificar uma alteração dos grupos ao longo do tempo.

A resistência microbiana foi avaliada através dos testes de antibiograma. Nos gráficos da Figura 1, pode-se ser observado o tamanho dos halos formados nos antibiogramas com a amostra de solo e exposto a diferentes antibióticos. Os halos representam a resistência ao antibiótico. Quanto maior o halo menor maior a resistência do microrganismo ao medicamento. Desde o primeiro dia de experimento os microrganismos testados apresentaram completa resistência aos antibióticos cefixima e oxacilina. Com a Penicilina, os microrganismos foram adquirindo resistência rapidamente e no final do experimento os halos foram zero, representando resistência total.

Na Figura 1 pode-se observar que os microrganismos presentes no solo testado apresentaram menor resistência aos antibióticos Nitrofurantoína, tetraciclina, norfloxacina e ciprofloxacina. Os halos formados no antibiograma foram de tamanhos semelhantes para estes antibióticos e com o controle. Ao longo do tempo de exposição do solo à água com antibiótico, houve uma redução média de 0,09 cm a cada semana, não sendo considerado uma redução significativa para afirmar um aumento na resistência. Estes microrganismos apresentaram elevada resistência aos antibióticos Cefixima e oxacilina. Para estes antibióticos não foi formado halo. Dentre os antibióticos testados, os microrganismos apresentaram resistência intermediária à Penicilina G e à amoxicilina/Ácido clavulânico. Porém ao final do experimento observou-se que os microrganismos aumentaram sua resistência independente do antibiótico e independente do tempo de exposição.

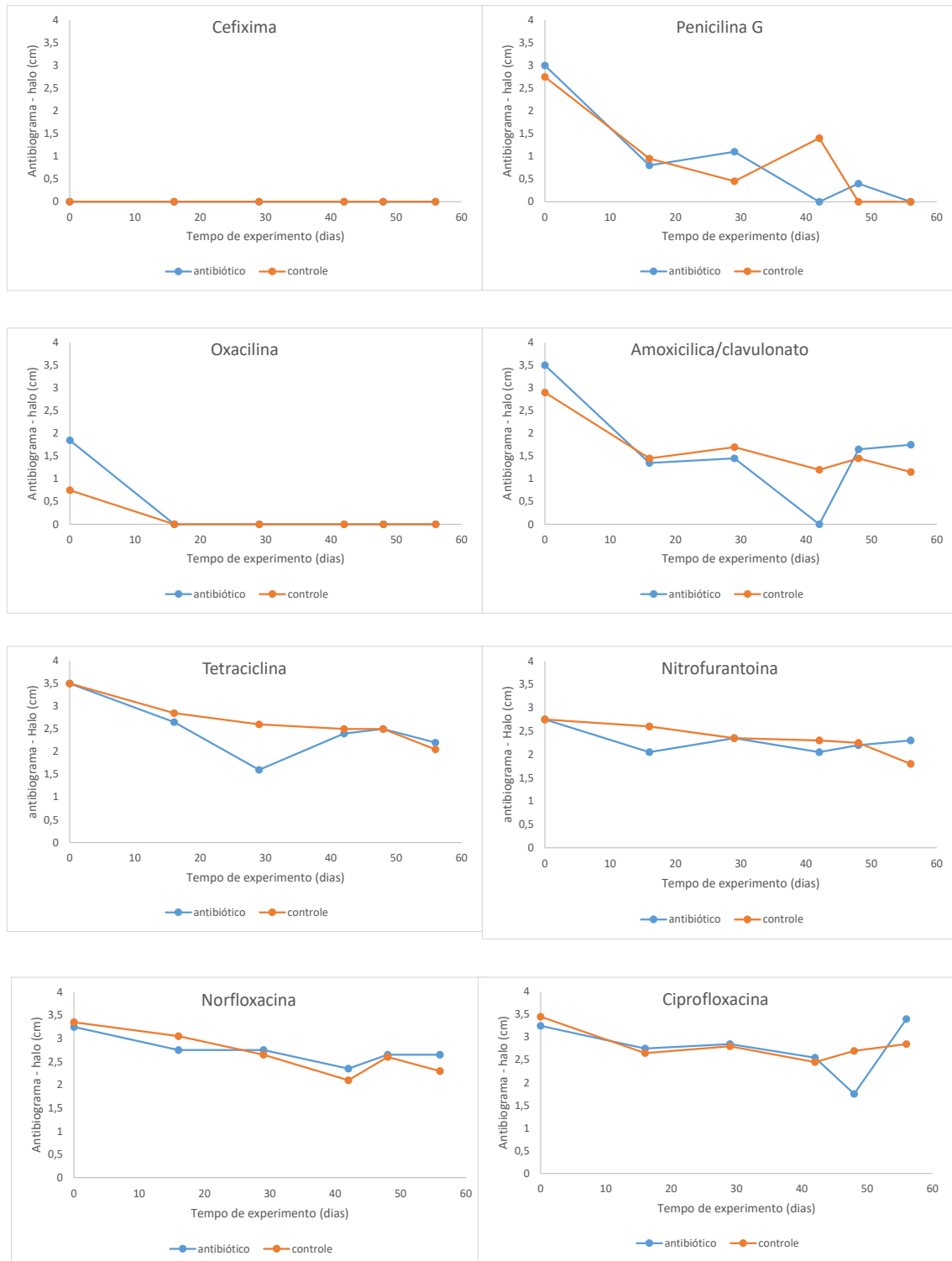


Figura 1. Gráficos dos antibiogramas com diferentes antibióticos ao longo do experimento.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível observar que os antibióticos ocasionaram uma inibição de um grupo de microrganismos, permitindo o desenvolvimento de outras espécies. Nas primeiras amostras foram encontrados apenas bacilos gram positivos, mas com a irrigação com os antibióticos, estes bacilos foram inibidos e grupos de cocos se desenvolveram a ponto de serem quantificados. Nos antibiogramas pode-se observar maior resistência aos antibióticos Cefixima

e oxacilina, sem formação de halos para ambos. Halos pequenos, em média de $0,9 \pm 0,5$ cm, foram observados nos antibiogramas com os antibióticos penicilina G e amoxicilina/ácido clavulânico. Os demais antibióticos testados apresentaram halos médios de $2,4 \pm 0,4$ cm. Os antibióticos alteraram a microbiota do solo inibindo o crescimento de alguns organismos e desenvolvendo a resistência de outros.

REFERÊNCIAS

- ARAUJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores Biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, p. 66-75, 2007.
- BARCELOS, M.N.; PERES, A. P.; PEREIRA, I. O.; CHAVASCO, L. S.; FREITAS, D. F. Aplicação do método fmea na identificação de impactos ambientais causados pelo descarte doméstico de medicamentos. **Engenharia Ambiental**, v. 8, n. 3, p.62-68, 2011.
- BILLA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármaco no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.
- GALLI, F. Microrganismos do solo. **Anais Seção de Fitopatologia e microbiologia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, v. 21, p. 247-252, 1964.
- JACOBY, T, S. **Associação entre o consumo de antimicrobianos e multirresistência bacteriana em centro de terapia intensiva de hospital universitário brasileiro**. Dissertação (dissertação de mestrado em Medicina), Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, 108p. 2008.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologic de Brock**, 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MANFIO, G. P. **Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil. Microbiota**. 1. ed. São Paulo: COBIO/MMA – GTB/CNPq – NEPAM/UNICAMP, 2003. v. 1.
- MAZZER, C; CAVALCANTI, O, A. Introdução à gestão ambiental de resíduos. **Revista Pharmacia Brasileira**, v. 16, n. 11-12, p. 1-11, 2004.
- MICHEREFF, S. J.; DOMINGOS, E. G. T.; ANDRADE, M. M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. 1. ed. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005.
- MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006.
- OLIVEIRA, S.; SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, n. 1, p. 189-197, 2008.
- QUEIROZ, G. M; SILVA, L. M.; PIETRO, R. C. L. R.; SALGADO, H. R. N. Multiresistencia microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 2, p. 132-138, 2012.
- RIBEIRO, J. L.; COMARELLA, L. Bactérias Multirresistentes e Emergência da Resistência tipo New Delhi Metallo- β -lactamase-1 (NDM-1). **Revista Uniandrade**, v. 16, n. 2, p 109-118, 2015.