

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
MESÓFILAS PRESENTES EM PROCESSO
DE COMPOSTAGEM

CAROLINE SEITENFUS SYMANSKI
Bióloga – UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção
do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre – RS
Março de 2005

AGRADECIMENTOS

À Dra. Sueli T. Van Der Sand pela orientação e oportunidade no desenvolvimento deste projeto.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e em especial ao professor Flávio Anastácio de Oliveira Camargo, pela constante troca de experiências.

Ao professor João Henrique Corrêa Kanan, pela utilização do Laboratório de Parasitologia da UFRGS.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia da UFRGS.

Aos funcionários da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro (DMLU), pela parceria estabelecida em prol deste projeto.

À colega de mestrado Sabrina Pinto Salamoni pela grande amizade estabelecida durante o decorrer do curso e pelos ótimos momentos compartilhados dentro e fora do laboratório.

À colega de laboratório Melissa de Azevedo pela ajuda, carinho e incentivo durante a realização deste projeto.

Aos meus pais, Luiz Maximiliano de Almada Symanski e Vera Regina Seitenfus Symanski, irmãos e amigos, pelo incentivo e compreensão durante a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo auxílio financeiro ao longo destes dois anos de pesquisa.

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS MESÓFILAS PRESENTES EM PROCESSO DE COMPOSTAGEM¹

Autor: Caroline Seitenfus Symanski

Orientadora: Sueli T. Van Der Sand

RESUMO

O estudo das populações microbianas presentes em uma leira de compostagem pode gerar valiosas informações que contribuam para o aprimoramento da técnica de compostagem. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da compostagem, como tratamento de resíduos, através da identificação da sucessão bacteriana (bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias facultativas) e da sobrevivência de bactérias potencialmente patogênicas ao longo do processo, além de avaliar a resistência destas populações a antimicrobianos e metais pesados. Amostras do material sendo compostado foram utilizadas para a quantificação de heterotróficos, determinação de coliformes totais e fecais e semeadura em diferentes meios de cultura para identificação bacteriana. Um total de 500 colônias bacterianas foram isoladas e identificadas através de provas bioquímicas. Cada bactéria identificada foi analisada quanto ao seu perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados. O número de heterotróficos oscilou entre $1,3 \times 10^5$ e $2,5 \times 10^7$ UFC/g e o número de coliformes totais e fecais, variou entre $8,0 \times 10^5$ a $2,0 \times 10^4$ e $3,5 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^4$ UFC/g, respectivamente. Entre as 500 colônias isoladas foram identificados 17 diferentes gêneros e, entre eles, 36 espécies. Os gêneros bacterianos que apresentaram um maior número de isolados foram *Enterobacter* (15%), *Escherichia* (14,2%), *Bacillus* (13,4%) e *Pseudomonas* (9,6%). Entre os isolados, 133 apresentaram resistência a 11 antimicrobianos, apresentando maior incidência de resistência a cloranfenicol (51,1%), ampicilina (45%) e tetraciclina (34,6%). Os gêneros que apresentaram maior resistência de incidência a antimicrobianos foram *Enterobacter* (19,5%), *Bacillus* (15,8%), *Escherichia* (15,8%) e *Aeromonas* (12%). O metal pesado no qual os gêneros apresentaram maior tolerância foi o cromo, e a menor, o mercúrio. O gênero que apresentou maior tolerância aos metais foi *Pseudomonas*, e a menor, os gêneros *Corynebacterium* e *Staphylococcus*.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS, Brasil, (100p.).Março,2005.

CHARACTERIZATION OF MESOFILIC BACTERIA IN THE COMPOSTING PROCESS¹

Author: Caroline Seitenfus Symanski

Adviser: Sueli T. Van Der Sand

ABSTRACT

The knowledge of the microbiological process in composting pile could produce very important information and so help to improve the technique. The present study was designed to assess the efficiency of composting as a strategy to treat municipal solid waste by investigating the survival of potentially pathogenic bacterial species throughout the process and also to determine the antimicrobial and heavy metal resistance of the population. Samples from the material that was composting were used for the heterotrophic bacteria quantification, total and faecal coliforms determination and bacteria identification. The total of 500 bacteria were identified and each of them were analyzed for their antimicrobial and heavy metal tolerance profile. The counts of heterotrophic microorganisms ranged between $1,3 \times 10^5$ and $2,5 \times 10^7$ UFC/g and the total and faecal coliforms counts ranged between $8,0 \times 10^5$ and $2,0 \times 10^4$ and $3,5 \times 10^5$ and $1,0 \times 10^4$ UFC/g, respectively. Among of the 500 characterized bacteria, 17 different genera and 36 different species were identified. The prevailing genera were *Enterobacter* (15%), *Escherichia* (14,2%), *Bacillus* (13,4%) e *Pseudomonas* (9,6%). Among all the isolates identified 133 presented resistance against 11 antimicrobial showing the higher incidence of resistance to chloranphenicol (51,1%), ampicilin (45%) and tetracycline (34,6%). The genus that presented higher frequency of resistance were *Enterobacter* (19,5%), *Bacillus* (15,8%), *Escherichia* (15,8%) and *Aeromonas* (12%). The heavy metal that genuses showed the higher tolerance was chromium and the lowest was mercury. The genus that presented the higher tolerance to the metals was *Pseudomonas* and the lower tolerance were the *Corynebacterium* and *Staphylococcus* genus.

¹ Master of Science's Degree Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, (100p.). March, 2005.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. A compostagem.....	4
2.1.2. As fases da compostagem.....	6
2.1.3. Os fatores que influenciam a compostagem.....	8
2.1.3.1. A umidade.....	8
2.1.3.2. A aeração.....	9
2.1.3.3. A temperatura.....	11
2.1.3.4. Os nutrientes (relação C:N).....	12
2.1.3.5. O pH.....	14
2.1.3.6. A dimensão das partículas.....	14
2.1.3.7. Microbiota.....	15
2.2. O composto.....	16
2.3. Resistência a metais pesados.....	19
2.4. Resistência a antimicrobianos.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. O local de amostragem.....	24
3.2. A coleta das amostras.....	24

	Página
3.3. A determinação do pH.....	25
3.4. A determinação da temperatura da leira.....	25
3.5. Determinação da concentração de metal pesado na amostra de compostagem.....	26
3.6. Análises microbiológicas.....	26
3.7. Teste colimétrico.....	26
3.8. Isolamento bacteriano.....	27
3.9. Contagem das Unidades Formadoras de Colônias – UFC por grama de composto.....	28
3.10. Identificação bioquímica das bactérias.....	28
3.11. Determinação da resistência a antimicrobianos.....	30
3.12. Determinação da resistência a metal pesado.....	32
3.13. Extração do DNA plasmidial.....	32
3.14. Análise do perfil plasmidial.....	34
3.15. Análise Estatística.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Determinação do pH.....	35
4.2. Análise da temperatura	36
4.3. A contagem de heterotróficos.....	37
4.4. Análise dos índices colimétricos.....	38
4.5. A identificação microbiana através de provas bioquímicas.	40
4.6. Determinação da resistência a antimicrobianos.....	59

	Página
4.7. Determinação da resistência a metais pesados.....	76
5. CONCLUSÕES	87
6. PERSPECTIVAS.....	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
8. APÊNDICES.....	96

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Principais provas bioquímicas e meios de cultura utilizados na identificação das espécies bacterianas isoladas	30
2. Valores do pH das amostras coletadas em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos e da temperatura média da leira durante o processo.	36
3. Contagem do número de heterotróficos e do índice de coliformes totais e fecais por grama de composto bruto medidos ao longo das coletas de amostras em leira de compostagem.	38
4. Total de gêneros bacterianos e o número de isolados de cada gênero ao longo das coletas realizadas em uma leira de compostagem de resíduo sólido urbano.	42
5. Índice de Shannon-Weaver calculado, por coleta, ao longo do processo de compostagem.	58
6. Frequência da resistência dos antimicrobianos testados em isolados de uma leira de compostagem	60
7. Incidência de múltipla resistência a antimicrobianos	61
8. Porcentagem de isolados resistentes a antimicrobianos, isolados de uma leira de compostagem.	63

	Página
9. Distribuição da resistência a antimicrobianos dos gêneros isolados de uma leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos.	69
10. Índice da resistência a antimicrobianos nos gêneros, identificados em cada coleta durante o processo de compostagem, que apresentaram resistência à algum antimicrobiano.	72
11. Concentrações de metais pesados encontrados em amostras de composto durante o processo de compostagem.	76
12. Requerimento legal para metais pesados em composto cru e curado para serem considerados como fertilizantes orgânicos.	77
13. Perfil de tolerância a metal pesado apresentado pelos gêneros isolados de uma leira de compostagem de resíduo sólido urbano.	78
14. Concentrações inibitórias mínimas (MIC) de sais de metais pesados capazes de inibir o crescimento (50% e 90%) dos organismos isolados de uma leira de compostagem de resíduo sólido urbano.	82

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Número de isolados dos gêneros, quantitativamente mais representativos, identificados ao longo de todas as coletas realizadas em uma leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos.	43
2. Espécies isoladas e identificadas durante a primeira coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).	45
3. Espécies isoladas e identificadas durante a segunda coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).	46
4. Espécies isoladas e identificadas durante a terceira coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).	47
5. Espécies isoladas e identificadas durante a quarta coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).	48
6. Espécies isoladas e identificadas durante a quinta coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).	49
7. Espécies isoladas e identificadas durante a sexta coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).	51
8. Espécies isoladas e identificadas durante a sétima coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).	52

	Página
9. Espécies isoladas e identificadas durante a oitava coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).	55
10. Espécies isoladas e identificadas durante a nona coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).	56
11. Espécies isoladas e identificadas durante a décima coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).	57
12. Incidência da resistência a antimicrobianos nos gêneros resistentes isolados e identificados durante o processo de compostagem	62
13. Frequência dos isolados resistentes a antimicrobianos, em cada coleta, durante o processo de compostagem	67
14, 15 e 16. Eletroforese em gel de agarose 0,5% corado com brometo de etídio, com o resultado da extração plasmidial de gêneros isolados do composto de resíduo sólido orgânico	83/84

1. INTRODUÇÃO

A quantidade de resíduos sólidos urbanos cresce significativamente a cada ano com o desenvolvimento das atividades humanas. O acúmulo destes resíduos e seu tratamento inadequado geram grandes problemas para a sociedade, acarretando danos ambientais e econômicos. Em virtude dos mesmos, surge uma crescente preocupação com o tratamento destes resíduos, buscando-se medidas que visem um tratamento mais adequado e práticas para o reaproveitamento destes materiais. O processo de compostagem apresenta-se como uma alternativa viável, pois sua prática tende a reduzir a quantidade de resíduos destinados aos aterros sanitários e maximizar o seu reaproveitamento.

A compostagem é um processo natural onde microrganismos decompõem a matéria orgânica em nutrientes simples, e durante o mesmo, ocorre a eliminação de organismos patogênicos que possam estar presentes nos resíduos, através do aumento da temperatura. A matéria orgânica é convertida em um material mais estável denominado composto ou húmus contendo nutrientes como o nitrogênio, fósforo e potássio em formas passíveis de serem assimilados pelos vegetais. Este produto final pode ser utilizado

como adubo orgânico na recuperação de solos desgastados, diminuindo a necessidade do uso de fertilizantes minerais.

O conjunto de microrganismos que participam ativamente do processo de compostagem possui enorme diversidade. A identificação das bactérias presentes nos resíduos faz com que sejam conhecidas quais as espécies envolvidas ao longo do processo, produzindo dados que possibilitam um maior conhecimento das atividades microbianas envolvidas na compostagem. É também através da identificação das bactérias presentes no material que está sendo compostado, que podemos verificar a presença ou não de espécies potencialmente patogênicas durante o processo e também no composto pronto.

A qualidade do produto final da compostagem é influenciada diretamente pela origem do resíduo compostado e pela qualidade do processo empregado. Um composto bem humificado, com características que lhe confirmam a possibilidade de ser utilizado como um bom condicionador de solos, só é produzido depois de um longo tempo de ação microbiana. Um composto produzido em um processo de compostagem que não tenha sido cuidadosamente monitorado pode estar contaminado com microrganismos patogênicos e, desta forma, se transformar em um vetor de disseminação de doenças, colocando em risco a saúde de quem consome um produto oriundo de um solo enriquecido com este produto.

A produção de um composto livre de metais está intimamente ligada à eficiência da coleta e da separação dos materiais não compostáveis que podem servir de vetores na contaminação por metais pesados, pois os metais

não são eliminados durante o processo de compostagem e sim, concentrados no produto final. Altas concentrações de metais são tóxicas para os microrganismos, podendo interferir, assim, na eficácia do processo.

O objetivo desse trabalho é identificar as bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias facultativas isoladas de um processo de compostagem e avaliar a resistência destas populações a antimicrobianos e metais pesados. Assim, o conhecimento das populações bacterianas presentes no processo de compostagem e a avaliação de suas resistências a antimicrobianos e metais pesados fornecerá informações sobre a eficácia do processo, antes do composto ser utilizado como adubo orgânico, prevenindo a contaminação do solo e do cultivo onde este for aplicado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Compostagem

A compostagem é um processo biológico natural de degradação da matéria orgânica realizado espontaneamente no ambiente pelos microrganismos aeróbios, onde suas atividades metabólicas levam à mineralização e à humificação parcial das substâncias orgânicas que são utilizadas pelos microrganismos como fonte de carbono e nitrogênio (Hartlieb et al., 2001). Trata-se de uma decomposição biológica e estabilização de substratos orgânicos, sobre condições controladas, para produzir um produto final que possa ser benéficamente aplicado ao solo (Madejón et al., 2002).

Por se tratar de um processo biológico aeróbio, ou seja, que ocorre na presença de oxigênio (O_2) (Weppen, 2001), os microrganismos responsáveis pelas transformações características da compostagem são aeróbios ou anaeróbios facultativos. A oxidação da matéria orgânica até gás carbônico (CO_2) faz com que ocorra a disponibilização de nutrientes na massa que está sendo compostada (Jahnel et al., 1999). Os principais produtos da compostagem são gás carbônico (CO_2), água (H_2O), íons minerais e matéria orgânica estabilizada (húmus) (Sharma et al., 1997; Tuomela et al., 2000).

Este material estável, denominado composto ou húmus, contém nutrientes como o nitrogênio, fósforo e potássio em formas passíveis de serem assimilados pelos vegetais, que retornam como fontes utilizáveis para o ambiente, acelerando o crescimento das plantas, aumentando a matéria orgânica do solo e melhorando o controle da erosão (Liang et al.,2003).

A prática da compostagem visa a redução do volume de resíduos e a obtenção de um produto final mais homogêneo com maior valor fertilizante e higienicamente seguro (Kiehl, 1985; Campbell, 1995; Gomez, 1998; Bari & Koenig, 2001). Os principais componentes da matéria orgânica são carboidratos (celulose), proteínas, lipídios e lignina. A capacidade dos microrganismos para assimilar matéria orgânica depende da sua habilidade para produzir as enzimas necessárias para a degradação do substrato (Tuomela et al., 2000).

A decomposição da matéria orgânica através do metabolismo microbiano pela atividade de enzimas, como proteases, lipases, pectinases ou celulases (Wei et al., 2000) chegam a reduzir em até 50% o volume inicial do material compostado (Gomez,1998). Desta forma a compostagem não só permite a redução na quantidade de resíduos formados, como também possibilita a continuidade do ciclo biológico devolvendo ao solo o que antes havia sido retirado dele durante os cultivos agrícolas (Bertoldi, 1995; Hellmann et al., 1997; Janel et al., 1999).

2.1.2. As fases da compostagem

As pilhas de compostagem passam por quatro fases distintas no decorrer do processo: psicrófila, mesófila, termófila e de maturação (Deus,1998). Como consequência disto, observam-se variações na comunidade microbiana e em suas habilidades funcionais (Boggs et al.,1998).

A duração de cada fase da compostagem depende da natureza da matéria orgânica a ser compostada e da eficiência do processo. A massa no início da compostagem está a uma temperatura ambiente e é levemente ácida. Fontes de carbono solúveis e facilmente degradáveis, como os monossacarídeos, amido e lipídios são utilizados pelos microrganismos no primeiro estágio do processo. O pH, nesta primeira fase, diminui devido a formação de ácidos orgânicos resultantes da degradação do composto.

No estágio seguinte os microrganismos começam a degradar as proteínas, resultando na liberação de amônia e aumento do pH. Após o consumo das fontes de carbono mais facilmente degradáveis, os compostos mais resistentes como a celulose, a hemicelulose e a lignina são degradadas e parcialmente transformadas em húmus (Tuomela et al., 2000).

A primeira fase, psicrófila, com temperaturas entre 10° e 25°C, tem uma duração média de um ou dois dias. Os microrganismos digerem os compostos solúveis de fácil degradação e através do seu metabolismo exotérmico, ou seja, que libera energia na forma de calor, proporcionam um gradual aumento da temperatura no interior das leiras (Kiehl, 1985; Lima,1991; Pereira Neto, 1996). Assim, a fase mesofílica é alcançada, com temperaturas entre 20° e 45°C, onde continua a atividade metabólica e o aumento da

temperatura, passando para a fase termofílica, que varia de 45° a 65°C (Pereira Neto, 1996; Atlas & Bartha,1998). Nesta fase ocorre a maior taxa de degradação dos compostos e pode durar várias semanas dependendo do material e da técnica utilizados (Guerrini & Büll,1992).

Um dos grandes objetivos e desafios da técnica de compostagem deve ser justamente a manutenção das altas temperaturas, respeitando limites máximos de até 65°C, pelo maior tempo possível, para a eliminação de organismos patogênicos. Temperaturas acima de 60°C afetam seriamente a taxa de decomposição da matéria orgânica, como resultado da diminuição da atividade microbológica (Hassen et al., 2001). Terminada a fase termofílica, o composto passa a ser novamente colonizado por microrganismos mesofílicos, constituindo a fase de maturação (Blanc et al.,1999).

Num primeiro momento, a decomposição da matéria orgânica em uma pilha de compostagem apresenta a fermentação dos resíduos com produção de ácidos orgânicos, gerando uma redução do pH do material, o que ajuda a evitar a perda de nitrogênio na forma de amônia. Nas fases seguintes de decomposição, os ácidos são também consumidos e observa-se uma elevação do pH. Ao final do processo, um bom composto deve apresentar entre outras características, um pH entre 7,0 e 8,0 (D'almeida & Vilhena, 2000).

Durante a compostagem, o material orgânico, que posteriormente será transformado no composto, atinge dois estágios importantes relacionados ao grau de decomposição ou de manutenção. O primeiro é o estágio de digestão que corresponde à fase de fermentação onde o material alcança a bioestabilização, sendo também chamado de semi-curado. Este composto já

apresenta características que possibilitam a sua utilização como fertilizantes dos solos sem acarretar prejuízos aos cultivos. O segundo estágio é o de maturação, onde há a humificação total da matéria orgânica, ou seja, onde ela é completamente degradada e estabilizada, e o composto recebe a denominação de curado ou humificado, apresentando alta qualidade e podendo ser utilizado sem restrições (D'almeida & Vilhena, 2000).

2.1.3. Os fatores que influenciam a compostagem

Por ser um processo biológico, a compostagem é afetada de forma indireta por determinados fatores que atuam diretamente sobre as populações microbianas envolvidas no processo, interferindo nas suas atividades vitais. A umidade, a aeração, a temperatura, a disponibilidade de nutrientes (relação carbono/nitrogênio), o pH e o tamanho das partículas são os fatores predominantes para o estabelecimento da microbiota (Lima, 1991; Déportes et al., 1995; Tuomela, 2000; Madejón et al., 2002).

2.1.3.1. A umidade

A presença da água é indispensável para as necessidades fisiológicas dos microrganismos e para o acontecimento das reações bioquímicas de decomposição da matéria orgânica. Assim, para que o processo de compostagem se processe de maneira ideal, o material deve ser mantido em uma faixa de umidade que pode variar de 40% a 60% (Lima, 1991) sendo a percentagem ideal em torno de 55% (Atlas & Bartha, 1997; Bidone & Povinelli, 1999).

Quando os teores de umidade forem menores que 40%, a escassez de água torna o ambiente muito inóspito aos microrganismos que têm suas atividades biológicas reduzidas e conseqüentemente retardam todo o processo de decomposição. Já na condição contrária, onde o material apresenta teores de umidades maiores que 60%, também ocorre uma redução na eficiência do processo (Sharma et al., 1997), mas nesse caso, devido a formação de ambientes encharcados, anaeróbios com baixo potencial de oxi-redução, onde a compactação do material e a água expulsam o ar dos espaços vazios (Lima,1991). Nestas condições verifica-se maior produção de chorume percolado e o material em putrefação desprende gás sulfídrico e mercaptanos, que exalam odor desagradável (D'almeida & Vilhena, 2000). Os resíduos orgânicos domésticos que constituem a maior parte do lixo municipal, apresentam normalmente umidade em torno de 55% o que faz da compostagem uma boa alternativa de tratamento desse material (Hassen et al., 2001).

2.1.3.2. A aeração

A aeração é um dos principais fatores que coordenam o processo de compostagem, pois mantém as condições de aerobiose na massa de lixo, provendo assim o oxigênio necessário para o desenvolvimento dos microrganismos (Wei et al., 2000). Os processos aeróbios de digestão que ocorrem na compostagem necessitam que o ar circule livremente e de forma permanente pelo interior das pilhas de material (Kiehl,1985).

A manutenção das ótimas condições de aeração nas pilhas pode ser alcançada através do revolvimento manual ou mecânico do material, que consiste em desmanchar uma pilha e reconstruí-la novamente. Este método é mais trabalhoso, porém mostra-se bem mais barato e também possibilita que camadas mais externas passem a ocupar as regiões mais internas da pilha, levando a produção de um composto mais homogêneo. Outro método possível é o da injeção forçada de ar, onde bombas insuflam ar para o interior das pilhas, através de tubulações perfuradas, dispostas por baixo da área onde as pilhas são montadas. Naturalmente, nas áreas mais superficiais das pilhas são medidas concentrações de oxigênio (O_2) entre 18% e 20%. À medida que se penetra para o interior das mesmas, esta concentração vai baixando até valores entre 0,5% e 2%, sem que haja prejuízos significativos para o processo (Bidone & Povinelli, 1999).

Para que se atinja condições ideais de aeração, estimada em torno de 5% de concentração de oxigênio (O_2), o insuflamento recomendado de ar nas pilhas fica em torno 0,3 a 0,6 m^3 por Kg de sólidos voláteis por dia (Sharma et al., 1997; Bidone & Povinelli, 1999).

A aeração é um fator intimamente ligado a umidade e a granulometria do material porque, quanto maior a umidade, mais água estará ocupando os espaços livres, impedindo assim a circulação de ar. Por outro lado, quanto menor o tamanho das partículas do material há uma tendência de compactação deste, ocasionando também a redução dos espaços para a circulação de ar. Em ambos os casos, ocorrerá a formação de zonas anaeróbias o que é altamente prejudicial para o processamento da

compostagem, pois além de retardá-la, produzirá odores desagradáveis (Pereira Neto, 1996; Tuomela et al., 2000).

A aeração além de fornecer oxigênio (O₂) para o bom funcionamento do metabolismo microbiano é responsável pela retirada dos gases produzidos como subprodutos da degradação, e estes gases, se acumulados podem ser prejudiciais (Wei et al., 2000). A aeração também serve como um dos principais mecanismos para evitar altas temperaturas durante a compostagem o que pode inibir ou até mesmo extinguir por completo o processo de degradação (Pereira Neto, 1996).

2.1.3.3. A temperatura

É o fator mais importante que determina a diversidade e a atividade metabólica ao longo do processo (Hassen et al., 2001).

Durante a fase termofílica ocorre o importante processo de sanitização do material, com a eliminação de microrganismos potencialmente patogênicos, com a inviabilização de sementes que possam estar presentes no material e de ovos de animais nocivos (Sharma et al., 1997; Déportes et al., 1998; Ndegwa & Thompson, 2001). A fase termofílica é atingida muito rapidamente chegando a acontecer em até 24 horas depois de pronta a pilha (Bari & Koenig, 2001). O ideal é que esta média de temperatura seja mantida por pelo menos um mês quando, então, a atividade microbiana começa a se reduzir devido a diminuição de nutrientes, e a temperatura, conseqüentemente, acompanha a queda atingindo novamente a fase mesofílica. Nesta fase que

tem uma duração de 30 a 60 dias, se dá a humificação ou cura do material com produção de ácidos húmicos.

As temperaturas inferiores à ideal não paralisam a compostagem, mas retardam muito o metabolismo dos microrganismos interferindo assim negativamente no seu poder de degradação, além de não serem efetivas na sanitização do material. Já temperaturas elevadas, acima de 60°C, também podem comprometer a atividade degradadora que requer a presença de enzimas termolábeis produzidas pelos microrganismos. Altas temperaturas também são responsáveis por significativos decréscimos na diversidade microbiana em pilhas de compostagem (Hellmann et al., 1997).

O controle da temperatura em uma pilha tem ligação direta com a altura desta, pois quanto mais alta a pilha, maior será a temperatura em seu interior. O ar circulando de forma uniforme por todas as regiões da pilha faz com que a temperatura também seja uniforme e conseqüentemente mais acelerada seja a degradação da matéria orgânica (Tiquia et al., 1998; Bari & Koenig, 2001).

A umidade também possui ligação direta com a manutenção da temperatura na compostagem. A contínua queda na umidade da massa sendo compostada é uma indicação de que a decomposição ainda está em curso, por causa da elevação de temperatura ainda presente (Tiquia et al., 1998).

2.1.3.4. Os nutrientes (relação C:N)

O recomendado para se iniciar uma compostagem é a utilização de cerca de 1,5Kg de material rico em nitrogênio para cada 50Kg de material rico em carbono. No decorrer da compostagem, parte do carbono, material energético essencial para os processos de síntese celular, é transformado em gás carbônico (CO_2) e a outra parte restante é incorporada pelos microrganismos na construção de suas estruturas celulares. O nitrogênio também é um elemento básico indispensável nos processos de síntese celular, principalmente no de proteínas.

Quando a relação C:N é muito elevada, ou seja, em torno de 60:1, ocorre a necessidade por parte dos microrganismos de um maior número de ciclos biológicos vitais para a eliminação do carbono excedente, na forma de gás carbônico (CO_2), atrasando assim todo o processo. Nestes casos é recomendado misturar ao material lodo de esgoto, pois este é muito rico em nitrogênio, o que equilibraria esta relação.

Quando a relação C:N é muito baixa, ou seja, o nitrogênio é muito abundante em relação ao carbono, ocorre uma excessiva solubilização do nitrogênio com grandes perdas por volatilização da amônia (NH_3), o que acarretará na produção de um forte odor desagradável e de um produto final pouco fértil em virtude da falta de nitrogênio.

A relação C:N também é utilizada como parâmetro para a identificação do estágio em que se encontra a compostagem ou da maturidade do composto. No início do processo, a proporção deve ser de aproximadamente 30 partes de carbono para 1 de nitrogênio (30:1) e próximo

ao final deve ficar em torno de 10 a 15 partes de carbono para uma de nitrogênio (10:1) a (15:1) (Lima, 1991; Sharma et al., 1997; Jahnel et al., 1999).

2.1.3.5. O pH

O resíduo sólido urbano domiciliar, antes de ser compostado, atinge índices de pH na faixa de 4,5 a 5,5. Durante a compostagem, espera-se a elevação do pH, por isso não há problemas em iniciar a mesma com material que apresente baixo pH.

No início do processo verifica-se uma queda no valor do pH devido à formação de diversas acidoses (Jahnel et al., 1999) e pela produção de dióxido de carbono (CO₂), posteriormente ocorre uma elevação do pH principalmente por causa da decomposição de proteínas e pela eliminação do gás carbônico. Assim, mesmo sem a utilização de corretivos, a compostagem gera normalmente um produto final com pH final entre 7,0 e 8,0 (Lima, 1991).

2.1.3.6. A dimensão das partículas

Neste ponto, os dados disponíveis são conflitantes, quanto menores forem as partículas do resíduo, maior será a área de contato disponível ao ataque dos microrganismos, diminuindo assim o tempo necessário para a degradação e levando o processo a se realizar de uma forma mais homogênea. Em contrapartida, o tamanho diminuto das partículas pode facilitar uma maior acomodação do material causando compactação ou a formação de torrões, dificultando a livre circulação de ar pelo interior das pilhas (Reinhat &

Trainor, 1995). Experimentos indicam que o tamanho ideal das partículas devem ser em torno de 1 a 5 cm (Kiehl, 1985; Bidone & Povinelli, 1999).

2.1.3.7. A Microbiota

O processo de compostagem é muito dinâmico em termos de predominância de grupos de microrganismos (Sidhu et al., 2001).

A microbiota própria da massa sendo compostada é determinante na velocidade e na qualidade da degradação (Tiquia et al., 1998).

Os resíduos domésticos produzidos no ambiente urbano, possuem uma riquíssima comunidade microbiana, a qual garante a viabilidade do processo de compostagem (Campbell, 1995; Kiehl, 1985). Estes microrganismos podem ser encontrados em suas formas vegetativas ou em formas latentes que se desenvolvem apenas quando as condições ambientais se tornam favoráveis.

Estudos direcionados para a identificação de microrganismos específicos que possuam ótimas características degradadoras, não só reduzirão o tempo dos processos como também poderão ajudar na produção de compostos de melhor qualidade. A otimização da qualidade do composto está diretamente ligado a composição e à sucessão da comunidade microbiana no processo de compostagem (Peters et al., 2000).

Os principais microrganismos envolvidos nos processos de degradação na compostagem são as bactérias e os fungos filamentosos.

As bactérias possuem o papel mais importante na degradação durante a fase termofílica, degradam compostos de fácil decomposição como

açúcares, carboidratos e proteínas, e também são responsáveis pela disponibilização de nutrientes, bem como pela fixação de nitrogênio. Os actinomicetos são bactérias que formam um micélio multifilamentoso e por esta razão são considerados equivalentes aos fungos (Lacey, 1997; Tuomela et al., 2000). São habitantes normais do solo (Picard et al., 1992) e também largamente encontrados em outros substratos naturais, inclusive em leiras de compostagem. Possuem reconhecida atividade na produção de antibióticos e na degradação de substratos recalcitrantes como a celulose e a lignina (Ball et al., 1989; Lacey, 1997; Tuomela et al., 2000). Possuem também a capacidade de degradação em altas temperaturas, mostrando um aumento nas suas populações ao longo da compostagem (Sidhu et al., 2000).

A principal função dos fungos é a decomposição dos materiais de difícil decomposição como materiais ricos em celulose e lignina e atuam preferencialmente nas fases finais da compostagem quando a competição com as bactérias se torna menor (Lima, 1991).

2.2 O Composto

Composto é a denominação genérica dada à substância final do processo de compostagem. Trata-se de um produto estabilizado e sanitizado que tem propriedades de condicionador físico-químico dos solos e que é tido por muitos como um fertilizante orgânico (Lima, 1991).

O composto produzido a partir de resíduos sólidos urbanos, pode apresentar variações na sua composição e na sua qualidade de acordo com a

origem do resíduo e de seus constituintes e com o tipo de processo empregado (Sharma et al., 1997).

O composto não é um produto inócuo; o resíduo sólido urbano pode conter inúmeros contaminantes que podem ocasionar problemas ambientais ou a saúde pública. Estes contaminantes biológicos ou químicos podem expor diferentes populações a riscos de saúde, de trabalhadores das usinas de compostagem a consumidores de produtos vegetais tratados com esse composto. A contaminação do produto final pode vir do material primário, que é o conteúdo do depósito do lixo, bem como de outros resíduos compostados (resíduos de jardim e esgotos) (Déportes et al., 1995).

A utilização de compostos provenientes de resíduos sólidos urbanos pode aumentar consideravelmente o conteúdo de metais no solo. O grau de contaminação do solo dependerá do teor inicial da contaminação do resíduo a ser compostado, da técnica utilizada e da frequência de sua aplicação (Tiquia et al., 1998; Sidhu et al., 2001).

Ao longo da compostagem, alguns contaminantes orgânicos acabam desaparecendo durante o período de sanitização do material, mas os metais pesados permanecem presentes nos produtos finais (Déportes et al., 1995; Pereira Neto, 1996). O conteúdo total de metais pesados no composto destinado ao uso agrícola é de grande importância. A quantidade desses elementos não deverá alcançar o limite no qual pode danificar a fertilidade do solo (efeito tóxico contra microrganismos, inibição de mineralização e humificação, perturbação de ciclos biogeoquímicos) ou a cadeia alimentar (assimilação de metais pesados por plantas e colheitas cultivadas e ingeridas

por humanos ou animais), podendo comprometer assim a qualidade do produto cultivado neste solo e, conseqüentemente, a saúde humana (Hassen et al., 2001).

A produção de um composto livre de metais está intimamente ligada a eficiência da coleta e da separação dos materiais não compostáveis que podem servir de vetores na contaminação por metais pesados. Uma das maneiras mais fáceis e eficientes de redução da contaminação dos resíduos é a segregação do lixo na própria fonte, incentivando assim a coleta seletiva (Pereira Neto,1996). As principais fontes de metais pesados presentes no resíduo urbano são: pilhas e baterias (Hg, Cd e Zn), tintas (Cr,Pb e Cd), plásticos (Cd) e papéis (Pb) (Sharma et al., 1997). A eliminação destes componentes recicláveis, antes de iniciar o processo de compostagem, deixa no resíduo, não mais do que 50% de chumbo e cobre, 25 – 30% de zinco e níquel, que permanecem em papéis/papelões e podem estar ligados ao material orgânico (Déportes et al., 1995).

A contaminação biológica também é encontrada no resíduo sólido urbano. As fontes de microrganismos patogênicos provavelmente são fezes de animais domésticos, papéis higiênicos, comidas putrefadas e roupas sujas (Déportes et al., 1995). A compostagem pode ser efetiva na redução da concentração de patógenos, mas nem sempre consegue alcançar a sanitização total do material (Sidhu et al., 2001). Entre os organismos patogênicos que podem ser encontrados no material sendo compostado estão bactérias, vírus, protozoários e vermes. Entre as bactérias potencialmente patogênicas podem

ser encontrados os gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Serratia* (Sidhu et al., 2001, Depórtes et al., 1998).

2.3. Resistência a metais pesados

Os metais realizam um papel essencial no processo vital de microrganismos. Alguns metais, tais como cobalto, cobre, zinco e níquel, em concentrações relativamente baixas, são essenciais para os microrganismos, desde que eles forneçam co-fatores vitais para metaloproteínas e enzimas (Hassen, 1998). Outros não tem papel biológico (prata, alumínio, cádmio, ouro, chumbo e mercúrio) e não são essenciais (Silver & Phung, 1996; Filiali et al., 2000).

Os metais essenciais funcionam como catalisadores para reações bioquímicas, são estabilizadores de estruturas de proteínas e paredes celulares bacterianas, e servem na manutenção do balanço osmótico (Ji & Silver, 1995). Metais essenciais de transição como ferro, cobre e níquel estão envolvidos no processo de redox; outros, como zinco e magnésio, estabilizam diversas enzimas e DNA através de forças eletrostáticas. Ferro, magnésio, níquel e cobalto são partes de moléculas complexas com um amplo arranjo de funções, e potássio e sódio são requeridos para regulação da pressão osmótica intracelular (Nies, 1992).

A introdução de metais pesados, de diversas formas, no ambiente, pode produzir consideráveis modificações da comunidade microbiana e suas atividades (Guzzo et al., 1994). Metais em altas concentrações são tóxicos aos microrganismos (Wakatsuki, 1995). Eles geralmente exercem uma ação

inibitória nos microrganismos pelo bloqueio de grupos funcionais essenciais, substituindo íons metálicos essenciais, ou através de interações entre ligantes (cátions). Metais não essenciais ligam-se com maior afinidade aos locais de grupos contendo tiol e locais de oxigênio do que os metais essenciais. A toxicidade resulta de alterações na estrutura conformacional de ácidos nucleicos e proteínas e interfere com a fosforilação oxidativa e o balanço osmótico (Guzzo et al., 1994; Silver & Phung, 1996).

Uma célula pode desenvolver sistemas de resistência a metais em uma tentativa de proteger os componentes celulares sensíveis. Através da limitação do acesso de metais ou alteração dos componentes celulares é diminuída a sensibilidade destas estruturas (Rouch, 1995). Diversos microrganismos adaptaram-se com sucesso à presença de variados metais, pelo uso de mecanismos de resistência codificados por cromossomos, plasmídeos ou transposons (Filiali, 2000; Sabry et al., 1997).

A maioria destes mecanismos de resistência são mediados por plasmídeos, o que fornece uma vantagem competitiva sobre outros organismos quando metais estão presentes no ambiente (Trevors et al., 1985), e são altamente específicos para um determinado cátion ou ânion (Silver & Mistra, 1988). Há sistemas de resistência para os metais essenciais (nutrientes) e não essenciais, que não têm nenhum papel biológico. Eles não apenas protegem o organismo em um ambiente inóspito como também realizam um importante papel no ciclo de metais tóxicos na biosfera (Williams & Silver, 1984). Existem diferenças entre sistemas de resistência a metais cromossomais e plasmídeos. Os sistemas de resistência a metais essenciais são geralmente

cromossomais e mais complexos do que os sistemas plasmidiais, que são geralmente mecanismos de efluxo de íons tóxicos

São admitidos seis mecanismos envolvidos na resistência a metais (Silver et al., 1992; Rouch et al., 1995): exclusão de metais por barreira de permeabilidade, transporte ativo de metais através da célula/organismo; seqüestro intracelular de metais por proteínas de ligação; seqüestro extracelular; detoxificação enzimática do metal para forma menos tóxica; redução da sensibilidade dos metais de alvos celulares.

A liberação de espécies de metais tóxicos é o problema de poluição mais relevante desde a revolução industrial, principalmente porque os metais pesados não são degradados e, portanto, permanecem no ambiente. Nesta situação, ambientes contaminados com metal pesado mantém o processo seletivo em populações bacterianas nativas por longo período de tempo. Ecossistemas naturais contendo altas concentrações de metais pesados são também freqüentes. Não é surpreendente que genes resistentes à metais pesados sejam facilmente encontrados em bactérias ambientais. Os ambientes contaminados por metais pesados também contém uma porcentagem mais elevada de cepas resistentes á antibióticos do que os não contaminados, e bactérias isoladas de solos contaminados contém mais plasmídios do que isolados de lugares não contaminados (Alonso et al., 2001).

2.4. Resistência a antimicrobianos

Bactérias podem ser resistentes a antimicrobianos porque possuem os determinantes para a resistência em seu genoma ou porque adquiriram

genes de resistência ao antimicrobiano de uma fonte exógena. Antimicrobianos podem selecionar intrinsecamente espécies bacterianas resistentes, bactérias que adquiriram genes de resistência a antimicrobianos por transferência horizontal de gene (descendência) ou por mutantes resistentes a antimicrobianos. Entretanto, compostos diferentes de antimicrobianos também podem selecionar bactérias resistentes à antimicrobianos (Alonso et al., 2001).

A seleção de determinantes resistentes a antimicrobianos pode ocorrer no ambiente por meio de poluição química ou metal pesado, ou devido a presença de um determinante acompanhando o gene de resistência a antimicrobiano que dá uma vantagem ecológica a bactéria para colonização desse ambiente (Duxbury & Bicknell, 1983). A resistência a antibiótico em bactérias é mais freqüentemente associada e fortemente correlacionada com resistência a metais. Assim, a resistência a antibióticos e a tolerância a metais na população bacteriana é claramente um fenômeno ambiental de seleção natural para sobrevivência (Bhattacharjee et al., 1988).

Os microrganismos resistentes a metais e antibióticos têm sido isolados de diferentes ambientes. Isto leva a sugestão que a expressão combinada de resistência a antibiótico e tolerância a metal é causada pela seleção resultante da presença de metal em um determinado ambiente (Foster et al., 1983; Calomiris et al., 1984; De Vicente et al., 1990).

A resistência pode ser mediada por diversos mecanismos tais como inativação enzimática do antimicrobiano, alteração/modificação/proteção do alvo, bem como a diminuição do acúmulo intracelular do antimicrobiano. O último mecanismo é baseado na diminuição do influxo ou no aumento do efluxo

de agentes antimicrobianos ou uma combinação de ambos (Butaye et al., 2003). Resistência pode ser intrínseca, isto é, associada com a penetração reduzida do antibiótico dentro da célula, ou pode resultar de um processo ativo, tal como mudanças no transporte de antibióticos dentro ou pela célula, de modificações de moléculas celulares alvo ou da produção de enzimas que modifiquem e inativem o antibiótico (Hermansson et al., 1987).

Genes que codificam estes mecanismos de defesa estão localizados no cromossomo bacteriano ou em plasmídios extracromossomais, e são transmitidos à próxima geração. O DNA que codifica para a resistência a antibióticos pode ser transferido através de conjugação entre bactérias similares. Em muitos casos o código genético para resistência a antibióticos está localizada nos plasmídios de resistência (plasmídio R) (Hirsch et al., 1999). Estes plasmídios podem ser transferidos a cepas sensíveis de mesmas espécies ou então a diferentes espécies. Resistência bacteriana, para antibióticos e metais, pode ser devido a presença do plasmídio R (plasmídio de resistência). A emergência da resistência para antibióticos e metais entre bactérias tem sido reportada por ser um fenômeno mediado por plasmídios (material genético extra-cromossomal) (Calomiris et al., 1984).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido nos Laboratórios de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

3.1. O local de amostragem

O material analisado foi proveniente de uma leira de compostagem de resíduo sólido urbano (RSU) da Usina de Compostagem da Lomba do Pinheiro, do Departamento Municipal de Limpeza Urbana (DMLU) de Porto Alegre.

3.2. A coleta das amostras

As coletas das amostras foram realizadas em uma leira de compostagem formada por resíduos domésticos acrescido de 30% de resíduos vegetais (hortifrutigranjeiros) de supermercados.

Para caracterizar a diversidade de microrganismos presentes no processo de compostagem, essas leiras foram acompanhadas desde a fase inicial (montagem) até o final do processo, sendo que as amostras foram

coletadas quinzenalmente no período de julho/2002 a janeiro/2003, perfazendo um total de dez coletas.

Para obtenção do material a ser analisado, pequenas alíquotas de diferentes pontos e profundidades foram coletadas e depois reunidas, para juntas formarem uma amostra de aproximadamente 3kg. Este material foi armazenado e ligeiramente homogeneizado em sacos plásticos de 50 litros e acondicionado em ambiente refrigerado para o seu transporte até o laboratório onde foi processado.

Uma vez no Laboratório de Microbiologia da UFRGS, o material foi submetido a uma catação manual para a retirada de materiais grosseiros, como pedras, embalagens plásticas, cacos de vidro, metais, etc. Após este processo, o material foi triturado em um liquidificador e peneirado em uma peneira com poros de 5mm.

3.3. A determinação do pH

O pH das amostras foi determinado com a utilização de fitas indicadoras de pH (MERCK) utilizando-se uma suspensão obtida pela mistura de 10g de composto em 90mL de água destilada.

3.4. A determinação da temperatura da leira

A temperatura da leira foi determinada com a utilização de um termômetro, sendo mensuradas as temperaturas dos quatro pontos de coleta (inferior, superior e dois medianos) e feita uma média aritmética destes valores, para cada coleta.

3.5. Determinação da concentração de metal pesado na amostra de compostagem.

A determinação da concentração de metal pesado na amostra de compostagem foi realizada pelo Laboratório de Análises de Solos da Faculdade de Agronomia / UFRGS. Foram analisadas duas amostras de composto durante o processo, no início (quarta coleta) e no final (décima coleta), sendo o composto caracterizado como cru e curado, respectivamente. Os metais analisados foram cobre, zinco, cádmio, cromo, níquel, chumbo e mercúrio.

3.6. Análises microbiológicas

Inicialmente foi produzida uma suspensão de 10g de resíduo bruto em 90mL de água destilada estéril. A partir desta suspensão foram realizadas diluições seriadas até 10^{-6} , transferindo-se 10 mL da diluição anterior para outros 90mL de água destilada estéril.

Estas diluições serviram como amostras para a realização do teste de colimetria e para a inoculação dos meios utilizados no isolamento das bactérias.

3.7. Teste colimétrico

O teste colimétrico foi determinado através do Número Mais Provável (NMP) de bactérias do grupo coliformes totais e fecais, utilizando-se da técnica de tubos múltiplos com séries de cinco tubos (APHA, 1998). Foi utilizada a diluição de 10^{-6} para a realização deste experimento.

Os meios utilizados nesta técnica foram: caldo lactosado (BIOBRÁS), caldo brilha verde-brilhante-bilis-lactose (MERCK) e ágar eosina azul de metileno-lactose-sacarose (EMB) (MERCK).

3.8. Isolamento bacteriano

Para garantir o isolamento da maior diversidade possível de bactérias, foram utilizados diferentes meios de cultura entre meios seletivos e não seletivos.

Entre os meios não seletivos foram testados: o ágar nutriente triptona de soja (TSA), para crescimento bacteriano e o Plate Count Agar (PCA), utilizado para contagem de heterotróficos (APHA,1998).

Os meios seletivos utilizados foram: ágar Cetrimida (BIOBRÁS), para isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*, ágar Pseudomonas (BIOBRÁS), para isolamento de espécies deste gênero, ágar eosina azul de metileno-lactose-sacarose (EMB) (MERCK), para isolamento de bactérias Gram negativas, ágar xilose lisina tergitol 4 (XLT4) (DIFCO), para isolamento de espécies do gênero *Salmonella* e ágar seletivo para isolamento de bactérias do gênero *Acinetobacter* (Baumann, 1968). Para isolamento de espécies do gênero *Salmonella*, as amostras foram pré-enriquecidas em caldo base tetracionato (DIFCO) a 42°C durante 16-18 horas para posterior semeadura em XLT4.

Foram inoculados 0,1mL das diluições 10^{-4} e 10^{-5} , em triplicata, através da técnica de espalhamento com alça de Drigalski, em placas de Petry contendo cada um dos meios anteriormente citados. Realizada a inoculação,

as placas foram incubadas a 37°C por 24/48 horas. Após este período foram selecionadas, aleatoriamente, cerca de 25 colônias de cada uma das placas, procurando-se obter o máximo de colônias distintas morfológicamente.

Cada colônia isolada escolhida foi repicada em meio caldo TSB e novamente incubada a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a técnica de coloração de Gram para certificação da pureza das culturas. Assegurada a pureza, uma alíquota de 1275µL desta cultura foi armazenada em solução com glicerol (Synch) a 15%, a uma temperatura de – 20°C . Outra alíquota foi inoculada em tubos de ensaio com meio triptona de soja (TSA) inclinado, que foi utilizada como estoque para manipulação durante os testes bioquímicos de identificação.

3.9. Contagem das Unidades Formadoras de Colônias – UFC por grama de composto

As bactérias desenvolvidas em meio PCA foram utilizadas para a contagem de UFC. Para o cálculo da contagem total de heterotróficos foi realizada uma média da contagem das três placas semeadas com alíquotas de cada uma das diluições, e o resultado foi multiplicado pelo fator da diluição que a amostra foi submetida. Foram contadas apenas as placas que apresentavam um número de colônias entre 30 e 300 UFC.

3.10. Identificação bioquímica das bactérias

Os estoques preservados a 4°C em tubos contendo TSA inclinado foram utilizados para a realização das provas bioquímicas de identificação.

A identificação das bactérias iniciou com o teste da coloração de Gram, o que possibilitou a separação das bactérias em dois grandes grupos: as Gram negativas e as Gram positivas e, além disso, possibilitou o exame das características morfológicas das células e a pureza do isolamento.

Os testes bioquímicos foram realizados utilizando-se microbiologia clássica. As principais provas bioquímicas e os meios bioquímicos utilizados para a identificação de bactérias Gram positivas e Gram negativas estão apresentados na tabela 1. Algumas provas bioquímicas adicionais foram realizadas quando a determinação de alguma espécie assim exigiu.

A determinação dos gêneros e espécies isoladas foi realizada utilizando-se bibliografia apropriada (Holt et al., 1984 e MacFaddin, 2000).

TABELA 1. Principais provas bioquímicas e meios de cultura utilizados na identificação das espécies bacterianas isoladas

Prova	Gram (+)	Gram (-)
Teste da catalase	X	X
Esporos	X	
Oxidação / Fermentação	X	X
Teste da motilidade	X	X
Teste da fenilalanina desaminase	X	X
Vermelho de Metila / Voges Proskauer	X	X
Hidrólise do amido	X	
Teste do indol	X	X
Teste do citrato	X	X
Redução de nitrato	X	X
Teste da uréase		X
Hidrólise da esculina		X
Teste da gelatinase	X	X
Teste do H ₂ S	X	X
Teste da oxidase		X
Teste do malonato		X
Ágar ferro tríplice açúcar		X
Ágar MacConkey		X
AMINOÁCIDOS		
Descarboxilação da arginina	X	X
Descarboxilação da lisina		X
Descarboxilação da ornitina		X
CARBOHIDRATOS		
Trealose	X	X
Salicina	X	X
Manitol	X	
Xilose	X	X
Arabinose	X	X
Lactose		X
Sacarose		X
Glicose	X	X
Maltose		X
Celobiose		X
Sorbitol		X

3.11. Determinação da resistência a antimicrobianos

Para a determinação da resistência a antimicrobianos dos isolados, foi utilizado o teste de difusão em disco (Kirby-Bauer).

As culturas mantidas em TSA foram transferidas, por inoculação, para um caldo TSB e incubadas a 37°C até alcançarem a turbidez de 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL.). Placas contendo ágar Müller-Hinton foram então inoculadas com esta cultura e sobre o ágar foram colocados discos com concentrações de antibióticos pré-determinadas e posterior incubação a 37°C por 16/18 horas. Em cada ensaio para resistência aos antimicrobianos, foram utilizados as seguintes linhagens padrões para validação dos mesmos: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

No teste de difusão em disco, a susceptibilidade ou a resistência de um isolado ao antimicrobiano é determinada pelo tamanho da zona de inibição formada ao redor dos discos. Sendo assim, após o período de incubação, foi mensurado a zona de inibição e determinada a resistência ou suscetibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos testados, utilizando-se padrões determinados pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

Os antibióticos testados foram: ácido nalidíxico (NAL - 30µg), amicacina (AMI - 30µg), ampicilina (AMP - 10µg), cefalotina (CFL - 30µg), cefoxitina (CFO - 30µg), cloranfenicol (CLO - 30µg), cotrimoxazol (SUT - 25µg), eritromicina (ERI - 15µg), estreptomicina (EST - 10µg), gentamicina (GEN - 10µg), imipenem (IPM - 10µg), norfloxacin (NOR - 10µg), penicilina G (PEN - 10UI), polimixina B (POL - 300UI), rifampicina (RIF - 5µg), tetraciclina (TET - 30µg), trimetoprima (TRI - 5µg) e vancomicina (VAN - 30µg).

3.12. Determinação da resistência a metais pesados

Para a determinação de resistência a metais pesados, foi utilizado a técnica da concentração inibitória mínima (MIC) em meio líquido e analisado sua densidade óptica (570 nm). Cada ensaio foi realizado utilizando-se um pré-inóculo das bactérias isoladas, com crescimento em TSB por 18/24hs. 100 µL deste pré-inóculo foram inoculados em 10 mL de caldo TSB contendo variadas concentrações de sais de metais pesados e em caldo TSB sem metal pesado (controle) e incubadas a 37°C por 24h. A menor concentração do metal que inibiu 50% do crescimento, em comparação ao controle, foi considerada a MIC 50%, e a que inibiu 90% do crescimento, MIC 90%. Foram utilizadas as seguintes concentrações (mM) dos sais de metal pesado, com intervalos de 0,1mM (e 0,01mM para HgSO₄) :

CdCl₂ : 0,1 – 3,0

CoSO₄: 0,1 – 1,5

CuCl₂: 0,1 – 3,5

K₂CrO₄: 0,1 – 3,0

ZnCl₂: 0,1 – 3,0

HgSO₄: 0,01 – 0,1

3.13. Extração do DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada nos isolados dos gêneros que apresentaram resistência simultânea a antimicrobianos e a metais pesados, sendo utilizado o método de lise alcalina descrita por Sambrook et al., (1989), com modificações.

Para a extração do DNA plasmidial, 100 µl de cada isolado foram inoculados em 20 mL de caldo TSB e incubados com agitação orbital de 120 rpm a 37°C por 16-18hs. Após este período, 10 mL de cada cultura foi centrifugado em uma centrífuga de bancada refrigerada (SIGMA) a uma velocidade de 4000 g a 4°C por 20 minutos. O material sedimentado foi, então, lavado com 1 mL de uma solução de NaCl 1M e depois novamente centrifugado por 2 minutos. Após a retirada do NaCl adicionou-se 500 µL de uma solução I (glicose 50 mM, Tris HCl 25 mM e EDTA 10 mM). A mistura foi homogeneizada e incubada no gelo por 30 minutos, em seguida adicionou-se 1 mL da solução II (SDS 1% e NaOH 0,2M). Novamente a mistura foi homogeneizada e incubada no gelo por mais 15 minutos. Na etapa seguinte, adicionou-se 750µL da solução III (acetato de potássio 5 M, ácido acético glacial e água destilada). Após a homogeneização foi incubado em gelo por mais 30 minutos. A mistura foi, então, centrifugada a 4000 g por 20 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.

A purificação da amostra prosseguiu com a realização de duas extrações consecutivas utilizando-se 1 volume de fenol/clorofórmio (1:1) e centrifugando-se a 15000 g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e a cada um foi adicionado 1 volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após a centrifugação, o sobrenadante resultante, contendo o material genético extraído, foi transferido para novos tubos, onde o DNA plasmidial foi precipitado com 0,3 M de acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. A mistura foi, então, incubada a -20°C durante 12 horas. Após este período, procedeu-se nova centrifugação a 15000

g a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o material sedimentado foi lavado com etanol 70% gelado e posteriormente seco em temperatura ambiente. Uma vez seco, o DNA foi ressuspensionado em 50 µL de TE (Tris HCl 10 mM e EDTA 1 mM) e armazenado a -20°C para posterior análise.

3.14. Análise do perfil plasmidial

A análise do perfil plasmidial foi feita por eletroforese em gel de agarose (0,5%), com posterior visualização do DNA em transluminador sob a luz ultra-violeta (UV). As fotografias dos géis foram realizadas com um programa Kodak (DC-120. Zoom Digital Picture Transfer Application versão 1.0.2).

3.15. Análise Estatística

A diversidade bacteriana encontrada durante o processo de compostagem foi analisada através do índice de Shannon-Weaver e do teste Kruskal-Wallis (teste não-paramétrico equivalente ao ANOVA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do pH

A coleta da primeira amostra ocorreu 24h após a montagem da leira de compostagem. Ao determinar-se o pH foi verificado um valor de pH 6,5, que indica o caráter ácido do material a ser degradado. A partir da metade do processo observou-se o aumento do pH e a estabilização em um valor final alcalino, pH 9,0 (Tabela 2), o que é um indicativo do provável término do processo de degradação. Estes valores seguiram um padrão semelhante aos encontrados em trabalhos que também analisaram compostagem de resíduo sólido urbano, Beffa et al., (1996) com valores de pH entre 6,0 e 8,5, Steger et al., (2003) com valores de pH entre 5,0 e 9,0 e Tang et al., (2004) com valores de pH entre 6,5 e 9,5.

O baixo valor do pH no início da compostagem se dá em virtude do acúmulo de ácidos orgânicos e de gás carbônico (CO₂), produtos do metabolismo microbiano. No decorrer do processo, a eliminação do gás carbônico e a degradação dos ácidos e substâncias protéicas proporcionam uma nova elevação do pH (Sharma et al., 1996; Jahnel et al., 1999).

TABELA 2. Valores do pH das amostras coletadas em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos e da temperatura média da leira durante o processo.

Coleta	PH	Temperatura	Tempo de duração da compostagem
1	6,5	39°C	24 horas
2	7,0	44°C	≅ 15 dias
3	7,3	65°C	≅ 30 dias
4	7,5	58°C	≅ 45 dias
5	7,7	43°C	≅ 60 dias
6	8,2	36°C	≅ 75 dias
7	8,8	35°C	≅ 90 dias
8	9,2	30°C	≅ 105 dias
9	8,0	35°C	≅ 120 dias
10	9,0	28°C	≅ 150 dias

4.2 Análise da temperatura

Durante o processo de compostagem, a temperatura média da leira variou de 28°C a 65°C (Tabela 2), sendo que a fase termofílica, importante para a sanitização do composto, aconteceu a partir do 15° até o 60° dia, com sua temperatura máxima mensurada de 65°C. A manutenção desta temperatura foi mantida através do revolvimento da pilha, além da rega quando necessário. Na primeira coleta, realizada um dia após a montagem da leira, observou-se que o processo de compostagem já estava na fase mesofílica e permaneceu na mesma até a segunda coleta, porém já entrando na fase termofílica. A partir da quinta coleta o processo entrou na fase de maturação do composto, com um declínio gradual da temperatura.

No trabalho realizado por Hassen et al., (2001), com compostagem de resíduo sólido urbano, a temperatura variou de 25°C a 64°C, sua fase

mesofílica teve a duração de 25 dias e a termofílica, 80 dias, com a manutenção da temperatura abaixo de 65°C através da ventilação e rega da leira.

4.3 A contagem de heterotróficos

Durante o processo de compostagem, a contagem de heterotróficos diminuiu com o aumento da temperatura, observando-se a maior diferença entre a terceira e a quarta coleta, com valores de $2,8 \times 10^6$ UFC/g a $1,3 \times 10^5$ UFC/g, após o processo atingir a temperatura máxima durante a fase termofílica. A partir da quarta coleta, este valor volta a aumentar e mantém-se estável com a diminuição da temperatura, na fase de maturação.

A contagem de heterotróficos ao longo das dez coletas realizadas (Tabela 3), apresentou uma média de $3,4 \times 10^6$ UFC/g de material. Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos como Sidhu et al., (2000), Tiquia e Tam (2000) e Hassen et al., (2001), que também avaliaram a composição microbiana em leiras de compostagem, apresentando médias do número de heterotróficos de $2,7 \times 10^8$ células/g , $7,3 \times 10^8$ UFC/g e $1,0 \times 10^8$ UFC/g respectivamente.

Blanc et al. (1999) realizando estudos em ambientes de leiras de compostagem de resíduos vegetais, verificaram um número mais elevado na contagem de heterotróficos, entre 10^9 e 10^{10} UFC/g. Segundo os autores, estes altos índices obtidos estão relacionados com o predomínio do gênero *Bacillus* entre as bactérias identificadas, uma vez que este gênero possui a capacidade de produzir uma grande quantidade de endósporos bacterianos, os quais foram encontrados em um número elevado no material examinado pelos autores.

TABELA 3. Contagem do número de heterotróficos e do índice de coliformes totais e fecais por grama de composto bruto medidos ao longo das coletas de amostras em leira de compostagem.

Coleta	n° de heterotrof. UFC/g	Col.totais UFC/g	Col.fecais UFC/g
1	$2,5 \times 10^7$	$5,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$
2	$3,1 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$
3	$2,8 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$
4	$1,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$
5	$5,0 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$	$8,0 \times 10^4$
6	$4,4 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$
7	$4,8 \times 10^5$	$8,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
8	$5,3 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
9	$3,4 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
10	$2,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$

4.4 Análise dos índices colimétricos

Os índices de coliformes totais apresentaram oscilações ao longo do processo de compostagem (Tabela 3), mas de uma maneira geral, manteve-se uma tendência de declínio entre a primeira e a última coleta, $5,0 \times 10^5$ e $2,0 \times 10^4$ UFC/g respectivamente, não havendo a eliminação total dos coliformes totais. Na coleta 5 ocorreu a elevação dos índices de coliformes totais e fecais devido a uma recontaminação, provavelmente, devido ao uso de chorume na rega da leira para manter sua umidade e temperatura.

Os resultados obtidos com a estimativa do número de coliformes fecais nas amostras coletadas ao longo da compostagem apresentaram uma redução na quantidade de bactérias deste grupo de $3,5 \times 10^5$ para $1,0 \times 10^4$ UFC/g. A redução mais drástica parece ter ocorrido nas primeiras três quinzenas do processo (45 dias), quando houve uma redução de $3,5 \times 10^5$ para $2,0 \times 10^4$ UFC/g. A partir da quinta quinzena (75 dias) os resultados se

mantiveram em equilíbrio até o final da compostagem, sem o aparecimento de crescimento secundário. Resultados semelhantes foram encontrados por Hassen et al. (2001) de $2,5 \times 10^7$ para $7,9 \times 10^3$ UFC/g, o que indica a ação positiva da compostagem na melhoria qualitativa do composto.

Segundo Redlinger et al. (2001), a eliminação total dos microrganismos indicadores na compostagem é muito difícil de ser alcançada. No entanto, autores como Depórtés et al. (1998), trabalhando com compostagem de resíduo sólido urbano, e Tiquia e Tam, (2000) com compostagem de dejetos de pocilgas, evidenciaram a eliminação total dos coliformes antes mesmo do primeiro mês do processo.

A queda no número de coliformes no material que está sendo compostado ocorre em virtude da ação de um conjunto de fatores como: altas temperaturas, presença de substâncias tóxicas, escassez de nutrientes entre outros. Dentre estes fatores, Hassen et al. (2001) apontam a temperatura da fase termofílica como a principal responsável pela destruição destes microrganismos, diferentemente de Redlinger et al. (2001) que indicam a perda de umidade no material como o fator responsável pela sanitização do material compostado.

Em alguns estudos como o de Hassen et al. (2001) foi evidenciado o crescimento secundário, ou seja, o aumento do índice de bactérias do grupo coliforme após o término da compostagem. Este fenômeno pode ter origem em uma recontaminação do material durante o manuseio ou a estocagem do produto de forma incorreta.

Segundo Redlinger et al. (2001) a simples redução ou até mesmo a supressão total dos coliformes, não servem como única ferramenta para verificação da qualidade biológica do composto. Os autores apontam a importância da detecção de outros microrganismos potencialmente patogênicos, que possam apresentar uma maior resistência no ambiente de compostagem em relação aos bioindicadores.

Neste trabalho, a eliminação total dos coliformes não foi observada, o que indica que o processo como um todo necessita de ajustes para atingir uma maior eficiência, tais como: acompanhar melhor a evolução da temperatura no interior das leiras; aumentar o comprimento das esteiras onde ocorre a triagem manual dos materiais não biodegradáveis, para aumentar a qualidade do material disposto nas leiras; investir em campanhas de conscientização da população para maximizar a prática de segregação dos resíduos diretamente na fonte; evitar a prática de rega das leiras com o chorume; e evitar a recontaminação do material pelo cuidado no revolvimento das leiras.

4.5 A identificação microbiana através de provas bioquímicas

A microbiologia da compostagem é muito complexa e a tentativa de isolamento de todas as espécies presentes no material é uma tarefa muito difícil (Hassen et al., 2001).

As condições de cultura utilizadas neste trabalho permitiram o isolamento de bactérias mesófilas aeróbias ou anaeróbias facultativas.

Apesar da utilização de meios seletivos e não seletivos para o isolamento bacteriano, apenas foram utilizadas para identificação, somente as

bactérias isoladas do ágar triptona de soja (TSA), devido a predominância de bactérias Gram negativas nos demais meios de cultura e mesmo no próprio TSA.

Utilizando-se as técnicas de identificação da microbiologia clássica, onde provas bioquímicas são utilizadas para a caracterização fisiológica dos microrganismos, foi possível estabelecer um perfil da comunidade bacteriana presente em uma leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos.

Os resultados apresentados na tabela 4 apontam para uma comunidade bacteriana diversa. Entre as 500 colônias isoladas neste trabalho, foram identificados 17 diferentes gêneros e, entre eles, a identificação de 36 espécies diferentes.

Muitos dos gêneros identificados neste trabalho, também foram apontados por Depórtes et al., (1998), Hassen et al., (2001) e Taiwo e Oso, (2004) como sendo gêneros freqüentemente presentes em resíduos sólidos urbanos. Dos 17 gêneros identificados, apenas o gênero *Enterobacter* foi encontrado em todas as coletas (Figuras 2 a 10).

Os gêneros que apresentaram maior número de isolados, foram respectivamente: *Enterobacter* (15%), *Escherichia* (14,2%), *Bacillus* (13,4%) e *Pseudomonas* (9,6%) que juntos corresponderam a 52,2% do total de isolados.

A figura 1 mostra a variação no número de isolados destes gêneros, que foram os mais representativos, ao longo das coletas.

TABELA 4. Total de gêneros bacterianos e o número de isolados de cada gênero ao longo das coletas realizadas em uma leira de compostagem de resíduo sólido urbano.

Gêneros	N° de isolados
<i>Aeromonas</i> spp.	43
<i>Bacillus</i> spp.	67
<i>Burkholderia</i> spp.	13
<i>Citrobacter</i> spp.	13
<i>Corynebacterium</i> spp.	32
<i>Enterobacter</i> spp.	75
<i>Escherichia</i> spp.	71
<i>Flavimonas</i> spp.	09
<i>Klebsiella</i> spp.	29
<i>Listeria</i> spp.	21
<i>Micrococcus</i> spp.	23
<i>Pasteurella</i> spp.	06
<i>Pseudomonas</i> spp.	48
<i>Providencia</i> spp.	10
<i>Serratia</i> spp.	22
<i>Staphylococcus</i> spp.	11
<i>Xanthomonas</i> spp.	07
Total	500

Neste trabalho, o gênero *Enterobacter* foi o dominante e este resultado não confere com os obtidos por Blanc et al., (1999); Dees e Ghiorse, (2001) e Hassen et al., (2001), que verificaram o domínio do gênero *Bacillus* na comunidade microbiana presente em leiras de compostagem. Segundo estes autores, a prevalência do gênero *Bacillus* ocorre pela sua capacidade de produção de endósporos bacterianos, os quais são altamente resistentes a temperaturas elevadas e a outras condições desfavoráveis que possam estar presentes no ambiente de compostagem.

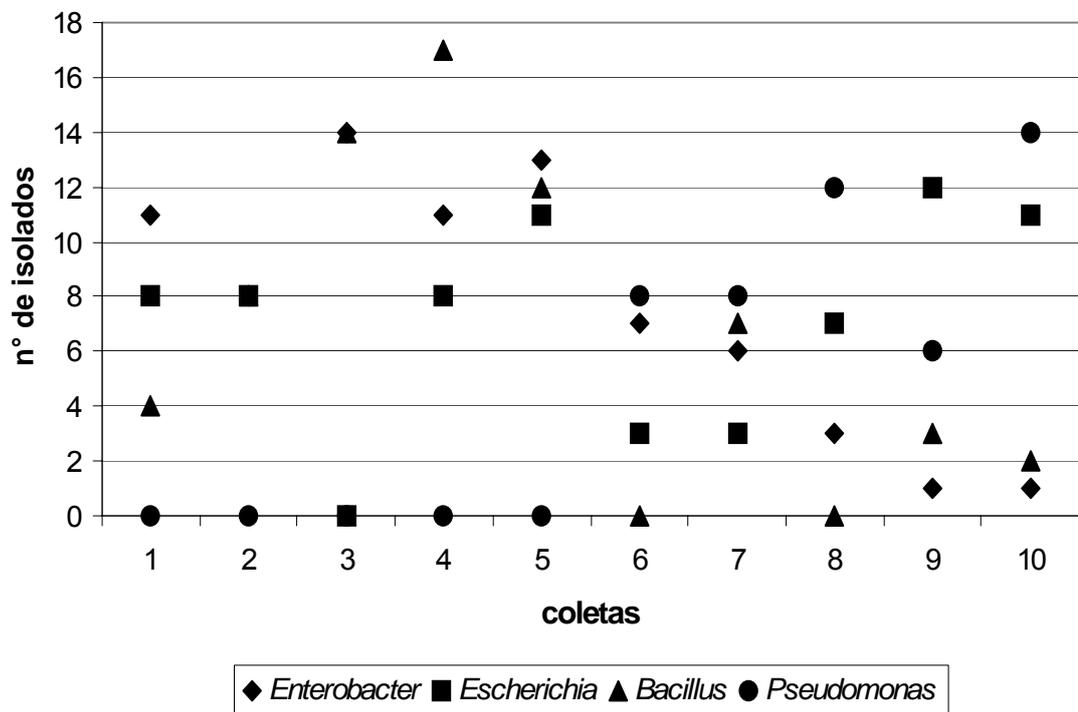


FIGURA 1. Número de isolados dos gêneros, quantitativamente mais representativos, identificados ao longo de todas as coletas realizadas em uma leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos.

Os membros do gênero *Enterobacter* podem estar presentes no intestino de humanos ou em ambientes como solo e água ou ainda associados às raízes de milho (De Los Santos et al., 2001). Este gênero esteve presente em todas as coletas, predominando nas coletas 3 e 5 (Figuras 4 e 6). Apresentou uma alta incidência até a coleta 5 (Figura 6), demonstrando posteriormente um declínio até o final do processo. Este gênero foi representado por 4 espécies das quais apenas a *E. dissolvens* não é tida como patogênica, sendo as demais importantes causadoras de bacteremia em ambientes hospitalares. *Enterobacter* é um dos gêneros que fazem parte do

grupo dos coliformes, portanto a sua presença também é indicadora de provável contaminação fecal.

O gênero *Aeromonas* é encontrado em diversos ambientes, sendo representado neste trabalho, por duas espécies, *A. hydrophyla* e *A. salmonicida*. A primeira é um patógeno oportunista de humanos e a segunda, pode causar infecções em peixes de água doce, especialmente truta e salmão (Miranda e Castilho, 1998). Este microrganismo esteve presente na maioria das coletas, com exceção das 3, 4 e 7 (Figuras 4, 5 e 8, respectivamente), sendo que predominou nas coletas 1 e 2 (Figuras 2 e 3). A partir da coleta 5 (Figura 6), sua incidência foi decaindo com o decorrer do processo.

Os exemplares do gênero *Bacillus* são encontrados amplamente distribuídos pelos mais variados ambientes e a maioria deles são considerados como organismos do solo possuindo alto poder de degradação da matéria orgânica. A maioria das espécies não é patogênica, com exceção do *B.anthraxis* e do *B.cereus*. Dentre estas patogênicas, apenas o *B.cereus* foi encontrado entre as 6 espécies identificadas deste gênero. Este gênero esteve presente em praticamente todas as coletas, com exceção das coletas 6 e 8 (Figuras 7 e 9), apresentando um aumento gradual na sua incidência até a coleta 5 (Figura 6), sendo o gênero predominante na coleta 4 (Figura 5), quando a temperatura da leira era 58°C. A partir da coleta 7 (Figura 8), houve uma diminuição de sua incidência.

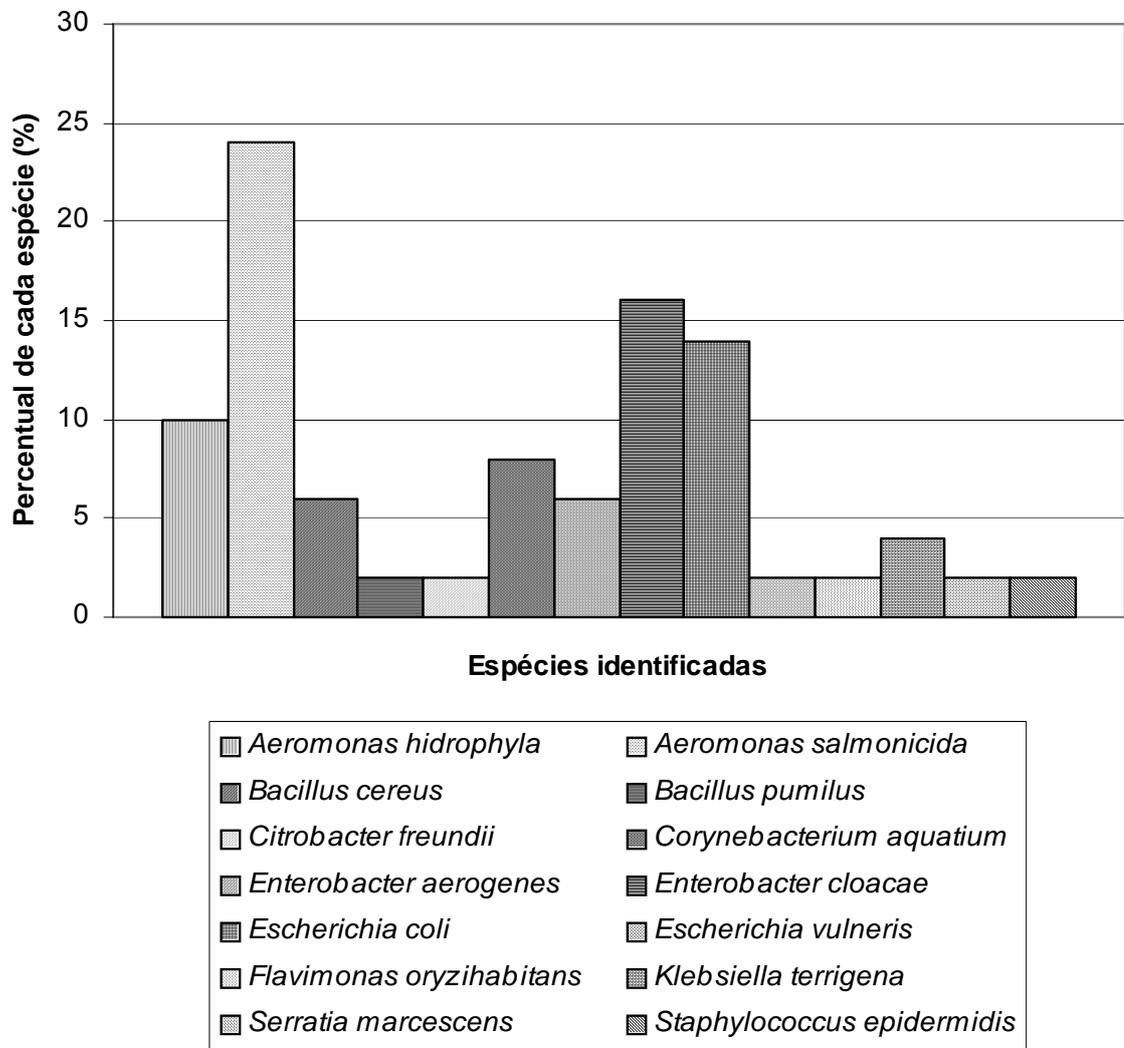


FIGURA 2: Espécies isoladas e identificadas durante a primeira coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).

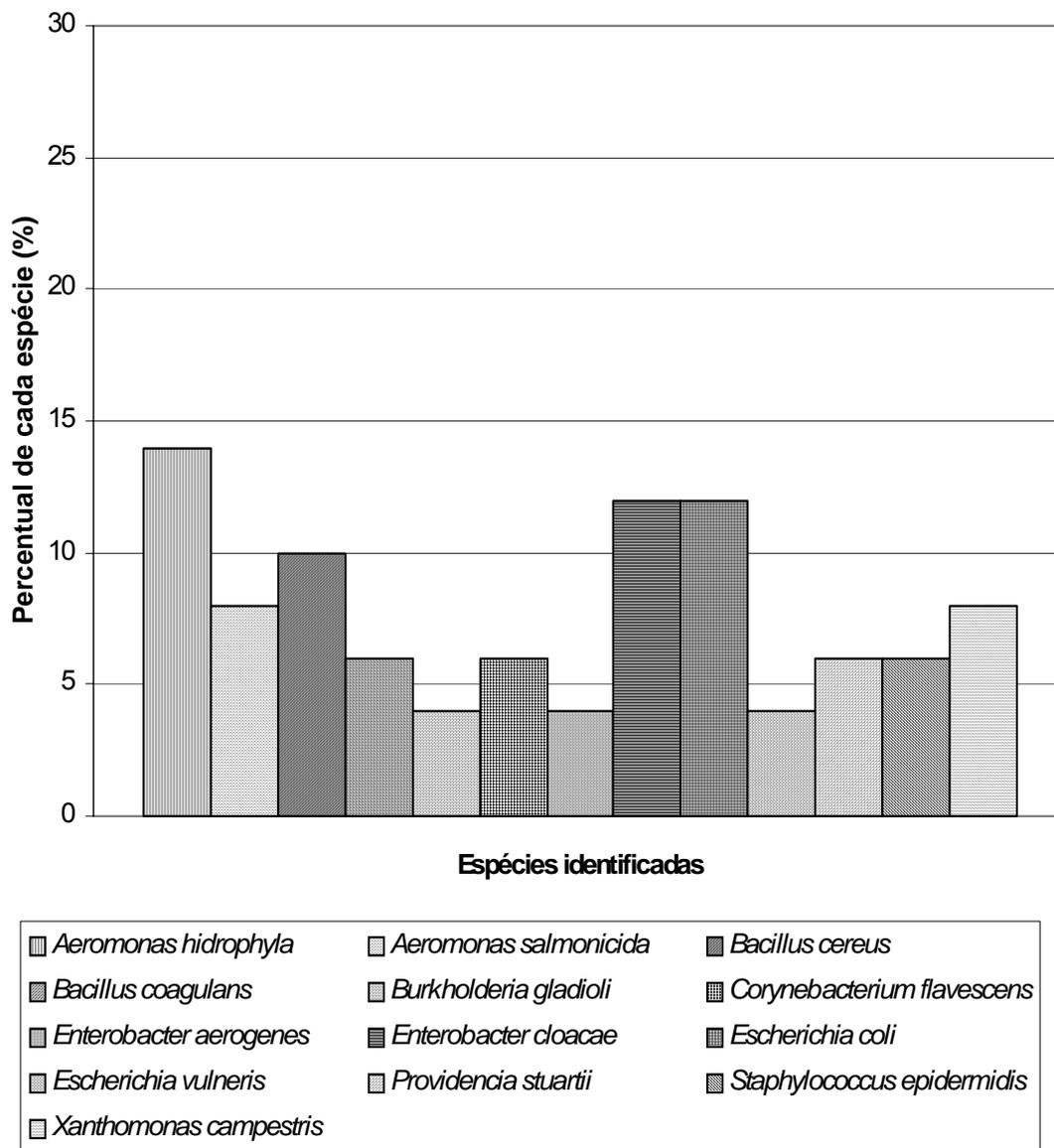


FIGURA 3: Espécies isoladas e identificadas durante a segunda coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).

Os representantes do gênero *Burkholderia* são amplamente encontrados no solo ou em associação com raízes de plantas, alguns podem ser patogênicos para plantas e até mesmo para o homem. A descoberta de espécies fixadoras de nitrogênio, tornou este gênero uma ferramenta importante para a agricultura, pois quando associado à determinados cultivos

produz efeitos relevantes na produção (De Los Santos et al., 2001). Neste trabalho duas espécies, *B. mallei* e *B. gladioli*, foram isoladas. A primeira é uma espécie que pode parasitar animais, principalmente eqüinos, e a segunda é um fitopatógeno. Apresentou incidência na metade das coletas (2, 3, 5, 8 e 9) (Figuras 3, 4, 6, 9 e 10), mas com baixo número de isolados.

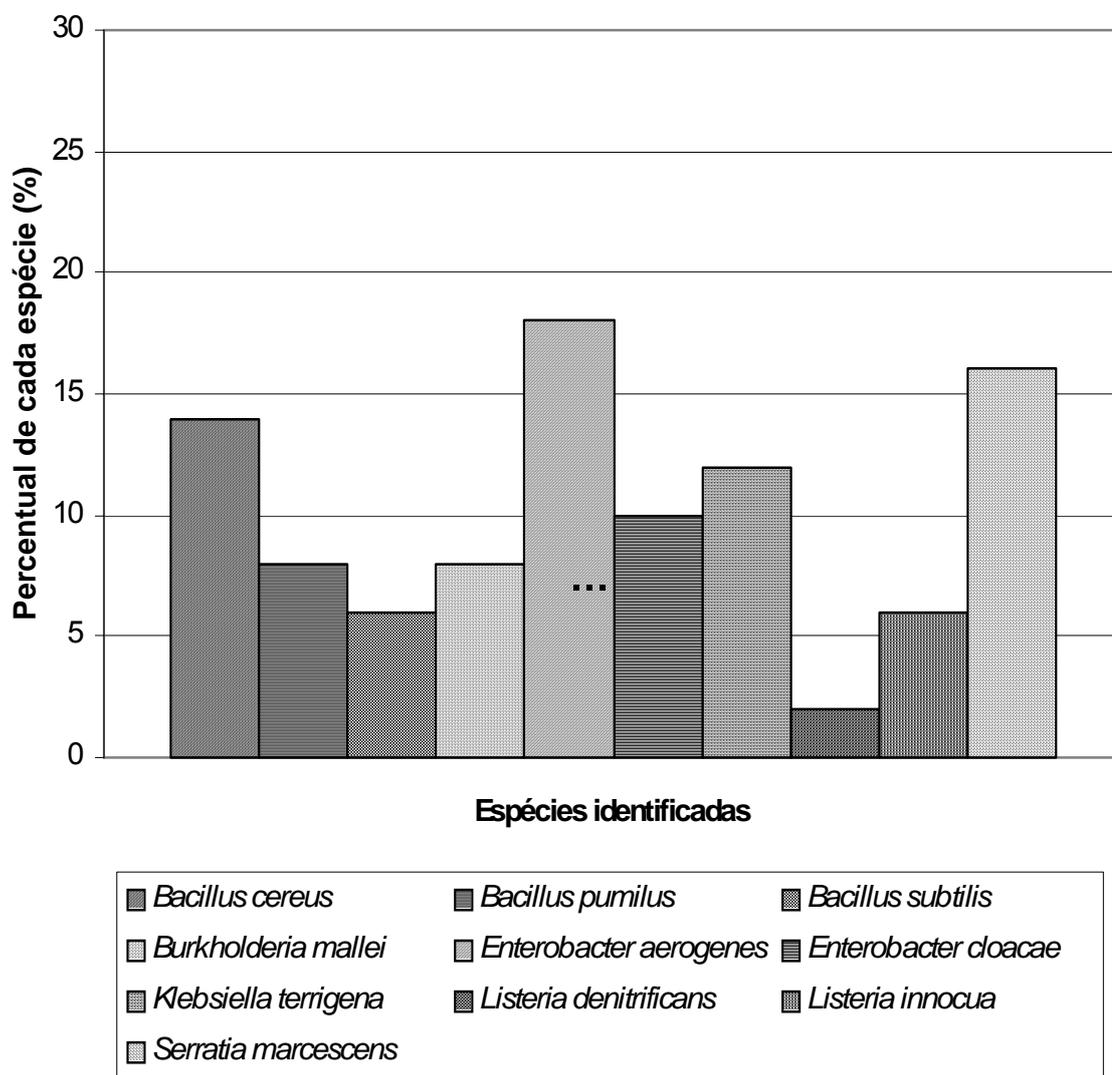


FIGURA 4: Espécies isoladas e identificadas durante a terceira coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).

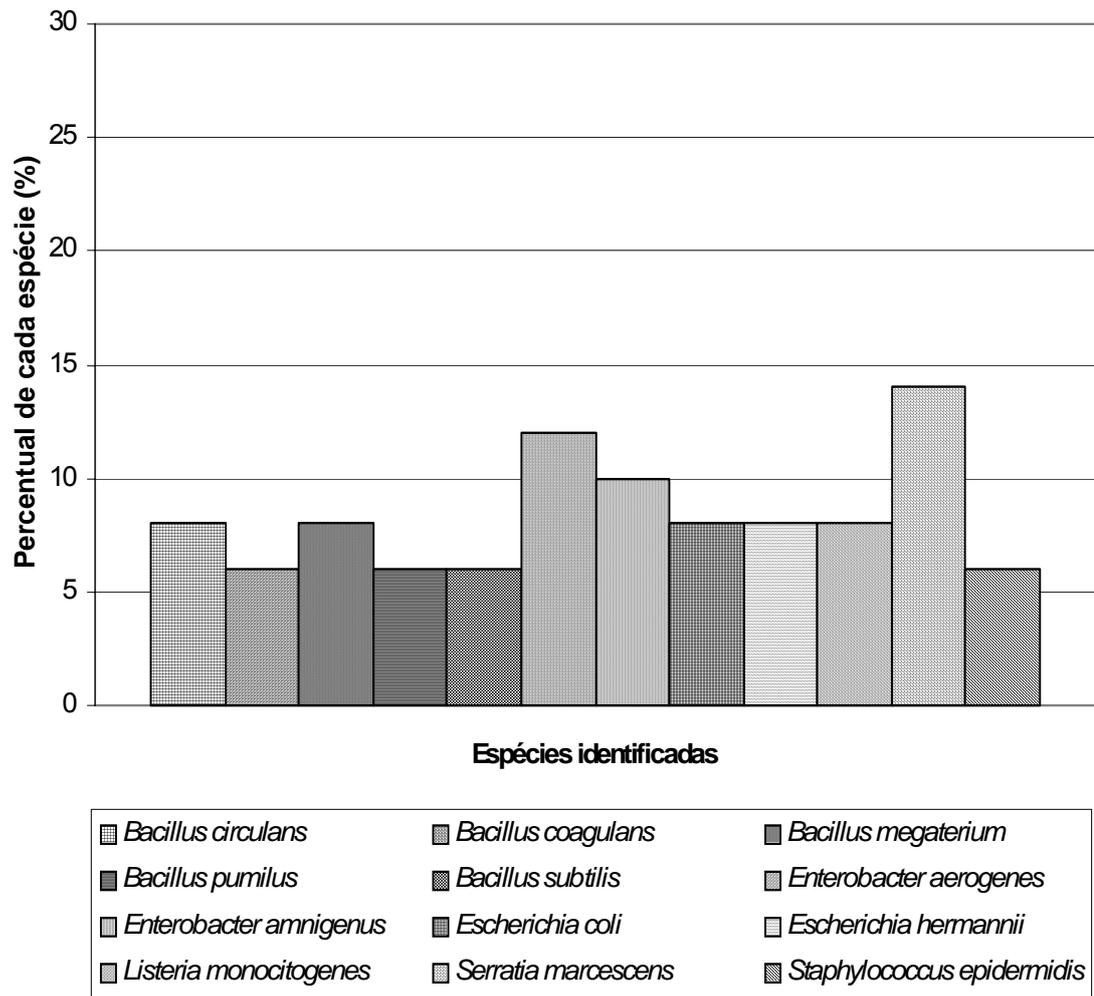


FIGURA 5: Espécies isoladas e identificadas durante a quarta coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).

O gênero *Staphylococcus* faz parte da flora normal da pele de humanos, sendo aqui representado pelo *S.epidermidis*. Apresentou baixa incidência, na metade das coletas (1, 2, 4, 8, 10) (Figuras 2, 3, 5, 9 e 11). Hassen et al., (2001) observaram uma alta concentração de isolados deste gênero, $1,0 \times 10^7$ células/g no início da compostagem e uma redução do aparecimento $1,0 \times 10^3$ células/g no final do processo. Estes autores também não identificaram exemplares da espécie *S. aureus*, um importante causador

de intoxicações alimentares.

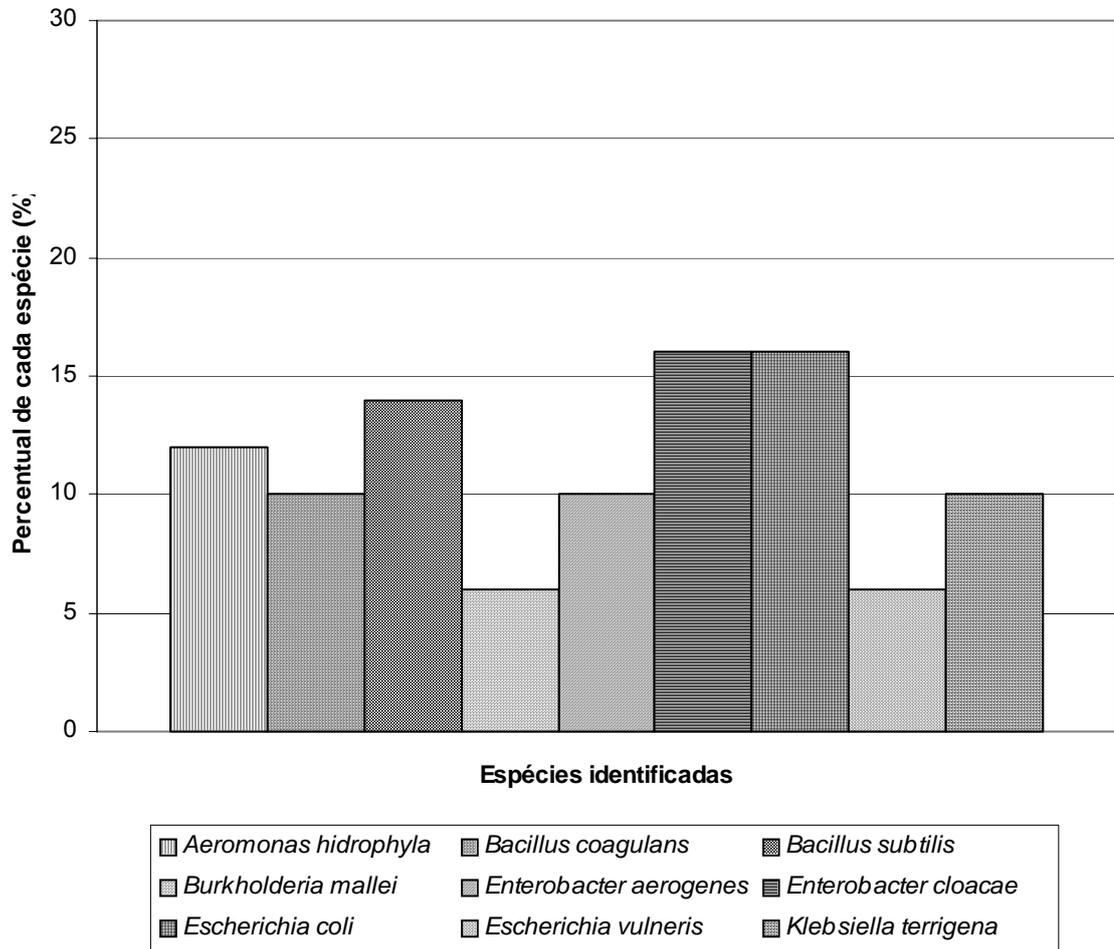


FIGURA 6: Espécies isoladas e identificadas durante a quinta coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).

O gênero *Escherichia* foi o segundo mais abundante e foram identificadas três espécies: *E. coli*, *E. hermannii* e *E. vulneris*. Este gênero esteve presente em quase todas as coletas, com exceção da coleta 3 (Figura 4), sendo predominante na coleta 9 (Figura 10). Apresentou oscilação na sua frequência nas primeiras coletas, e um aumento gradual a partir da coleta 7 (Figura 8), onde a temperatura de 35°C, na qual se encontrava a leira, propicia

um melhor desenvolvimento para este organismo. Todas as espécies identificadas são reconhecidas como parte da flora intestinal de animais de sangue quente, porém, alguns subgrupos de *E. coli* podem ser patogênicos. As espécies *E.hermannii* e *E. vulneris* são consideradas oportunistas e ocasionalmente causam infecções em humanos. Analisando-se a figura 1 verifica-se que este gênero apresentou um declínio em algumas etapas do processo, mas o mesmo não se manteve, como era o esperado devido a ação sanitizadora da compostagem.

E.coli é a espécie bioindicadora utilizada para a verificação da presença e quantificação de coliformes fecais nas mais diferentes amostras (Hassen et al.,2001). Assim, analisando os resultados da tabela 3 observa-se um aumento no índice de coliformes fecais na coleta 5. Também se observa um aumento no percentual de *E. coli* identificados nesta coleta, 8% (Figura 6), sendo, junto com *Enterobacter*, o gênero predominante nesta coleta. Nenhum isolado de *E.coli* foi identificado na coleta anterior. A elevação destes índices, no meio do processo, não condiz com a tendência de redução imposta pela compostagem (Hassen et al., 2001; Déportes et al., 1998; Tiquia e Tam, 2000).

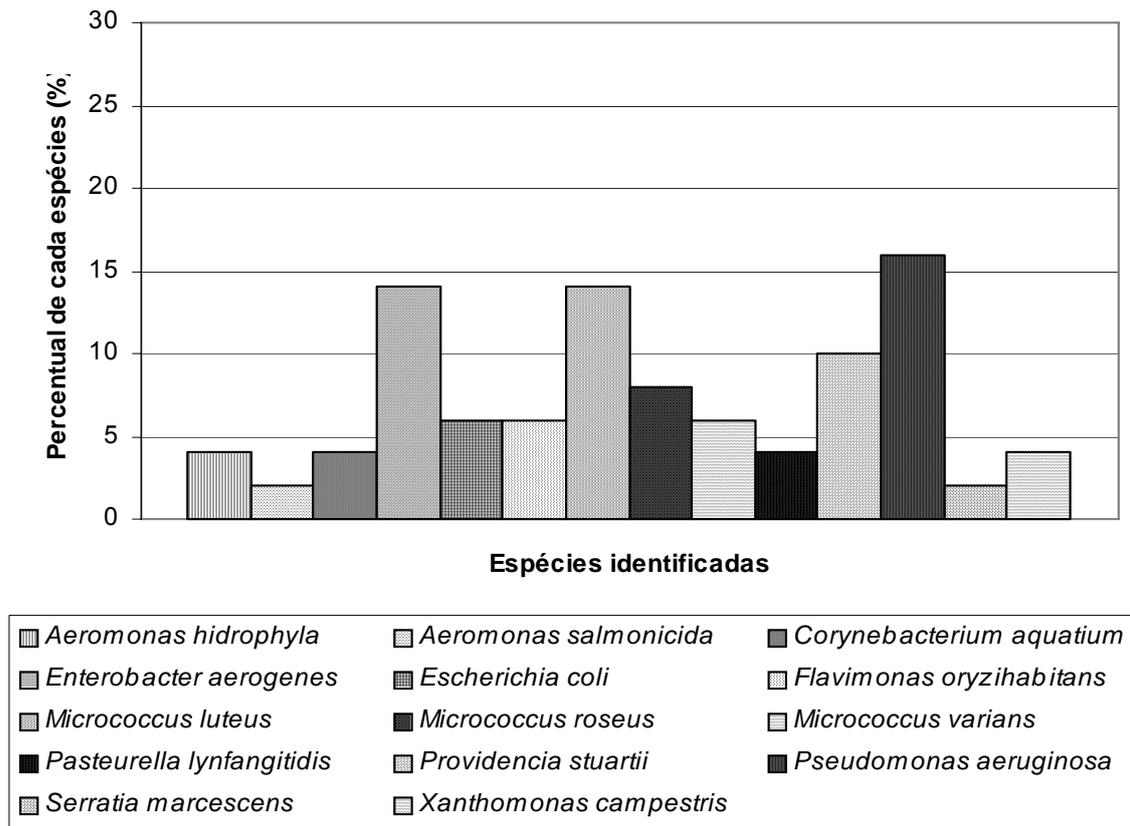


FIGURA 7: Espécies isoladas e identificadas durante a sexta coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).

Este aumento dos índices pode ter ocorrido devido a uma recontaminação do material compostado através da rega da leira com chorume, para manter sua umidade, ou através do revolvimento mecânico da leira. O chorume utilizado é oriundo de diversas leiras em diferentes fases do processo de compostagem. Assim, a utilização de um chorume de uma leira, que não tenha alcançado a fase termofílica, para regar uma que já tenha passado por esta fase, pode contaminar a última com bactérias patogênicas e coliformes. O revolvimento mecânico da leira, neste caso, é feito com o auxílio de uma retroescavadeira, sendo utilizada em várias leiras sem nenhum tipo de limpeza ou cuidado para evitar uma recontaminação entre as mesmas. Para precavermos a recontaminação de um material já sanitizado, devemos evitar o

uso do chorume para rega das leiras e o revolvimento mecânico sem controle de sanitização.

Além disso, a manutenção destes microrganismos pode estar relacionada com a temperatura mesofílica em que se encontrava a leira após a contaminação (43°C), na fase de maturação do composto, onde ocorre a recolonização da leira por microrganismos mesófilos.

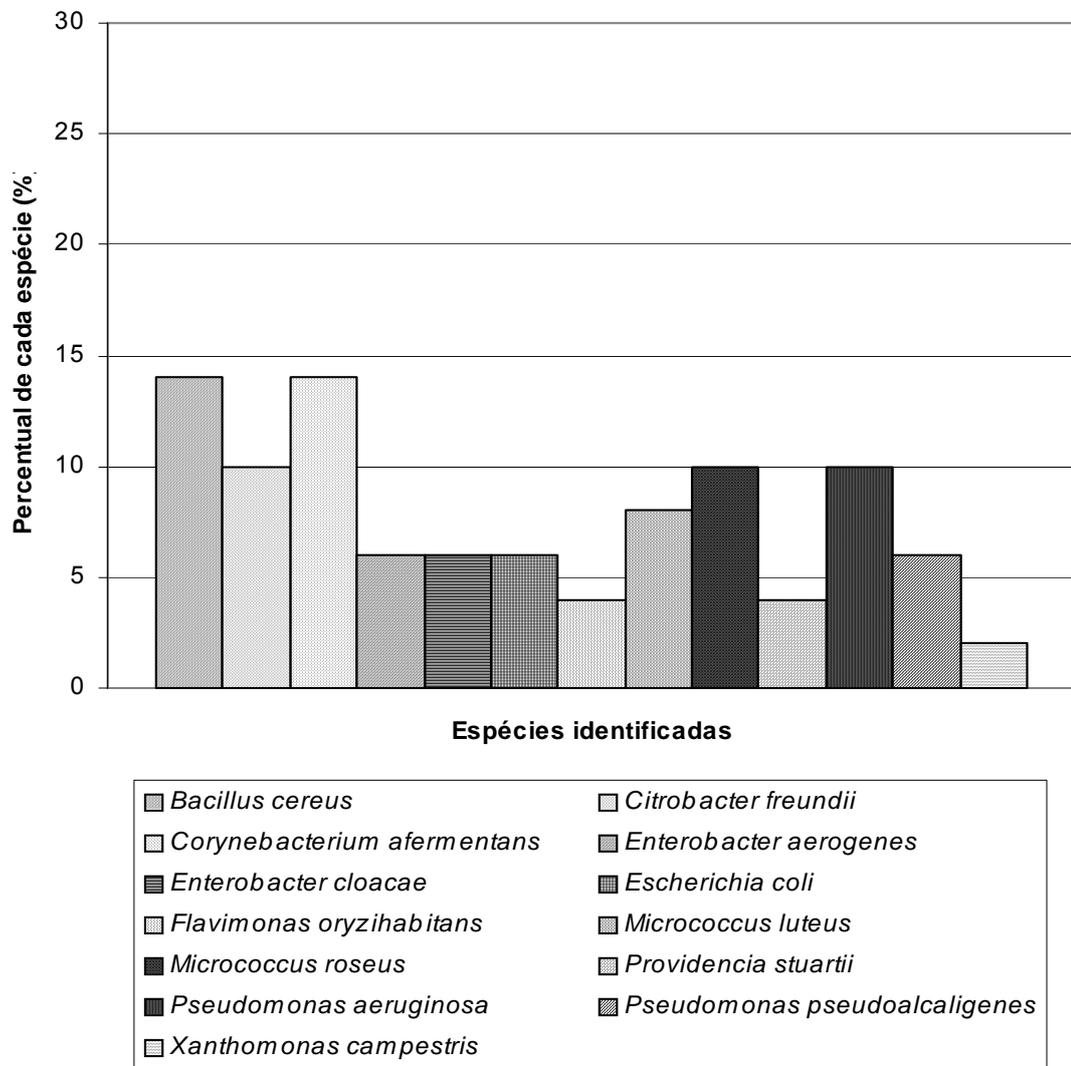


FIGURA 8: Espécies isoladas e identificadas durante a sétima coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).

O gênero *Pseudomonas* foi representado pelas espécies *P.aeruginosa* e *P.pseudoalcaligenes*. Este gênero é amplamente distribuído na natureza, especialmente no solo e na água. São bactérias de vida livre ou em associação com plantas. A *P. aeruginosa* é um patógeno humano e de animais. Este gênero somente foi detectado após a coleta 6 (Figura 7), o que corresponde a três meses de tratamento da compostagem. Nas coletas seguintes ocorreram aumentos graduais no número de isolados identificados (Figuras 8 a 11), sendo que o gênero foi predominante nas coletas 8 e 10 (Figuras 9 e 11). Na última coleta, este gênero representou 28% do número de isolados identificados (Figura 11).

A alta incidência de *P. aeruginosa* na coleta 10, pode ser um fator determinante sobre a qualidade do composto, pois nesta coleta, já temos um composto curado, pronto para ser utilizado como adubo orgânico. A presença de microrganismos patogênicos demonstra que o processo de compostagem não foi eficaz para a eliminação dos mesmos, e que este composto não deve ser utilizado para fins agrícolas.

Observou-se no decorrer das últimas coletas um aumento no número de isolados de *Pseudomonas* e um decréscimo no número de isolados dos gêneros que eram predominantes nas primeiras coletas. Este evento pode ser decorrente da escassez de nutrientes de fácil degradação, no final do processo de compostagem. Desta forma, *Pseudomonas*, por se tratar de um gênero com uma grande variabilidade metabólica e com características que favorecem a degradação de substâncias recalcitrantes (Cunha e Leite, 1997;

Truffaut et al., 2001; Vogel e Ballerini,2001), conseguiu manter-se no ambiente que não era mais propício para a grande maioria dos demais gêneros.

Os dados obtidos neste trabalho indicaram a prevalência do gênero *Pseudomonas* no final do processo, assim como no trabalho de Hoffmeister (2001). No entanto, nos trabalhos realizados pelos autores Tiquia e Tam, (1999); Déportes et al., (1998); Blanc et al., (1998); Hassen et al., (2001) e Dees e Ghiorse, (2001), nenhum exemplar deste gênero foi isolado em seus estudos.

A contaminação do composto por *Salmonella* e *Shigella* é considerada um dos maiores problemas referentes à qualidade do produto. Estes gêneros possuem alta taxa de crescimento e são muitos os relatos de recolonização, por estes microrganismos, do material compostado. Tiquia e Tam, (2000) e Sidhu et al., (2001) apontam a temperatura, a falta de nutrientes e a competição com as demais populações como os fatores responsáveis pela eliminação da *Salmonella* no composto.

Os gêneros *Salmonella* e *Shigella* não foram isolados em nenhuma das coletas realizadas, mesmo tendo sido utilizados meios seletivos para estes gêneros. Isso pode ter ocorrido pela ausência, de fato, destes dois gêneros ou pela ineficiência dos processos de pré-enriquecimento, ou ainda, pela presença em níveis abaixo do limite de detecção (Déportes et al., 1998). Talvez haja a necessidade da utilização de métodos complementares para a confirmação da presença ou ausência destes dois gêneros.

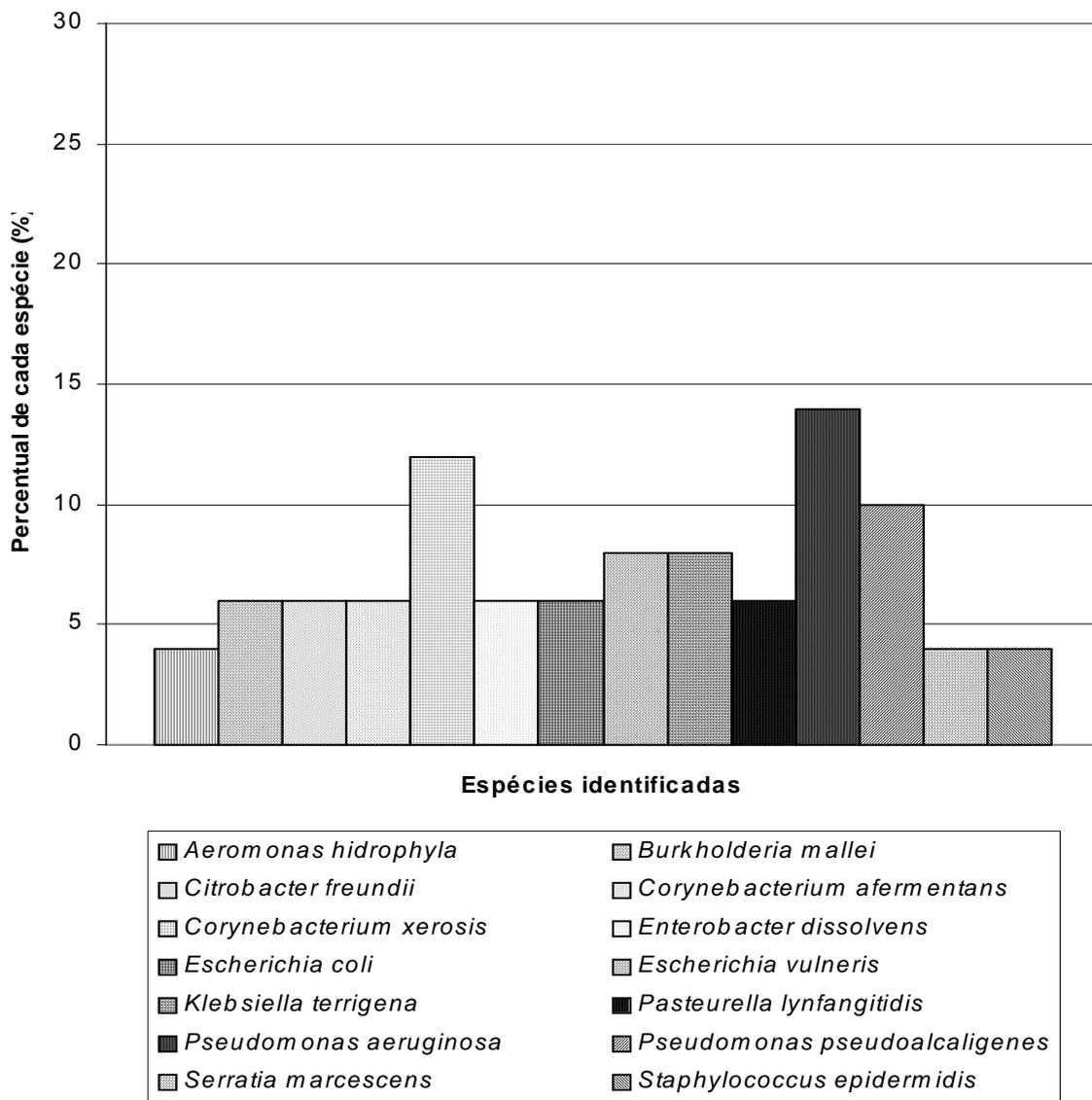


FIGURA 9: Espécies isoladas e identificadas durante a oitava coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).

Três espécies do gênero *Listeria* foram isoladas, *L. innocua*, *L. denitrificans* e *L. monocytogenes*, sendo a última causadora de infecções em humanos. As espécies deste gênero são largamente encontradas nos mais diversos ambientes: água, solo, lodo ou lixo, principalmente onde existe material vegetal em decomposição. Portanto, estes microrganismos podem ser encontrados no resíduo sólido urbano sendo compostado. Este gênero

apresentou uma baixa e irregular freqüência no início do processo, voltando a incidir nas coletas 9 e 10 (Figuras 10 e 11), com uma elevação do número de isolados. Na última coleta, *L. monocytogenes* representou 8% dos isolados identificados (Figura 11), e sendo esse um patógeno, poderá representar um risco para a saúde pública se este composto for utilizado como adubo orgânico.

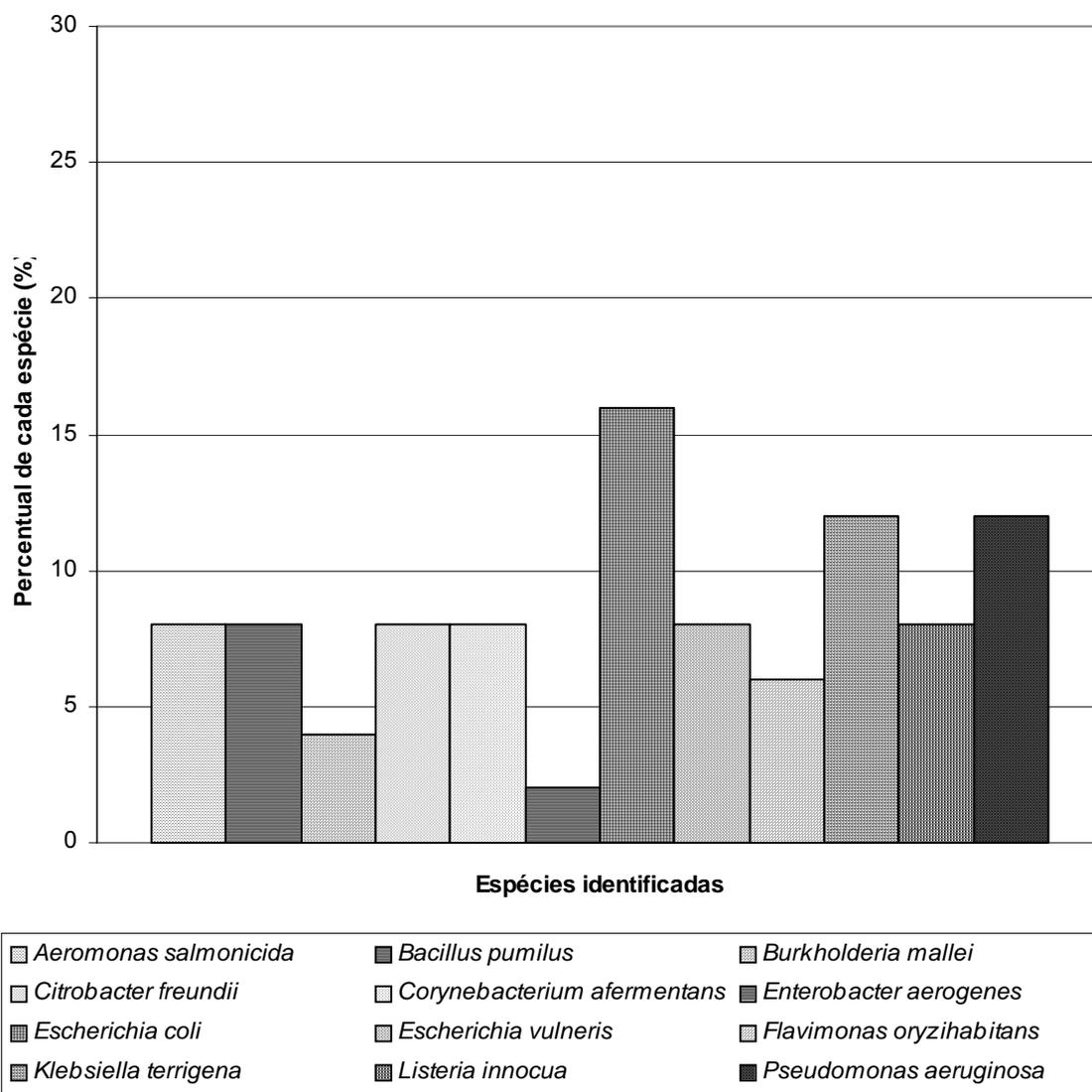


FIGURA 10: Espécies isoladas e identificadas durante a nona coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).

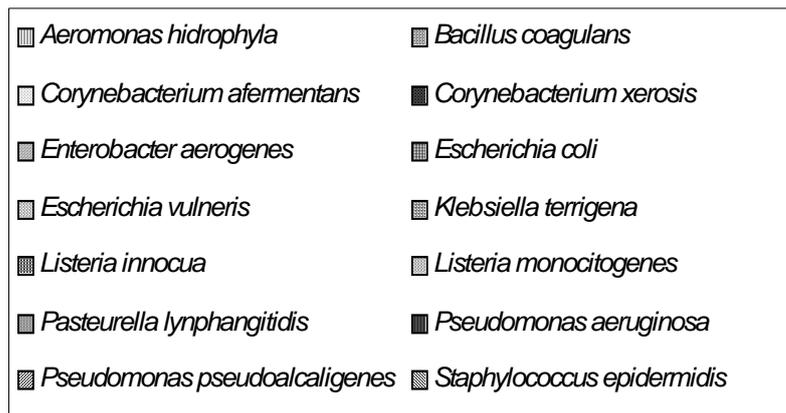
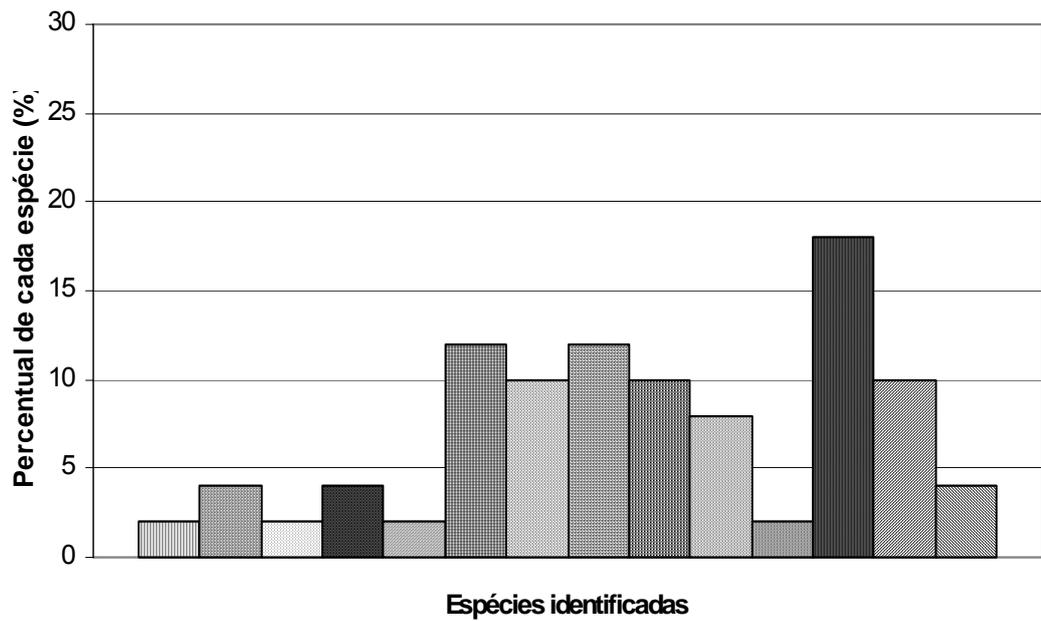


FIGURA 11: Espécies isoladas e identificadas durante a décima coleta em leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos (n=50).

O presente trabalho verificou uma pequena diversidade de gêneros bacterianos nas amostras analisadas e os resultados obtidos indicam que não ocorreram grandes variações nessa diversidade, sem diferença significativa entre as coletas. O índice de Shannon-Weaver calculado, para cada coleta, encontra-se na tabela 5.

TABELA 5 : Índice de Shannon-Weaver calculado, por coleta, ao longo do processo de compostagem.

		Coletas									
		C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	C 8	C 9	C 10
N° gêner.		10	9	6	6	6	11	10	11	11	10
N° espéc.		14	13	10	12	9	14	13	14	12	14
Índice		2,28	2,48	2,18	2,44	2,14	2,45	2,72	2,56	2,39	2,4

Observa-se que o índice de diversidade variou de 2,14 a 2,72. A menor diversidade encontrada foi na coleta 5, onde a temperatura da leira encontrava-se a 43°C, após o término da fase termofílica. Nesta fase, começa a ocorrer a recolonização da leira de compostagem por organismos mesófilos, após um longo período de altas temperaturas, o que pode explicar a baixa ocorrência de números de isolados de gêneros e espécies diferentes. Observou-se nesta coleta um número maior de isolados em determinados gêneros que são mais resistentes a altas temperaturas. Nesta coleta, foram identificados 6 gêneros e 9 espécies diferentes. Na coleta 7 onde houve maior diversidade foram encontrados 10 gêneros e 13 espécies diferentes.

O gênero quantitativamente dominante presente nas duas primeiras amostragens deste trabalho foi o *Aeromonas* (Figuras 2 e 3). Na terceira e quinta coletas (Figuras 4 e 6), predominou o gênero *Enterobacter*, sendo intercalado pelo *Bacillus*. *Micrococcus* predominou durante as duas coletas seguintes, sendo substituído por *Pseudomonas*. Este gênero alternou-se com *Escherichia* na nona, voltando a predominar na décima coleta (Figura 11).

Blanc et al., (1999) observaram uma pequena diversidade de gêneros bacterianos e uma alteração bastante significativa dos gêneros predominantes, entre amostras coletadas no início e no final do processo, onde o gênero *Thermus* que era dominante nos estágios iniciais da compostagem teve um decréscimo, culminando no seu desaparecimento, passando o gênero *Bacillus* a ser dominante.

4.6 Avaliação da resistência a antimicrobianos

Para a determinação da resistência a antimicrobianos, foram utilizados 18 antimicrobianos, sendo que apenas para 11 foi detectada resistência bacteriana (ácido nalidíxico, amicacina, ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, gentamicina, penicilina, polimixina B, rifampicina, tetraciclina e trimetoprima). Os antimicrobianos que apresentaram maior incidência de resistência entre os isolados foram o cloranfenicol (51,1%), ampicilina (45%) e tetraciclina (34,6%) (Tabela 6).

A incidência da resistência a estes compostos está demonstrado na figura 12. Observa-se que as resistências ao cloranfenicol e a tetraciclina foram as que mais prevaleceram durante o decorrer do processo, presentes nas dez coletas e com um índice elevado e constante, principalmente nas cinco primeiras coletas.

Dos 500 organismos isolados durante o processo de compostagem, 133 apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos, perfazendo o total de 26,6% das bactérias estudadas. A tabela 7 mostra o padrão de resistência apresentado por estes organismos em relação ao número de antimicrobianos testados. Observou-se que cinco gêneros não apresentaram resistência a

nenhum antimicrobiano, e a resistência a quatro destes compostos foi a mais encontrada, em quatro gêneros (*Bacillus*, *Citrobacter*, *Corynebacterium* e *Escherichia*). No trabalho realizado por Sabry et al. (1997), em que analisaram os padrões de resistência a antimicrobianos de uma população bacteriana isolada de água marinha, os autores observaram que esta população apresentou uma maior incidência de resistência a um número baixo destes compostos, um, dois e três.

TABELA 6. Incidência da resistência dos antimicrobianos testados em isolados de uma leira de compostagem

Antimicrobiano	% de isolados totais (n=500)	% de isolados resistentes (n=133)
Ácido Nalidíxico	6,8	25,6
Amicacina	2,6	9,8
Ampicilina	12,0	45,0
Cefalotina	1,0	3,8
Cefoxatina	0,0	0,0
Cloranfenicol	13,6	51,1
Cotrimoxazol	0,0	0,0
Eritromicina	0,0	0,0
Estreptomicina	0,0	0,0
Gentamicina	0,8	3,0
Imipinem	0,0	0,0
Norfloxacina	0,0	0,0
Penicilina G	5,0	18,8
Polimixina B	2,8	10,5
Rifampicina	0,4	1,5
Tetraciclina	9,2	34,6
Trimetoprima	1,2	4,5
Vancomicina	0,0	0,0

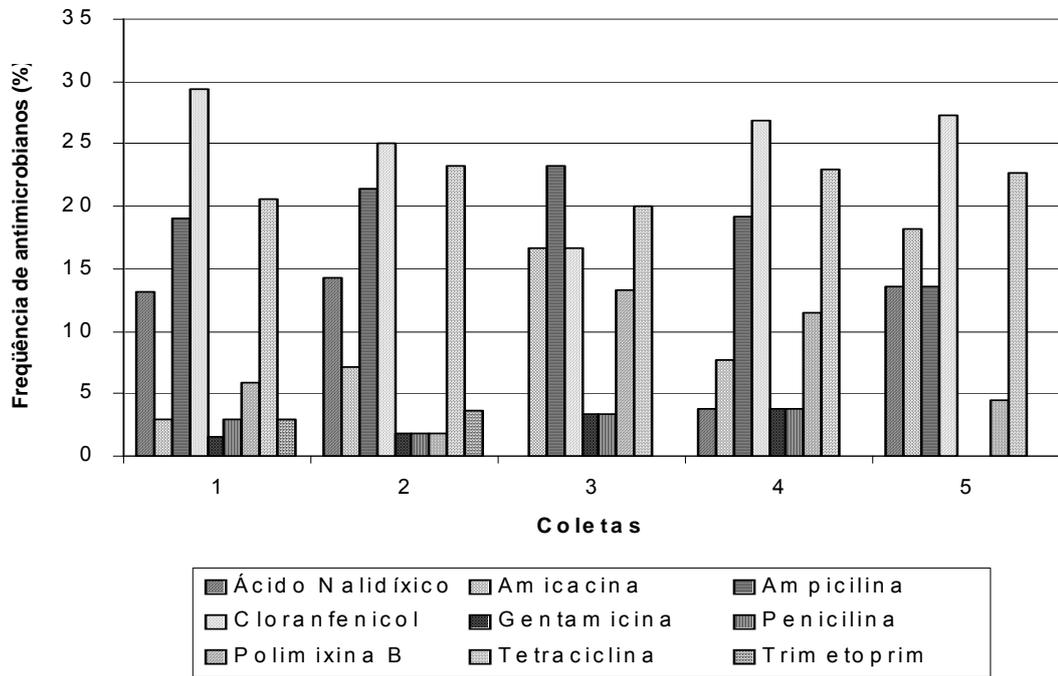
TABELA 7: Incidência de múltipla resistência a antimicrobianos dos gêneros identificados.

N° de antimicrobianos	N° de gêneros	Gêneros
0	5	<i>Burkholderia, Flavimonas, Pasteurella, Providencia, Xanthomonas</i>
1	0	-----
2	2	<i>Micrococcus, Staphylococcus</i>
3	3	<i>Klebsiella, Listeria, Serratia</i>
4	4	<i>Bacillus, Citrobacter, Corynebacterium, Escherichia</i>
5	2	<i>Aeromonas, Enterobacter</i>
6	1	<i>Pseudomonas</i>

Entre os 17 gêneros estudados, 12 apresentaram resistência a antimicrobianos, dentre os quais os com maior incidência de resistência foram *Enterobacter* (19,5%), *Bacillus* (15,8%), *Escherichia* (15,8%) e *Aeromonas* (12%). Os resultados mostraram também que *Aeromonas* e *Enterobacter* apresentaram um maior número de representantes resistentes entre os isolados de seus gênero, 37,2% e 34,7% respectivamente (Tabela 8).

Em um estudo realizado para analisar a resistência antimicrobiana da população bacteriana em um rio tropical, Pathak et al. (1993) observaram a predominância da resistência a ampicilina (42%), seguida pela resistência a tetraciclina (40%), cloranfenicol (17,6%) e estreptomicina (17,6%). Já em bactérias heterotróficas oriundas de água mineral, o perfil de resistência apresentado foi de cloranfenicol (60%), ampicilina (55%), colistina (50%) e sulfametizole (47,5%) (Messi et al., 2004).

(A)



(B)

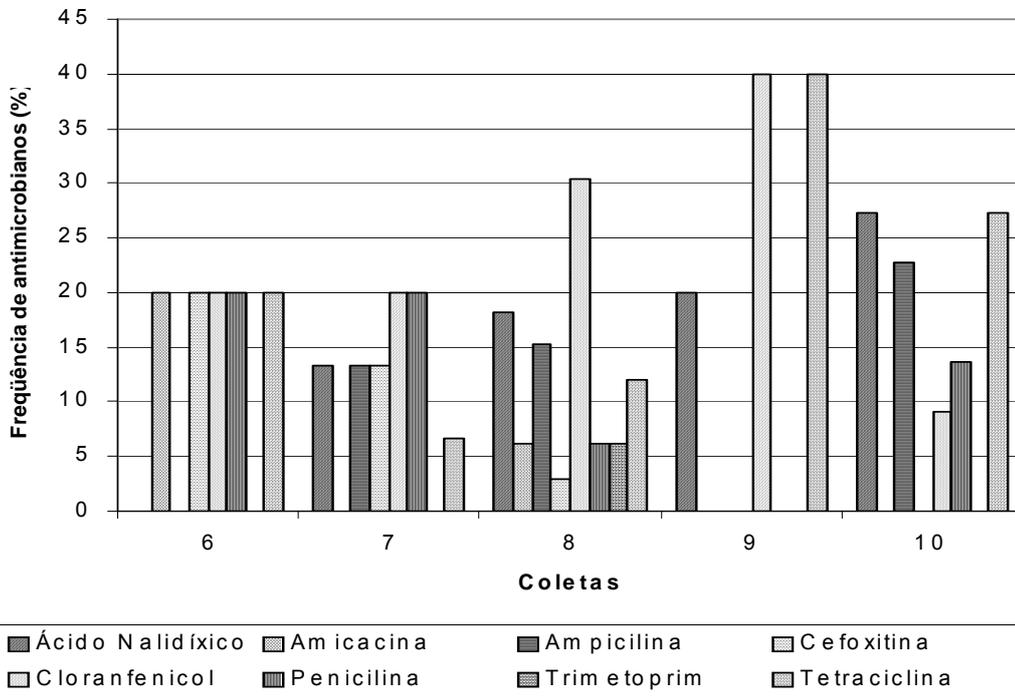


FIGURA 12: Incidência da resistência a antimicrobianos nos gêneros resistentes isolados e identificados durante o processo de compostagem. A: coletas 1, 2, 3, 4 e 5; B : coletas 6, 7, 8, 9 e 10.

TABELA 8: Porcentagem de isolados resistentes a antimicrobianos, isolados de uma leira de compostagem.

Gênero	% isolados totais (n=500)	% isolados resistentes (n=133)	% isolados do gênero
<i>Aeromonas</i>	3,2	12,0	37,2
<i>Bacillus</i>	4,2	15,8	31,3
<i>Citrobacter</i>	0,4	1,5	15,4
<i>Corynebacterium</i>	1,8	6,8	28,1
<i>Enterobacter</i>	5,2	19,5	34,7
<i>Escherichia</i>	4,2	15,8	29,6
<i>Klebsiella</i>	1,8	6,8	31,0
<i>Listeria</i>	1,2	4,5	28,6
<i>Micrococcus</i>	0,6	2,3	13,0
<i>Pseudomonas</i>	2,6	9,8	27,1
<i>Serratia</i>	1,0	3,8	22,7
<i>Staphylococcus</i>	0,4	1,5	18,2
TOTAL	26,6	100	

O gênero *Enterobacter* apresentou resistência a amicacina, ampicilina, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina, sendo que, de seus isolados resistentes, 65,4% foi resistente a cloranfenicol, 61,5% a ampicilina e 61,5% a tetraciclina (Tabela 9). Na coleta 1, onde houve 32 isolados resistentes, o maior número de todo o processo, 28,1% dos mesmos são do gênero *Enterobacter* (Figura 13), apresentando equivalência na resistência a ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina (Tabela 10).

O gênero *Bacillus* apresentou resistência a ampicilina, cloranfenicol, polimixina B e tetraciclina. 66,7% de seus isolados resistentes apresentaram incidência para polimixina B, 52,4% a ampicilina e 42,9% a cloranfenicol (Tabela 9). Nas coletas 3 e 4, o gênero *Bacillus* representou o maior número de isolados resistentes, 31,3% e 41,7%, respectivamente, destes (Figura 13). Neste gênero observou-se a prevalência de resistência a ampicilina e polimixina B (Tabela 9). Em trabalho realizado por Allen et al (1977),

exemplares do gênero *Bacillus*, isolados de estuário, apresentaram maior incidência de resistência a ampicilina e cloranfenicol.

O gênero *Escherichia* apresentou resistência a ácido nalidíxico, ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina, sendo que, entre os isolados resistentes, 71,4% apresentaram resistência para cloranfenicol, 57,1% a ampicilina e 57,1% a ácido nalidíxico (Tabela 9). Em um estudo realizado por Reinthaler et al. (2003), para analisar a resistência a antimicrobianos de *E. coli* em esgoto e lodo, foi observado que esta bactéria apresentou alta taxa de resistência a tetraciclina (24%), ampicilina (18%), ácido nalidíxico (máximo de 15%), e baixa taxa de resistência a cloranfenicol (0 a 8%).

O gênero *Aeromonas* apresentou resistência a ácido nalidíxico, ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina e trimetoprima. Entre seus isolados resistentes, 62,5% apresentaram resistência a cloranfenicol, 56,3% a ácido nalidíxico e 43,8% a ampicilina (Tabela 9). Miranda e Castillo (1998) observaram, em exemplares de aeromonados, encontrados em fontes de águas contaminadas, uma maior incidência de resistência a carbenicilina, eritromicina e cefradina, e uma baixa incidência de tetraciclina e ácido nalidíxico.

Na coleta 1, houve uma maior frequência de resistência ao cloranfenicol (29,4%) e tetraciclina (20,6%) (Figura 12). Os gêneros resistentes que predominaram, nesta coleta, foram *Enterobacter* e *Aeromonas*, representando 28,1% e 21,9%, respectivamente, do total de 32 isolados resistentes desta coleta (Figura 13). *Enterobacter* e *Aeromonas* apresentaram sua maior incidência de resistência na coleta 1, sendo que *Enterobacter* apresentou

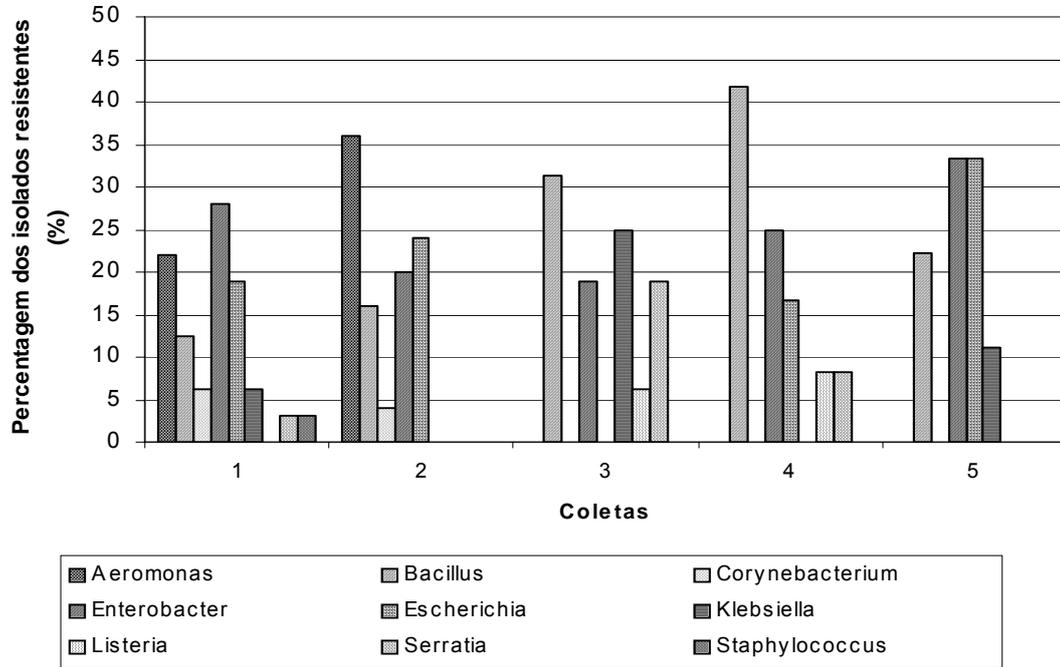
81,8% de seus isolados resistentes nesta coleta e destes, 66,7% apresentaram equivalência na resistência a ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina. Nesta mesma coleta o gênero *Aeromonas* apresentou 41,2% de seus isolados resistentes. Destes, 57,1% foram resistentes a cloranfenicol e nenhum apresentou resistência a tetraciclina, porém apresentou resistência a outros antimicrobianos (Tabela 10). Assim, a prevalência da incidência à tetraciclina não se deve somente aos gêneros com maior número de isolados resistentes na coleta, e sim, a presença de mais gêneros com menor número de organismos resistentes porém com uma alta incidência de resistência a este antimicrobiano, como *Escherichia*, *Klebsiella* e *Serratia* (Tabela 10).

Na coleta 2, novamente os antimicrobianos para os quais os microrganismos apresentaram a maior frequência de resistência foi o cloranfenicol (25%) e a tetraciclina (23,2%) (Figura 12). Os gêneros predominantes foram *Aeromonas* e *Escherichia*, representando 36% e 24%, respectivamente, do total de 25 isolados resistentes na coleta (Figura 13). De todos os isolados de *Aeromonas*, nesta coleta, 81,8% foram resistentes, sendo que destes, 77,8% foram resistentes a cloranfenicol e 33,3% a tetraciclina. O gênero *Escherichia* apresentou entre os seus isolados da coleta, 75% deles resistentes, sendo que destes, 66,7% apresentaram resistência a ampicilina e 50%, resistência a cloranfenicol e tetraciclina. Gêneros com menor número de isolados também apresentaram alta incidência a estes antimicrobianos, como *Enterobacter*, *Bacillus* e *Corynebacterium*, mantendo assim este padrão de resistência (Tabela 10).

Na coleta 3, a maior frequência de resistência foi para ampicilina (23,3%) e tetraciclina (20%) (Figura 12). *Bacillus* e *Klebsiella*, com 31,3% e 25%, respectivamente, foram os gêneros que apresentaram maior número do total de isolados resistentes desta coleta (Figura 13). O gênero *Bacillus* apresentou 35,7% de seus isolados na coleta resistentes, sendo que destes, 60% apresentaram resistência a ampicilina, 20% a amicacina e 80% a polimixina B. Nesta coleta, este gênero foi o único que apresentou resistência a este último antimicrobiano (Tabela 10). 66,7% de isolados do gênero *Klebsiella* desta coleta, foram resistentes; sendo que destes, 50% foram resistentes ao mesmo tempo a amicacina, ampicilina e tetraciclina. Nesta coleta, a alta incidência de resistência a tetraciclina se deve não somente a presença de *Klebsiella*, mas também a presença de *Enterobacter* e *Serratia* (Tabela 10).

Na coleta 4, os isolados resistentes apresentaram a maior taxa de resistência novamente ao cloranfenicol (26,9%) e tetraciclina (23%), como já havia acontecido nas coletas 1 e 2 (Figura 12). *Bacillus* e *Enterobacter* foram os gêneros resistentes predominantes, representando 41,7% e 25%, respectivamente, dos 12 isolados resistentes encontrados nesta coleta (Figura 13). O gênero *Bacillus* apresentou 29,4% de seus isolados desta coleta resistentes, sendo que 60% destes apresentaram resistência a cloranfenicol e 20% a tetraciclina. Do total de isolados do gênero *Enterobacter* nesta coleta, 27,3% foram resistentes, sendo que destes, 66,7% apresentaram resistência equivalente a tetraciclina e cloranfenicol (Tabela 10).

A)



B)

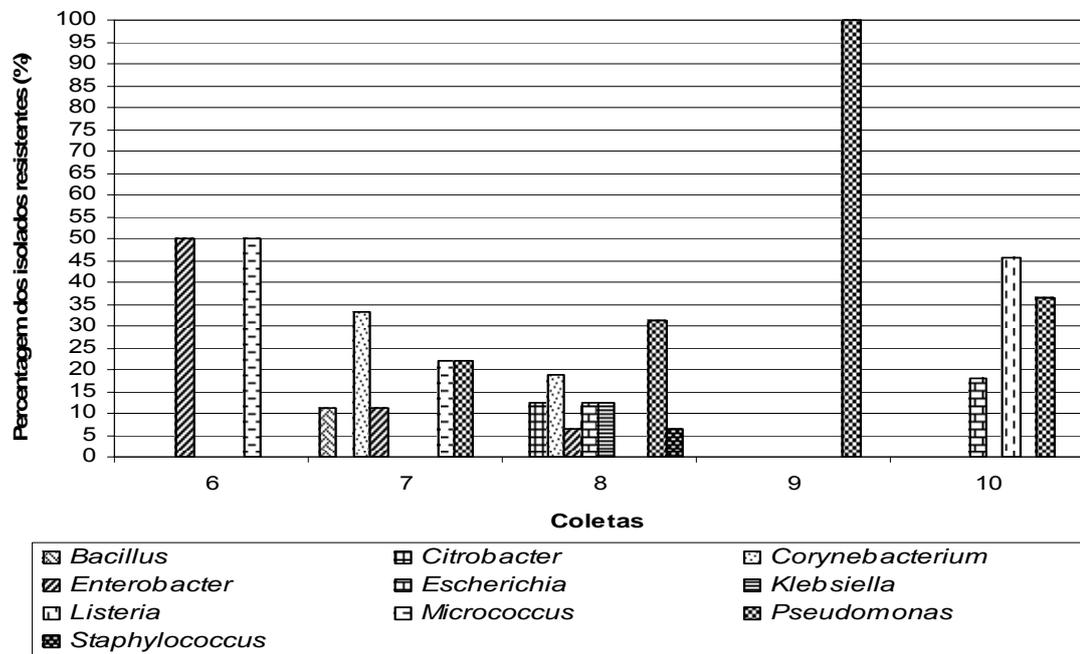


FIGURA 13. Frequência dos isolados resistentes a antimicrobianos, em cada coleta, durante o processo de compostagem. A : porcentagem de isolados resistentes nas coletas 1, 2, 3, 4 e 5; B : porcentagem de isolados nas coletas 6, 7, 8, 9 e 10.

Uma maior frequência de resistência aos antimicrobianos cloranfenicol (27,3%) e tetraciclina (22,7%) também foi observada na coleta 5 (Figura 12), onde os gêneros *Escherichia* e *Enterobacter* foram os que apresentaram maior taxa de resistência, representando 66,6% dos 9 isolados resistentes desta coleta (Figura 13). Todos os isolados resistentes do gênero *Escherichia* desta coleta, 37,5%, apresentaram resistência a cloranfenicol e somente 33,3% destes, a tetraciclina. O gênero *Enterobacter* apresentou, nesta coleta, 23% de seus isolados resistentes, sendo que destes, todos apresentaram resistência a tetraciclina e 66,7%, a cloranfenicol. Nesta coleta, o gênero *Bacillus* também contribuiu com a incidência a cloranfenicol (Tabela 10).

Na coleta 6, houve uma frequência equivalente a amicacina, cefalotina, cloranfenicol, penicilina e tetraciclina (20%) (Figura 12) e os únicos gêneros que apresentaram resistência foram *Enterobacter* e *Micrococcus*, representando 50%, cada um (Figura 13). Todos os isolados resistentes de *Enterobacter* nesta coleta, 14,3%, apresentaram resistência a amicacina, cloranfenicol e tetraciclina, e todos os de *Micrococcus*, 7,1%, apresentaram resistência a cefalotina e penicilina (Tabela 10).

TABELA 9. Distribuição da resistência a antimicrobianos dos gêneros isolados de uma leira de compostagem de resíduos sólidos urbanos.

Gênero	N° total isolad.	N° isolados resistent.	AMI	AMP	CFL	CLO	GEN	NAL	PEN	POL	RIF	TET	TRI
<i>Aeromonas spp.</i>	43	16 (37,2%)		7 (43,8%)		10 (62,5%)		9 (56,3%)				6 (37,5%)	4 (25%)
<i>Bacillus spp.</i>	67	21 (31,3%)		11 (52,4%)		9 (42,9%)				14 (66,7%)		7 (33,3%)	
<i>Citrobacter spp.</i>	13	2 (15,4%)		1 (50%)		2 (100%)		2 (100%)				1 (50%)	
<i>Corynebacterium spp.</i>	32	9 (28,1%)			3 (33,3%)	7 (77,8%)			6 (66,7%)		2 (22,2%)		
<i>Enterobacter spp.</i>	75	26 (34,7%)	9 (34,6%)	16 (61,5%)		17 (65,4%)	4 (15,4%)					16 (61,5%)	
<i>Escherichia spp.</i>	71	21 (29,6%)		12 (57,1%)		15 (71,4%)		12 (57,1%)				1 (4,8%)	
<i>Klebsiella spp.</i>	29	9 (31%)	3 (33,3%)	6 (66,6%)								4 (44,4%)	
<i>Listeria spp.</i>	21	6 (28,6%)			1 (16,7%)			3 (50%)	5 (83,3%)				
<i>Micrococcus spp.</i>	23	3 (13%)			1 (33,3%)				3 (100%)				
<i>Pseudomonas spp.</i>	48	13 (27,1%)	1 (7,7%)	6 (46,2%)		7 (53,8%)		8 (61,5%)				7 (53,8%)	2 (15,4%)
<i>Serratia spp.</i>	22	5 (22,7%)		1 (20%)								2 (40%)	
<i>Staphylococcus spp.</i>	11	2 (18,2%)				1 (50%)						2 (100%)	

Já na coleta 7, cloranfenicol e penicilina apresentaram a maior frequência de resistência, com 20% cada, seguidos por ampicilina, cefalotina e ácido nalidíxico, com incidência equivalente de 13,3% (Figura 12). Nesta coleta, *Micrococcus* representou 33,3% dos 9 isolados resistentes da coleta, e *Corynebacterium* e *Pseudomonas*, 22,2 % cada (Figura 13). Todos os isolados resistentes de *Micrococcus* desta coleta, 22,2%, apresentaram resistência a penicilina. *Pseudomonas* apresentou, entre os isolados nesta coleta, 16,7% de resistentes, destes 50% foram resistentes a ampicilina e cloranfenicol e 100% a ácido nalidíxico (Tabela 10).

Na coleta 8, predominou a resistência a cloranfenicol (30,3%) e ácido nalidíxico (18,2%) (Figura 12). Os gêneros *Pseudomonas* e *Corynebacterium*, apresentaram o maior número de isolados resistentes, desta coleta, 31,3% e 18,8%, respectivamente, dos 16 isolados resistentes (Figura 13). Dos isolados de *Pseudomonas*, nesta coleta, 62,5% foram resistentes, sendo que 60% destes, apresentaram resistência a ácido nalidíxico e cloranfenicol. Todos os isolados de *Corynebacterium resistentes* desta coleta, 42,8%, apresentam resistência a cloranfenicol, e destes, 33,3% a ácido nalidíxico (Tabela 10).

Na coleta 9, a resistência a cloranfenicol (40%), tetraciclina (40%) e ácido nalidíxico (20%) foram as mais encontradas (Figura 12), sendo que somente o gênero *Pseudomonas* apresentou resistência nesta coleta (Figura 13). Dos isolados, deste gênero, encontrados na coleta 9, 14,3% foram resistentes, sendo que destes, todos apresentaram resistência a cloranfenicol e 50%, a tetraciclina e ácido nalidíxico (Tabela 10).

Já na coleta 10, tetraciclina e ácido nalidíxico (27,3%), seguidos por ampicilina (22,7%) foram os antimicrobianos com maior frequência de resistência (Figura 12), sendo os gêneros *Listeria* e *Pseudomonas* os mais predominantes nesta coleta, representando 45,5% e 36,4%, respectivamente, dos isolados resistentes da mesma (Figura 13). Todos os isolados do gênero *Listeria* presentes nesta coleta, foram resistentes, sendo que 50% apresentaram resistência a ácido nalidíxico. Dos isolados do gênero *Pseudomonas*, nesta coleta, 66,7% apresentaram resistência, e destes, todos apresentaram resistência a tetraciclina e ampicilina, e 25% a cloranfenicol (Tabela 10).

Neste trabalho, as modificações apresentadas no perfil de resistência e nos índices de incidência a antimicrobianos de cada gênero, ao longo do processo de compostagem, pode evidenciar a ocorrência de transferência genética entre os isolados. Os genes que codificam os mecanismos de defesa a antimicrobianos estão localizados no cromossomo bacteriano ou em plasmídios extracromossomais, e são transmitidos a seus descendentes através da transferência genética vertical. Elementos genéticos, tais como plasmídios, podem também ser trocados entre bactérias de diferentes filiações taxonômicas (transferência genética horizontal) (Davidson, 1999). A transferência horizontal de plasmídios é a principal razão para a disseminação de genes resistentes no ambiente. A transferência de plasmídios entre bactérias ocorre em uma variedade de ambientes naturais, como solos, esgotos, sedimentos, águas (Chandrasekaran et al., 1998).

TABELA 10. Índice de resistência a antimicrobianos nos gêneros, identificados em cada coleta durante o processo de compostagem, que apresentaram resistência à algum antimicrobiano.

ANTIMICROBIANOS

Gênero	Coleta N° isolados	N° isolados resistent	AMI	AMP	CFL	CLO	GEN	NAL	PEN	POL	RIF	TET	TRI
<i>Aeromonas</i> spp.	1 / 17	7 (41,2%)		3 (42,9%)		4 (57,1%)		5 (71,4%)					2 (28,6%)
<i>Aeromonas</i> spp.	2 / 11	9 (81,8%)		3 (33,3%)		7 (77,8%)		4 (44,4%)				3 (33,3%)	1 (11,1%)
<i>Bacillus</i> spp.	1 / 4	4 (100%)	1 (25%)			2 (50%)				4 (100%)			
<i>Bacillus</i> spp.	2 / 10	4 (40%)	2 (50%)							1 (25%)		4 (100%)	
<i>Bacillus</i> spp.	3 / 14	5 (35,7%)	1 (20%)	3 (60%)						4 (80%)			
<i>Bacillus</i> spp.	4 / 17	5 (29,4%)	2 (40%)			3 (60%)				3 (60%)		1 (20%)	
<i>Bacillus</i> spp.	5 / 12	2 (16,7%)	1 (50%)			1 (50%)				1 (50%)			
<i>Bacillus</i> spp.	7 / 7	1 (14,3%)								1 (100%)			
<i>Citrobacter</i> spp.	8 / 3	2 (66,7%)				2 (100%)		2 (100%)				1 (50%)	
<i>Corynebacterium</i> spp	1 / 4	2 (50%)				1 (50%)			2 (100%)		1 (50%)		
<i>Corynebacterium</i> spp	2 / 3	1 (33,3%)				1 (100%)			1 (100%)				
<i>Corynebacterium</i> spp	7 / 7	3 (42,9%)			2 (66,7%)	2 (66,7%)			1 (33,4%)		1 (33,4%)		
<i>Corynebacterium</i> spp	8 / 9	3 (33,3%)			1 (33,3%)	3 (100%)			1 (33,3%)	1 (33,3%)			

TABELA 10 (continuação). Índice de resistência a antimicrobianos nos gêneros, identificados em cada coleta durante o processo de compostagem, que apresentaram resistência à algum antimicrobiano.

Gênero	Coleta N° isolados	N° isolados resistent	AMI	AMP	CFL	CLO	GEN	NAL	PEN	POL	RIF	TET	TRI
<i>Enterobacter</i> spp.	1 / 11	9 (81,8%)	1 (11,1%)	6 (66,7%)		6 (66,7%)	1 (11,1%)					6 (66,7%)	
<i>Enterobacter</i> spp.	2 / 8	5 (62,5%)	2 (40%)	4 (80%)		3 (60%)	1 (20%)					2 (40%)	
<i>Enterobacter</i> spp.	3 / 14	3 (21,4%)	2 (66,7%)	2 (66,7%)		1 (33,4%)	1 (33,4%)					1 (33,4%)	
<i>Enterobacter</i> spp.	4 / 11	3 (27,3%)		3 (100%)		2 (66,7%)						2 (66,7%)	
<i>Enterobacter</i> spp.	5 / 13	3 (23,1%)	3 (100%)	1 (33,3%)		2 (66,7%)						3 (100%)	
<i>Enterobacter</i> spp.	6 / 7	1 (14,3%)	1 (100%)			1 (100%)						1 (100%)	
<i>Enterobacter</i> spp.	7 / 6	1 (16,7%)		1 (100%)								1 (100%)	
<i>Enterobacter</i> spp.	8 / 3	1 (33,3%)		1 (100%)		1 (100%)							
<i>Escherichia</i> spp.	1 / 8	6 (75%)		3 (50%)		4 (66,7%)		3 (50%)				1 (16,7%)	
<i>Escherichia</i> spp.	2 / 8	6 (75%)		4 (66,7%)		3 (50%)		3 (50%)				3 (50%)	
<i>Escherichia</i> spp.	4 / 8	2 (25%)		2 (100%)		2 (100%)						1 (50%)	
<i>Escherichia</i> spp.	5 / 11	3 (66,7%)				3 (100%)		3 (100%)				1 (33,3%)	
<i>Escherichia</i> spp.	8 / 7	2 (28,6%)		1 (50%)		1 (50%)		1 (50%)				1 (50%)	

TABELA 10 (continuação). Índice de resistência a antimicrobianos nos gêneros, identificados em cada coleta durante o processo de compostagem, que apresentaram resistência à algum antimicrobiano.

ANTIMICROBIANOS

Gênero	Coleta N° isolados	N° isolados resistent	AMI	AMP	CFL	CLO	GEN	NAL	PEN	POL	RIF	TET	TRI
<i>Escherichia</i> spp.	10 / 11	2 (18,2%)		1 (50%)								1 (50%)	
<i>Klebsiella</i> spp.	1 / 2	2 (100%)		1 (50%)								2 (100%)	
<i>Klebsiella</i> spp.	3 / 6	4 (66,7%)	2 (50%)	2 (50%)								2 (50%)	
<i>Klebsiella</i> spp.	5 / 5	1 (20%)	1 (100%)										
<i>Klebsiella</i> spp.	8 / 4	2 (50%)	1 (50%)	1 (50%)									
<i>Listeria</i> spp.	3 / 4	1 (25%)			1 (100%)				1 (100%)				
<i>Listeria</i> spp.	4 / 4	1 (25%)						1 (100%)	1 (100%)				
<i>Listeria</i> spp.	10 / 9	4 (44,4%)						2 (50%)	3 (75%)				
<i>Micrococcus</i> spp.	6 / 14	1 (7,1%)			1 (100%)				1 (100%)				
<i>Micrococcus</i> spp.	7 / 9	2 (22,2%)							2 (100%)				
<i>Pseudomonas</i> spp.	7 / 8	2 (25%)		1 (50%)		1 (50%)		2 (100%)					
<i>Pseudomonas</i> spp.	8 / 12	5 (41,7%)	1 (20%)	1 (20%)		3 (60%)		3 (60%)				2 (40%)	2 (40%)
<i>Pseudomonas</i> spp.	9 / 6	2 (33,3%)				2 (100%)		1 (50%)				1 (50%)	
<i>Pseudomonas</i> spp.	10 / 14	4 (28,6%)		4 (100%)		1 (25%)						4 (100%)	
<i>Serratia</i> spp.	1 / 1	1 (100%)				1 (100%)						1 (100%)	

TABELA 10 (continuação). Índice de resistência a antimicrobianos nos gêneros, identificados em cada coleta durante o processo de compostagem, que apresentaram resistência à algum antimicrobiano.

ANTIMICROBIANOS

Gênero	Coleta / N° isolados	N° isolados resistent	AMI	AMP	CFL	CLO	GEN	NAL	PEN	POL	RIF	TET	TRI
<i>Serratia</i> spp.	3 / 8	3 (37,5%)		2 (66,7%)								2 (66,7%)	
<i>Serratia</i> spp.	4 / 7	1 (14,3%)										1 (100%)	
<i>Staphylococcus</i> spp.	1 / 1	1 (100%)				1 (100%)						1 (100%)	
<i>Staphylococcus</i> spp.	8 / 2	1 (50%)										1 (100%)	

4.7. Determinação da resistência a metais pesados

Durante a realização deste trabalho, foram realizadas análises da concentração de metais pesados (cádmio, cromo, cobre, chumbo, mercúrio, níquel e zinco) em duas amostras do processo de compostagem, no composto cru e no curado. Os resultados obtido estão representados na tabela 11.

TABELA 11. Concentrações de metais pesados encontrados em amostras de composto durante o processo de compostagem.

Metais	Concentração (mg/Kg)	
	Amostra 1 (composto cru)	Amostra 2 (composto curado)
Cádmio	<1	<1
Cromo	28	71
Cobre	54	71
Chumbo	29	25
Mercúrio	0,18	0,16
Níquel	21	44
Zinco	179	160

Observou-se uma concentração na maioria destes metais, com o decorrer do processo, o que era esperado, pois os metais não são eliminados pelo mesmo, sendo concentrados no seu produto final. A diminuição no valor encontrado de chumbo, mercúrio e níquel, pode ser uma indicação de que alguns dos microrganismos presentes nesta leira de compostagem, possuem a capacidade de realizar biodegradação, transformando estes metais tóxicos em elementos menos tóxicos a eles e ao ambiente. Existem regulamentações, em alguns países, sobre a quantidade de metal presente no composto, para que este possa ser utilizado como fertilizante orgânico. A concentração máxima admitida destes metais no composto encontram-se na tabela 12.

TABELA 12. Requerimento legal para metais pesados em composto curado para ser considerado como fertilizante orgânico, em diferentes países.

Legislação	Metais Pesados (mg/Kg)						
	Cd	Cr	Cu	Pb	Hg	Ni	Zn
Alemanha	1,5	100	100	150	1	5	400
Suíça	3,0	150	150	150	3	50	500
EPA (1)	17	1200	1500	300	17	420	2800
França	20	2000	2000	1600	20	400	6000
Áustria	1 a 4	50 a 300	0 a 1000	200 a 900	1 a 4	30 a 200	300 a 1500
CCE (2)	16 a 25	(*)	1000 a 1750	1000 a 1750	16 a 25	300 a 400	2500 a 4000
Holanda	<0,7	<50	<25	<65	<0,2	<10	<75

(1) United States Environmental Protection Agency; (2) Council of the European Communities

Na comparação dos resultados obtidos da análise do composto, com cada uma das legislações utilizadas no desenvolvimento do trabalho, constata-se que o composto orgânico de resíduos sólidos urbanos da Usina de Compostagem está em conformidade, com 100% dos níveis de tolerância da Alemanha, Suíça, EPA, França, Áustria, CCE. Com relação a Holanda, verifica-se que o nível de cádmio, cromo, cobre, níquel e zinco no composto curado está acima do índice de tolerância, tornando-o assim, inaceitável para utilização como fertilizante orgânico.

A determinação da resistência a metais pesados foi realizada para os 17 gêneros encontrados durante a realização deste trabalho, analisando-se suas tolerâncias a cádmio, cobalto, cromo, cobre, mercúrio e zinco. Todos os gêneros estudados apresentaram tolerância a todos os metais. O perfil de tolerância apresentado por estes gêneros está demonstrado na tabela 13.

TABELA 13. Perfil de tolerância a metal pesado apresentado pelos gêneros isolados de uma leira de compostagem de resíduo sólido urbano.

Gênero	Tolerância
<i>Aeromonas</i> spp.	Cr>Cu>Zn=Cd>Co>Hg
<i>Bacillus</i> spp.	Cr>Cu=Zn>Cd>Co>Hg
<i>Burkholderia</i> spp.	Cr>Cu>Cd=Zn>Co>Hg
<i>Citrobacter</i> spp.	Zn>Cr>Cu>Cd>Co>Hg
<i>Corynebacterium</i> spp.	Zn>Cu>Cr>Cd>Co>Hg
<i>Enterobacter</i> spp.	Cr>Zn>Cu>Cd>Co>Hg
<i>Escherichia</i> spp.	Cr>Cu>Cd>Zn>Co>Hg
<i>Flavimonas</i> spp.	Cr>Cu=Zn>Cd>Co>Hg
<i>Klebsiella</i> spp.	Cr>Cu>Zn>Cd=Co>Hg
<i>Listeria</i> spp.	Cr>Cu>Zn>Cd>Co>Hg
<i>Micrococcus</i> spp.	Cr>Cu>Zn>Cd>Co>Hg
<i>Pasteurella</i> spp.	Zn>Cr>Cu>Cd>Co>Hg
<i>Providencia</i> spp.	Cr>Cu>Zn>Cd>Co>Hg
<i>Pseudomonas</i> spp.	Cu>Cr>Zn>Cd>Co>Hg
<i>Serratia</i> spp.	Cu>Cr=Zn=Cd>Co>Hg
<i>Staphylococcus</i> spp.	Cu>Cr>Cd=Co=Zn>Hg
<i>Xantomonas</i> spp.	Cr>Zn=Cu>Cd>Co>Hg

Os perfis de resistência a metal pesado mostraram-se diferenciados na maioria dos gêneros, com exceção dos gêneros *Listeria*, *Micrococcus* e *Providencia*, que apresentaram o mesmo perfil. Para todos os gêneros,

mercúrio apresentou maior toxicidade e para a maioria, cromo apresentou a menor.

Neste trabalho, o cromo foi um dos metais que apresentou menor toxicidade aos isolados estudados, necessitando de concentrações elevadas da solução salina para se obter a inibição de 90% do crescimento do organismo. A tolerância ao cromo, foi maior a 1,0 mM na maioria dos gêneros. Os mais tolerantes foram *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Aeromonas* e *Flavimonas*, com MIC 90% de 2,9 mM, 2 mM e 1,9 mM respectivamente. A menor tolerância foi demonstrada por *Corynebacterium* e *Staphylococcus*, com 0,9 mM. Hassen et al. (1998), em estudo realizado com bactérias de origem ambiental como águas, efluentes líquidos, chorume, sedimentos, solo e composto de resíduo sólido urbano, observaram que a maioria das espécies estudadas necessitaram mais de 1,2 mM de sulfato de cobre III para inibir completamente seu crescimento. *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella terrigena*, isoladas de composto de resíduos sólidos urbanos, não apresentaram crescimento em concentrações de 1,2mM e 1,8 mM de sulfato de cobre III, respectivamente.

No que se refere a resistência ao metal cobre, a maioria dos gêneros estudados toleram mais do que 0,9 mM da solução salina. Os gêneros mais tolerantes foram *Pseudomonas* com MIC 90% de 3,2 mM, seguido por *Escherichia* e *Klebsiella*, com 1,7 mM cada, e *Aeromonas*, 1,2mM. Os menos tolerantes foram *Corynebacterium*, *Pasteurella* e *Xantomonas*, com 0,9 mM (Tabela 14). No estudo de Hassen et al. (1998), a maioria das espécies toleraram mais de 0,8 mM de sulfato de cobre, sendo os mais tolerantes,

isoladas de composto de resíduo sólido, *Pseudomonas aeruginosa* e *Providencia stuartii* com 1,8 mM e 1,2 mM, respectivamente. Em isolados de esgoto, Filiali et al. (2000), a concentração mínima inibitória para inibir o crescimento dos organismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella terrigena* e *Staphylococcus* spp foi de 6 mM de sulfato de cobre.

Os gêneros que apresentam maior resistência a solução salina de zinco são *Pseudomonas*, com 2,8 mM, *Citrobacter*, 2,3 mM, e *Corynebacterium*, com 1,5 mM, sendo que a maioria dos gêneros toleraram mais de 1,0mM. Os que apresentaram menor resistência foram *Staphylococcus*, e *Klebsiella*, com 0,7 mM e 0,8 mM, respectivamente (Tabela 14). *Pseudomonas aeruginosa*, isolada de composto de resíduos sólido urbano, apresentou tolerância a 1,5 mM de sulfato de zinco (Hassen et al.,1998). Já em isolados de esgoto, a concentração mínima inibitória encontrada foi de 2 mM para *K. terrigena*, sendo que a mesma não foi determinada para os demais isolados (Filiali et al., 2000),.

A tolerância a cádmio, para a grande maioria dos gêneros, foi maior que 0,7 mM. Os mais tolerantes foram *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, com 2,3 mM, 1,2mM e 1,1 mM respectivamente. Já os menos tolerantes foram *Providencia* e *Klebsiella*, com 0,5mM cada e *Pasteurella*, com 0,7 mM (Tabela 14). Isolados ambientais apresentam variações a tolerância a cádmio de 0,1 mM a 1,5 mM. *P.aeruginosa* e *Providencia stuartii*, isoladas de composto, resistentes a cádmio, toleram concentrações próximas a 1,5 mM e 0,2 mM de sulfato de cádmio (Hassen et al., 1998). Já em isolados de esgoto, Filiali et al. (2000) observaram a concentração mínima inibitória de 2 mM para

Pseudomonas aeruginosa e *Staphylococcus* spp, e de 4 mM para *Klebsiella terrigena*.

A tolerância a cobalto foi superior a concentração de 0,5 mM na maioria dos gêneros. Os mais tolerantes foram *Pseudomonas* 1,3mM, *Aeromonas* 0,8 mM, *Citrobacter* e *Providencia* com 0,3 mM cada. *Bacillus* e *Listeria* com 0,4 mM cada, foram os gêneros com menor tolerância a este metal (Tabela 14). Nos isolados ambientais, a tolerância foi menor a 0,8 mM de sulfato de cobalto, e em *P. aeruginosa* e *K. terrigena*, de composto, 0,6 mM. (Hassen et al., 1998). Já em isolados de esgoto, a concentração mínima inibitória observada foi de 3,2 mM para *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella terrigena* e de 1,6 mM para *Staphylococcus* spp (Filiali et al., 2000).

O mercúrio foi o metal que apresentou maior toxicidade aos gêneros estudados, inibindo o crescimento de 90% dos isolados em baixas concentrações da solução salina. Este metal foi melhor tolerado por *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, com concentrações 0,1mM , 0,08 mM, 0,07 mM e 0,07 mM respectivamente, e menos tolerado por *Corynebacterium*, *Providencia* e *Staphylococcus*, com 0,03 mM (Tabela 14). No trabalho de Hassen et al. (1998), a taxa de tolerância à mercúrio variou de 0,005 mM a 1,0 mM. *P. aeruginosa* e *P. stuartii* , isoladas de composto, apresentaram tolerância de 0,05 mM. Em isolados de esgoto, Filiali et al. (2000), a concentração mínima inibitória foi de 1,2 mM para *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella terrigena* e *Staphylococcus* spp.

TABELA 14. Concentrações inibitórias mínimas (MIC) de sais de metais pesados capazes de inibir o crescimento (50% e 90%) dos organismos isolados de uma leira de compostagem de resíduo sólido urbano.

Gêneros	Metais (MIC 50%/MIC 90%)					
	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Zn
<i>Aeromonas spp</i>	0,6 / 1,0	0,3 / 0,8	1,5 / 1,9	1,2 / 1,6	0,02 / 0,06	0,6 / 1,0
<i>Bacillus spp</i>	0,3 / 0,9	0,1 / 0,4	1,1 / 1,4	0,8 / 1,2	0,03 / 0,06	0,7 / 1,2
<i>Burkholderia spp</i>	0,5 / 1,2	0,2 / 0,6	1,2 / 1,6	1,0 / 1,3	0,01 / 0,04	0,8 / 1,2
<i>Citrobacter spp</i>	0,2 / 0,8	0,1 / 0,3	0,8 / 1,2	0,7 / 1,3	0,03 / 0,05	1,6 / 2,3
<i>Corynebacterium spp</i>	0,3 / 0,7	0,2 / 0,5	0,5 / 0,8	0,4 / 0,9	0,01 / 0,03	0,9 / 1,5
<i>Enterobacter spp</i>	0,4 / 1,2	0,3 / 0,6	0,9 / 1,5	0,8 / 1,3	0,04 / 0,07	0,8 / 1,4
<i>Escherichia spp</i>	0,5 / 1,1	0,3 / 0,7	1,9 / 2,4	1,2 / 1,7	0,02 / 0,06	0,5 / 0,9
<i>Flavimonas spp</i>	0,6 / 1,0	0,2 / 0,6	1,4 / 1,9	0,7 / 1,2	0,02 / 0,05	0,6 / 1,2
<i>Klebsiella spp</i>	0,2 / 0,5	0,2 / 0,5	1,6 / 2,3	1,2 / 1,7	0,03 / 0,07	0,5 / 0,8
<i>Listeria spp</i>	0,3 / 0,7	0,1 / 0,4	1,3 / 1,8	0,6 / 1,3	0,03 / 0,06	0,4 / 1,0
<i>Micrococcus spp</i>	0,4 / 0,8	0,2 / 0,5	1,2 / 1,9	0,9 / 1,4	0,04 / 0,08	0,4 / 0,9
<i>Pasteurella spp</i>	0,3 / 0,7	0,3 / 0,6	0,9 / 1,3	0,5 / 0,9	0,02 / 0,05	1,0 / 1,5
<i>Providencia spp</i>	0,2 / 0,5	0,1 / 0,3	1,4 / 2,0	0,8 / 1,3	0,01 / 0,03	0,8 / 1,2
<i>Pseudomonas spp</i>	1,4 / 2,3	0,6 / 1,3	2,5 / 2,9	2,6 / 3,2	0,06 / 0,1	2,0 / 2,8
<i>Serratia spp</i>	0,7 / 1,1	0,3 / 0,5	0,7 / 1,1	0,5 / 1,3	0,02 / 0,05	0,7 / 1,1
<i>Staphylococcus spp</i>	0,4 / 0,7	0,3 / 0,7	0,4 / 0,8	0,5 / 1,1	0,01 / 0,03	0,3 / 0,7
<i>Xanthomonas spp</i>	0,3 / 0,8	0,2 / 0,5	0,7 / 1,1	0,4 / 0,9	0,03 / 0,06	0,4 / 0,9

Microrganismos resistentes a antimicrobianos e tolerantes a metais aparecem como resultado da exposição a ambientes contaminados com metais, que causa uma seleção de fatores de resistência para antimicrobianos e metais pesados (Bhattacharjee, 1988). A resistência a antimicrobianos em bactérias está frequentemente associada e fortemente correlacionada com a tolerância a metais, assim sendo um fenômeno natural para sobrevivência (Duxbury & Bicknell, 1983). Os genes que codificam o mecanismo de defesa a antimicrobianos e tolerância a metais podem estar localizados no cromossomo ou no plasmídio, e são transmitidos através de transferência genética vertical e horizontal. Em muitos organismos, os genes que controlam a resistência a metais são carregados pelo plasmídio, o qual fornece a bactéria uma vantagem competitiva sobre os outros organismos, quando o metal está presente (Trevor, 1985). A transferência horizontal de genes codificados por plasmídio é a razão principal para a disseminação de genes de resistência no ambiente. A transferência de plasmídio entre bactérias ocorre em uma variedade de habitats naturais, como água, esgoto, sedimentos, solo. Esta transferência pode ocorrer entre organismos taxonomicamente próximos ou não (Chandrasekaran, 1998).

Neste trabalho, foi realizada a extração plasmidial de gêneros que apresentaram resistência simultânea aos antimicrobianos e metais pesados, para detecção da presença ou não de plasmídios e análise de seu perfil.

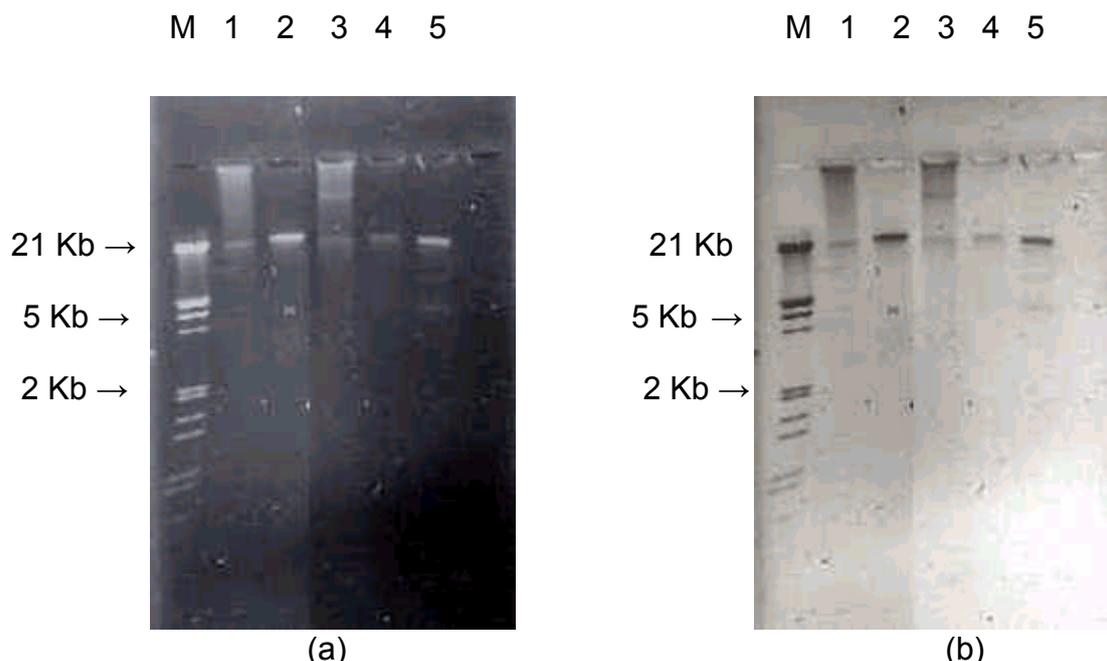


FIGURA 14. (a) Eletroforese em gel de agarose 0,5% corado com brometo de etídio, com o resultado da extração plasmidial de gêneros isolados do composto de resíduo sólido orgânico. Canaleta (M) marcador de peso molecular Lambda DNA/Eco RI + Hind III, (1) isolado de *Micrococcus* spp., (2) isolado de *Citrobacter* spp., (3) isolado *Aeromonas* spp., (4) isolado de *Staphylococcus* spp., (5) isolado de *Escherichia* spp. (b) negativo da figura 14 a

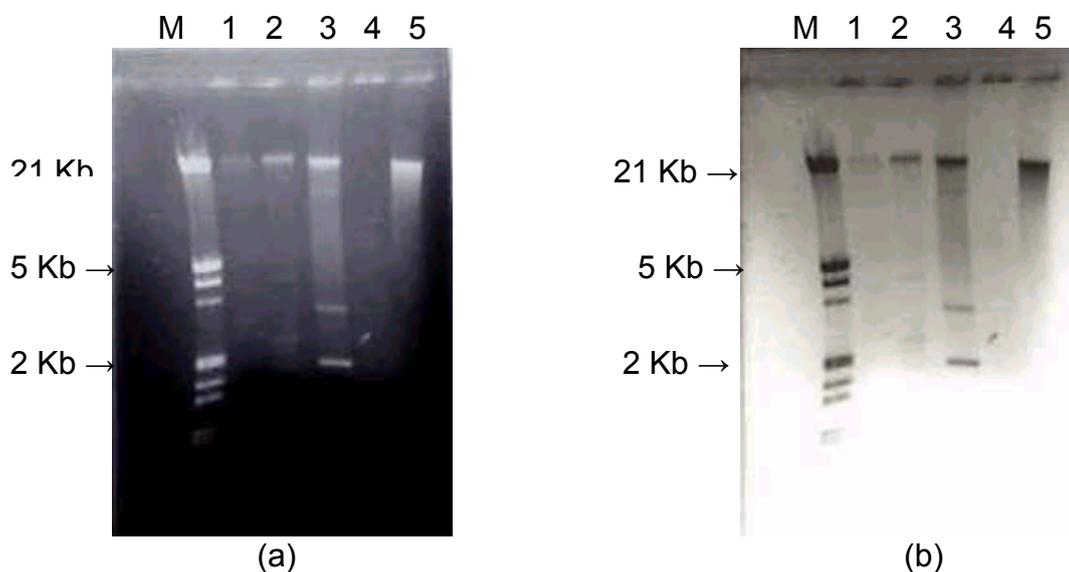


FIGURA 15. (a) Eletroforese em gel de agarose 0,5% corado com brometo de etídio, com o resultado da extração plasmidial de gêneros isolados do composto de resíduo sólido orgânico. Canaleta (M) marcador de peso molecular Lambda DNA/Eco RI + Hind III, (1) isolado de *Klebsiella* spp., (2) isolado de *Enterobacter* spp., (3) isolado *Pseudomonas* spp., (5) isolado de *Listeria* spp. (b) negativo da figura 15 a

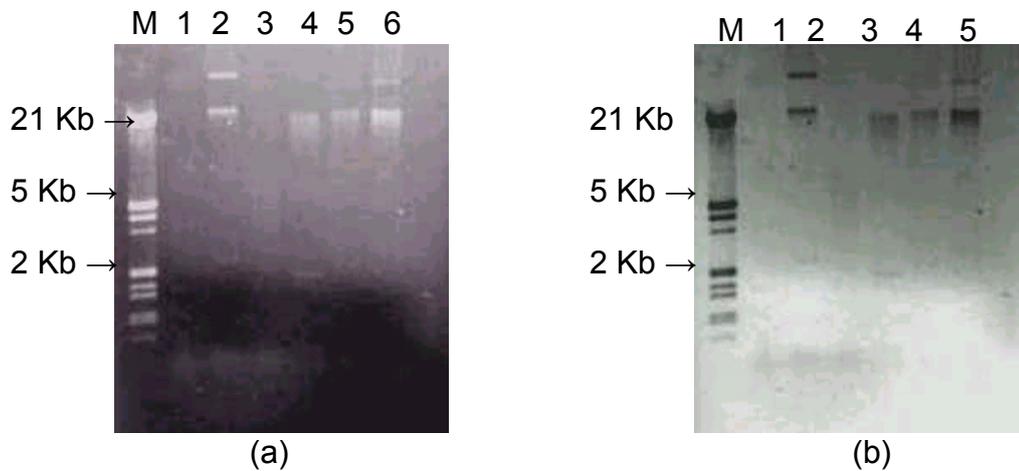


FIGURA 16. (a) Eletroforese em gel de agarose 0,5% corado com brometo de etídio, com o resultado da extração plasmidial de gêneros isolados do composto de resíduo sólido orgânico. Canaleta (M) marcador de peso molecular Lambda DNA/Eco RI + Hind III, (2) isolado de *Bacillus* spp., (4) isolado de *Enterobacter* spp., (5) isolado de *Corynebacterium* spp., (6) isolado de *Serratia* spp. (b) negativo da figura 16 a

Analisando-se a figura 14, observa-se que os gêneros *Micrococcus*, *Citrobacter* e *Staphylococcus* apresentaram um único plasmídio, com aproximadamente 21 kb. Já o gênero *Aeromonas*, apresentou duas bandas representando dois plasmídios, um com peso superior a 21 kb e a outra com aproximadamente 21 kb. O gênero *Escherichia* apresentou três plasmídios, com aproximadamente 21 kb, 4 kb e outro entre 2 e 3 kb.

Na figura 15, verifica-se a presença de um plasmídio, com aproximadamente 21 kb, nos gêneros *Klebsiella* e *Listeria*. O gênero *Enterobacter* apresentou três bandas (plasmídios), de aproximadamente 21 kb, 4 kb e 2 Kb. Já no gênero *Pseudomonas* observou-se quatro plasmídios, um com aproximadamente 21 kb, um com peso molecular entre 21 e 5 Kb, outro entre 5 e 3 Kb e o último com 2 Kb.

A figura 16, mostra o gênero *Corynebacterium* com uma banda representando um plasmídio de aproximadamente 21 Kb, e os gêneros *Bacillus* e *Serratia* com dois plasmídios, um com peso molecular superior a 21 kb e outro com aproximadamente 21 kb.

A presença de plasmídios em todos os gêneros que apresentaram resistência simultânea a antimicrobianos e metais pesados, provavelmente nos fornece o indício de que esta resistência se encontra nos mesmos. Segundo Lawlor et al.(1999), os mecanismos de resistência podem ser cromossomais, ou mais freqüentemente, plasmidiais de diferentes tamanhos, e transportam genes de resistência aos metais. Neste trabalho, todos gêneros testados apresentaram pelo menos um plasmídio, entretanto, para inferirmos que os genes de resistência estão nos mesmos, devemos realizar a técnica de curagem para verificarmos a presença ou não destes genes no plasmídio. Através desta técnica, observa-se se os isolados mantêm a característica de resistência após a perda dos plasmídios ou não, podendo-se então inferir esta capacidade de resistência aos genes que estão no plasmídio ou no cromossomo do isolado estudado.

5. CONCLUSÕES

1. A comunidade bacteriana apresentou-se diversificada e não sofreu grandes variações qualitativas ao longo do processo.

2. A população predominante durante o processo foi constituída pelos gêneros: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Bacillus* e *Pseudomonas*.

3. A avaliação dos índices de coliformes totais e fecais apresentou um declínio devido ao processo de compostagem.

4. Os gêneros predominantemente resistentes a antimicrobianos, durante o processo de compostagem, foram *Enterobacter*, *Bacillus*, *Escherichia* e *Aeromonas*.

5. O metal pesado que apresentou menor toxicidade aos gêneros estudados foi o cromo e o de maior toxicidade, o mercúrio. O gênero *Pseudomonas* foi o que apresentou maior tolerância, e os gêneros *Staphylococcus* e *Corynebacterium*, a menor.

6. Plasmídios foram encontrados em isolados de gêneros que apresentaram resistência simultânea a metal pesado e antimicrobianos.

6. PERSPECTIVAS

1. Realizar o teste de curagem, para determinar se a resistência a antimicrobianos e metal pesado, dos isolados resistentes, está codificada por genes cromossomais ou plasmidiais.

2. Realizar o teste de biodegradação, para verificar a capacidade, destes organismos resistentes a metais pesados, de degradar estes compostos, o que pode ser sugerido pela diminuição da concentração de certos metais pesados durante o processo de compostagem.

3. Testar mais isolados para resistência aos metais pesados, aumentando assim a possibilidade de encontrar isolados biodegradadores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, D.A.; AUSTIN, B.; COLWELL, R.R. Antibiotic resistance patterns of metal tolerant bacteria isolated from an estuary. **Antimicrobial Chemistry Agents**, Amsterdam, v.12, p. 545-47, 1977.
- ALONSO,A.; SÁNCHEZ,P.; MARTÍNEZ, J.L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 3, n.1, p. 1-9, 2001.
- ATLAS, R.M.; BARTHA,R. **Microbial Ecology**: fundamentals and applications. 4 th ed. Menlo Park California: Benjamin/Cummings, 1998. 694p.
- BALL, A.S; BETTS, W.B.; McCARTHY, A.J. Degradation of lignin-related compounds by actinomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.6, p. 1642-44, 1989.
- BARI, Q.H.; KOENIG, A. Effect of air recirculation and reuse on composting of organic solid waste. **Resources Conservation and Recycling**, Amsterdam, v.33, p. 93-111, 2001.
- BEFFA, T. Et al. Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80°C). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.5, p. 1723-27, 1996.
- BHATTACHERJEE, J.W. et al. Antibiotic resistance and metal tolerance of coliform bacteria isolated from Gomati river water at Lucknow city. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tóquio, v. 34, p.391-99, 1988.
- BLANC, M. et al. Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16s rDNA) methods. **Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 141-9, 1999.
- BERTOLDI, M. Composting food processing waste in the European economic community. **Compost Science and Utilization**, Emmaus, v. 3, n.2, p.87-92, 1995.
- BOGGS, L.C.; KENNEDY, A. C.; REGANOLD, J.P. Use of phospholipid fatty acids and carbon source utilization patterns to track microbial community succession in developing composting. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.10, p. 4062-64, 1998.
- BUTAYE,P. Et al. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.22, p. 205-10, 2003.
- BRUINS, M. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v.45, p. 198-07, 2000.

CALOMIRIS, J.J. et al. Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, p.1238-42, 1984.

CAMPBELL, S. **Manual de compostagem para hortas e jardins**: como aproveitar bem o lixo orgânico doméstico. São Paulo: Nobel, 1995. 149p.

CHANDRASEKARAN, S. et al. Transfer and expression of a multiple antibiotic resistance plasmid in marine bacteria. **Current Microbiology**, Secaucus, v.37, p.347-51, 1998.

CUNHA, C.D.; LEITE, S.G.F. Optimization of some environmental conditions to enhance gasoline biodegradation in soil microcosms bioaugmented with *Pseudomonas putida*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, n.2, p.129-34, 1997.

D'ALMEIDA, M.L.O; VILHENA, A. (Coords.) **Lixo municipal**: manual de gerenciamento integrado. 2 ed. São Paulo: IPT/CEMPRE,2000. 370p.

DEES, P.M.; GHIORSE, W.C. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolated and extracted DNA. **Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, p. 207-16, 2001.

DE LOS SANTOS, P.E; CRISTALE, R. B.; MELHADO, J.C. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.6, p.2790-98, 2001.

DE VINCENT, A. et al. Resistance to antibiotics and heavy metals of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from natural water. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v.68, p.625-32, 1990.

DÉPORTES,I. et al. Hazard to man and the environment posed by the use of urban waste compost: a review. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.172, p. 197-22, 1995.

DÉPORTES,I. et al. Microbial disinfection capacity of municipal solid waste (msw) composting. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v.85, p. 238-46, 1998.

DEUS, A.B.S. **Viabilidade do uso da compostagem aeróbia para tratamento de lixo em grandes centros urbanos**. 1998. Porto Alegre; IPH/UFRGS, 1998. 125f. Monografia (para exame de qualificação), Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento, Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

DUXBURY, T.; BICKNELL, B. Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. **Soil Biological Biochemistry**, Amsterdam, v. 15, p. 243-50, 1983.

FILIALI, B.K. et al. Wate water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. **Current Microbiology**, Secaucus, v. 41, p.151-56, 2000.

FOSTER, T.J. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. **Microbiological and Molecular Biology Reviews**, Birmingham, v.47, p. 361-09, 1983.

GARCÍA, C. et al. Effect of composting on sewage sludges contaminated with heavy metals. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 53, p. 13-19, 1995.

GUERRINI, I.A.; BULL, L.T. **Matéria Orgânica do Solo**: problemas e soluções. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas, 1992. 203p.

GOMEZ, A. The evaluation of compost quality. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v.17, n.5, p. 310-14, 1998.

GUZZO, A.; DU BOW, M.; BAWDA, P. Identification and characterization of genetically programmed responses to toxic metal exposure in *Escherichia coli*. Metals and microorganisms: relationships and applications. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.14, p.369-74, 1994.

HARTILIEB, N.; MARSCHNER, B.; KLEIN, W. Transformation of Dissolved Organic Matter (DOM) and ¹⁴C-labelled organic contaminants during composting of municipal biowaste. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, n. 278, p.1-10, 2001.

HASSEN, A. et al. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 80, p. 217-25, 2001.

HASSEN, A. et al. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 64, p. 7-15, 1998.

HELLMANN, B. Et al. Emission of climate relevant trace gases and succession of microbial communities during open windrow composting. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.3, p. 1011-18, 1997.

HERMANSSON, M.; JONES, G.W.; KJELLEBERG, S. Frequency of antibiotic and heavy metal resistance, pigmentation and plasmids in bacteria of the marine air-water interface. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, p.2338-42, 1987.

HIRSCH, R. et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.225, p. 109-18, 1999.

HUSSEIN,H. et al. Tolerance and uptake of heavy metals by Pseudomonads. **Process Biochemistry**, Oxford, v.40, p.955-61, 2005.

JAHNEL, M.C.; MELLONI, R.; CARDOSO, E.J.B. Maturidade de composto de lixo urbano. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, n.2, 1999. Não paginada.

Jl, G.; SILVER, S. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.14, p. 61-75, 1995.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes Orgânicos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1985. 429p.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. [S.l.] : Willians& Willians, 1984.

LACEY, J. Actinomycetes in composts. In: Waste collection and recycling – bioaerosol exposure and health problems, 1996, Koge. **Actinomycetes in composts**. Koge, 1997. 113-121.

LIANG, C. et al. The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 86 p. 131-37, 2003.

LIMA, L.M.Q. **Tratamento de lixo**. 2 ed. São Paulo: Hemus, 1991. 242p.

MADEJÓN, e.et al. New approaches to establish optimum moisture content or compostable materials. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 85, p. 73-8, 2002.

MESSI, p. et al. Antibiotic resistance and antibacterial activity in heterotrophic bacteria of mineral water origin. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, 2004. Article in press.

MIRANDA, C.D; CASTILLO, G. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. **The Science of the Total Environmental**, Amsterdam, v. 224, p. 167-76, 1998.

MUDRYK,Z.J. Occurrence and distribution antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from a marine beach. **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v.50, p.80-86, 2005.

NCCLS National Committee or Clinical Laboratory standards. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 3rd ed. Villanova, PA, 1984. Approved Standard. NCCLS Document M2-A3.

NDEGWA, P.M.; THOMPSON, S.A. Integrating composting and vermicomposting in the treatment and bioconversion of biosolids. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.76, p.107-12, 2001.

NIES, D. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. **Plasmid**, Orlando, v. 27, p. 17-8,1992.

PATHAK, S.P. et al. Seasonal variation in survival and antibiotic resistance among various bacterial populations in a tropical river. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tóquio, v. 39, p.47-6, 1993.

PATHAK, S.P.; GOPAL, K. Ocorrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. **Environmental Research**, Orlando, 2004. Article in press.

PEREIRA NETO, J.T. **Tratamento e destinação de resíduos provenientes de empreendimentos agrícolas**.Viçosa: ABEAS,1996.77p.

PETERS, S. et al. Sucession of microbial communities during hot composting as detected by PCR – single strand conformation polymorphism based genetic profiles of small – subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.3, p.930-36, 2000.

PICARD, C. et al. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.9, p.2717-22, 1992.

REDLINGER, T. et al. Survival of fecal coliforms in dry-composting toilets. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.9, p.4036-40, 1992.

REINHAT, P.R.; TRAINOR, S.D.; Windrow composting of municipal biosolids and yard waste. **Compost Science and Utilization**, Emmaus, v.3, n.2, p.38-6, 1995.

REINTHALER,F.F. et al. Antibiotic resistance of E.coli in sewage and sludge. **Water Research**, Oxford, v. 37, p. 1685-90, 2003.

ROUCH, D.A; LEE, B.T.D.; MORBY, A.P. Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 14, p. 132-41, 1995.

SABRY, S.A. et al. Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v.82, p. 245-52, 1997.

SAMBROOK,J.; RITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**. 2nd. [S.I.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHWARTZ, T. et al. Detection of antibiotic resistance bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.43, p.325-35, 2003.

SHARMA, V.K. et al. Processing of urban and agro-industrial residues by aerobic composting: review. **Energy Conversion**, Oxford, v.38, n.5, p.453-78, 1997.

SIDHU, J. et al. The role of indigenous microorganisms in suppression of Salmonella regrowth in composted biosolids. **Water Research**, Oxford, v.35, n.4, p.913-20, 2001.

STEGER, K. et al. Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.55, p. 371-82, 2003.

SILVER, S. Plasmid-determined metal resistance mechanisms: range and overview. **Plasmid**, Orlando, v.27, p.1-3, 1992.

SILVER, S.; MISRA, T.K. Bacterial transformation of and resistances to heavy metal. **Basic Life Science**, New York, v. 28, p.23-46, 1984.

SILVER, S. & PUNG, L. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 50, p.753-89, 1996.

TAIWO, L.B.; OSO, B.A. Influence of composting techniques on microbial succession, temperature and pH in a composting municipal solid waste. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 3, n.4, p.239-43, 2004.

TANG, J-C. et al. Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure as detected by the quinone profile method. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v 39, p.1999-06, 2004.

TIQUIA, S.M.; TAM, N.F.Y.; HODGKISS, I.J. Salmonella elimination during composting of spent pig. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v 63, p.193-96, 1998.

TIQUIA, S.M.; TAM, N.F.Y. Composting of spent pig litter and sludge with forced-aeration. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v 72, p. 1-7, 2000.

TREVORS, J.T.; ODDIE, K.M.; BELLIVEAU, B.H. Metal resistance in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 32, p. 39-54, 1985.

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v 72, p. 169-83, 2000.

TRUFFAUT, N. et al. Outils moléculaires d'évaluation des capacités dégradatives de microflore de l'environnement. **Bulletin de la Société Française de Microbiologie**, Paris, v.16, p. 190-96, 2001.

VEEKEN, A.; HAMELERS, B. Sources of Cd, Cu, Pb and Zn in biowaste. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.300, p. 87-98, 2002.

VOGEL, T.; BALLERINI, D. Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés. **Bulletin de la Société Française de Microbiologie**, Paris, v.16,n.3, p.204-09, 2001.

WAKATSUKI, T. Metal oxido-reduction by microbial cells. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.14, p. 169-77, 1995.

WEI, Y-S. et al. Composting at compost application in China. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 30, p. 277-300, 2000.

WEPPEN, P. Process calorimetry on composting of municipal organic wastes. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v.21, p.289-99, 2001.

WILLIAMS, J.W.; SILVER, S. Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. **Enzyme and Microbiological Technology**, New York, v.6, p. 530-37, 1984.

8. APÊNDICES

8.1. Introdução

A preparação dos meios de cultura foi realizada segundo as especificações dos fabricantes ou seguindo as instruções da bibliografia especializada.

8.2. Meios de cultura para crescimento e isolamento.

8.2.1. Agar Base Cetrimida (USP) – BIOBRÁS	g/L
Peptona de gelatina	20,0
Sulfato de potássio	10,0
Cloreto de magnésio	1,4
Cetrimida	0,3
Ágar	13,6
pH=7,2 +/- 0,2 a 25°C	

8.2.2. Agar Base XLT4 DIFCO	g/L
Peptona	1,6
Extrato de levedura	3,0
L-lisina	5,0
Xilose	3,75
Lactose	7,5
Sacarose	7,5
Citrato de amônio férrico	0,8
Tiosulfato de sódio	6,8
Cloreto de sódio	5,0
Agar	18,0
Vermelho de fenol	0,08
pH=7,4 +/- 0,2 a 25°C	

8.2.3. Agar BHI (agar infusão de cérebro e coração – MERCK)	g/L
Extrato de cérebro, extrato de coração e peptona	27,5
D (+) – glicose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Hidrogeno fosfato di-sódico	2,0
Agar-ágar	15,0
pH=7,4 +/- 0,2 a 25°C	

8.2.4. Ágar EMB (agar eosina azul- de metileno lactose –sacarose-MERCK)	g/L
Peptona	10,0
Hidrogenofosfato di-potassico	2,0
Lactose	5,0
Sacarose	5,0
Eosina	0,4
Azul de metileno	0,07
Agar	13,5
pH=7,1 +/- 0,2 a 25°C	
8.2.5. Agar PCA (Plate Count Agar)	g/L
Peptona	5,0
Extrato de levedura	2,5
Dextrose	1,0
Ágar	15,0
pH=7,1 +/- 0,2 a 25°C	
8.2.6. Agar seletivo para Pseudomonas – BIOBRÁS	g/L
Peptona de gelatina	16,0
Hidrolisado ácido de caseína	10,0
Sulfato de potássio	10,0
Cloreto de magnésio	1,4
Agar	11,0
pH=7,1 +/- 0,2 a 25°C	
8.2.7. Caldo Base Tetrionato (DIFCO)	g/L
Peptona	5,0
Sal bacto-bile	1,0
Tiosulfato de sódio	30,0
Carbonato de cálcio	10,0
pH=8,4 +/- 0,2 a 25°C	
Adicionar 2 mLde solução Iodo-iodeto	
8.2.8. Caldo BHI (infusão de cérebro e coração) – (BIOBRÁS)	g/L
Cloreto de sódio	5,0
Dextrose	2,0
Fosfato bibásico de sódio	2,5
Infusão de cérebro e coração	17,5
Peptona de carne	5,0
Peptona de caseína	5,0
pH=7,4 +/- 0,2 a 25°C	

8.3. soluções utilizadas na extração plasmidial

8.3.1. solução de NaCl 1M

NaCl	5,844
g	
Água destilada	100
mL	

8.3.2. Solução I

Glicose	0,05
M	
Tris HCl (pH=8,0)	0,025
M	
EDTA (pH=8,0)	0,01
M	

8.3.3. Solução II

NaOH	0,2 M
SDS	1%

8.3.4. Solução III

Acetato de potássio	6,0 mL
Ácido Acético	1,15
mL	
Água destilada	2,85
mL	

8.3.5. Fenol / Clorofórmio

Fenol tamponado	1V
Clorofórmio (Nuclear)	1V

8.3.6. Clorofórmio / Álcool isoamílico

Clorofórmio (NUCLEAR)	24V
Álcool isoamílico (SYNTH)	1V

8.3.7. Acetato de sódio 3M

Acetato de sódio	96,02 g
Água destilada até completar 200 mL	

8.3.8. TE

Tris HCl (pH=8,0)	0,01 M
EDTA (pH=8,0)	0,001 M

8.4. Soluções utilizadas para corrida em gel de agarose

8.4.1. TAE 50X

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0,5 M (pH=8,0)	100 mL
Água destilada até completar 1000 mL	

8.4.2. TAE 1X

TAE 50X	20 mL
Água destilada até completar 1000 mL	

8.4.3. Gel de agarose

Agarose	0,5 g
TAE 1X	100 mL

8.4.4. Tampão de corrida

Azul de bromofenol	125 µL
Sacarose	200 µL
Água Milli-Q estéril	175 µL