



Caracterização da microbiota mesófila aeróbia isolada de um sistema de lagoas de estabilização para o tratamento de dejetos de suínos*

Characterization of the aerobic mesophilic bacterial flora isolated from a stabilization ponds system processing pig slurry

Verônica Schmidt^{1,3}, Katiane Santin² & Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso^{1,3}

RESUMO

O comportamento de populações microbianas mesófilas, presentes em dejetos suínos submetidos a tratamento em lagoas de estabilização, ainda é pouco conhecido. O objetivo deste estudo foi avaliar a variação quantitativa e qualitativa da microbiota mesófila aeróbia presente ao longo de um sistema de lagoas de estabilização para tratamento de dejetos suínos. A população média de mesófilos aeróbios manteve-se constante ao longo das lagoas, apesar de ter havido uma variação nas contagens entre as diferentes coletas realizadas. A diversidade média da microbiota do efluente foi menor que a encontrada no afluente do sistema, não havendo diferença na equitabilidade entre os pontos amostrados. No início do sistema houve um predomínio de bactérias com características compatíveis com as enterobactérias, enquanto no efluente predominaram grupos semelhantes aos enterococos.

Descritores: diversidade bacteriana, lagoas de estabilização, dejetos suínos.

ABSTRACT

The mesophilic bacteria species pattern, found in pig slurry submitted to treatment in stabilization ponds, is still poorly understood. The aim of this study was to evaluate the quantitative and qualitative variation of the aerobic mesophilic flora isolated throughout a stabilization ponds system, that receives pig slurry. The mesophilic population counts didn't show any variation among the sampled ponds but different counts have been found among the sampling periods. The bacterial flora of the effluent showed a lower diversity than that found in the affluent. There was no difference in the equitability among the sampled points of the system. Most of the affluent isolates showed morphological and biochemical characteristics similar to the Enterobacteriaceae family, while in the effluent predominated bacteria similar to the enterococci group.

Key words: bacterial diversity, stabilization ponds, pig slurry.

INTRODUÇÃO

Considera-se que, mundialmente, vertem-se diariamente mais de 800 milhões de metros cúbicos de águas residuais e resíduos orgânicos e inorgânicos aos corpos d'água. Isto ocasiona a deterioração de rios e oceanos e limita o uso que pode ser dado a estes recursos [6].

Juntamente com a matéria orgânica, os dejetos agregam aos recursos hídricos grande número de microorganismos autóctones, principalmente do grupo dos heterotróficos [1], tais como bactérias heterotróficas mesófilas, as quais são capazes de causar doenças no homem e nos animais [20, 21].

Por outro lado, os microorganismos têm um papel decisivo nos processos de autodepuração e decomposição da matéria orgânica, sendo agentes do tratamento biológico de dejetos nas lagoas de estabilização [21], que por sua vez, apresentam uma microbiota própria, que degrada de diferentes formas, a matéria orgânica, diminuindo o poder poluente do efluente gerado [1,19]. A sobrevivência de patógenos, como o gênero *Salmonella*, tem sido estudada [11-13,16,23]. Entretanto, estudos das comunidades bacterianas nos diferentes habitats ainda são escassos [4]. Da mesma forma, o perfil de populações mesófilas, presentes em lagoas de estabilização, ainda é pouco conhecido.

Em estudo realizado anteriormente, em um sistema de lagoas de estabilização para o tratamento de dejetos suínos [17], verificou-se que o mesmo era eficiente na redução de parâmetros físico-químicos e da população de coliformes.

O objetivo deste estudo foi quantificar e caracterizar a microbiota mesófila aeróbia presente ao longo deste sistema de lagoas de estabilização.

MATERIAIS E MÉTODOS

O sistema de tratamento estudado localiza-se no sul do Brasil, recebendo dejetos de cerca de 4.000 matrizes e 30.000 suínos em crescimento e terminação. Os dejetos liquefeitos são levados até tanques de armazenamento, localizados imediatamente antes da planta de tratamento. Após a etapa de separação física em peneiras, a fração líquida passa por um tanque de sedimentação e sete lagoas em série (duas anaeróbias, uma facultativa, uma com aeração mecânica e três aeróbias). Foram realizadas 20 coletas quinzenais em sete pontos

ao longo do sistema de tratamento: após o tanque de armazenamento (P1), após o tanque de sedimentação (P3), lagoa de lodo (PA), após a segunda lagoa anaeróbia (P9), após a lagoa facultativa (P10), após a lagoa com aeração mecânica (P11) e após a terceira lagoa aeróbia (P14). As coletas foram realizadas de acordo com o protocolo vigente na Empresa, sendo que de cada ponto amostrado foram coletadas 05 (cinco) porções de 1 litro cada, em recipiente próprio, sendo daí retirada uma alíquota de 100 mL em vidro estéril, mantida a 4°C e enviada ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS, em Porto Alegre, para a realização de exame bacteriológico.

As amostras foram diluídas (10^{-1} até 10^{-6}) em água peptonada 0,1%, sendo semeadas, em duplicata, alíquotas de 0,1 mL em Ágar para Contagem, pela técnica de superfície. Após incubação em aerobiose a 37°C por 48 horas, as colônias foram contadas nas placas com diluição em que apresentassem entre 20-200 colônias. Avaliou-se, ainda, o número de diferentes tipos coloniais de acordo com a forma (puntiforme, circular ou irregular), a elevação (chata, convexa ou irregular), os bordos (inteiros ou irregulares), a transparência (transparente ou opaca) e a pigmentação (ausente, amarelo, vermelho, verde ou outro), bem como a proporção de colônias pertencentes a cada tipo colonial.

Da placa onde era realizada a contagem, foram coletadas 10 colônias, escolhidas de forma aleatória, para a identificação. Para a escolha das colônias foi construído, previamente, um mapa de quadrantes sobre o qual a placa era depositada, sendo então coletadas as colônias que estavam dentro de áreas pré-determinadas do mapa. As áreas foram pré-determinadas por sorteio, de acordo com a tabela de números aleatórios [20]. As colônias escolhidas foram isoladas em ágar triptose de soja e mantidas a -20°C em caldo de infusão cérebro e coração acrescido de 20% de glicerol, até o momento da identificação. As bactérias foram classificadas de acordo com suas características microscópicas (bastonete ou coco, e coloração de Gram) e testes bioquímicos (catalase, oxidase, crescimento em ágar MacConkey) [14].

Os dados foram agrupados por períodos do ano, segundo as estações climáticas brasileiras, em primavera/verão e outono/inverno.

A diversidade foi calculada pelo índice de Simpson modificado [7], conforme a fórmula: $D=1/[\sum P_i^2]$, onde P_i é a proporção de colônias com uma morfologia específica, contribuindo para a flora total, e S é o número total de distintos tipos de colônias. A equitabilidade foi obtida pela fórmula: $E=D/S$ [7]. Os dados foram avaliados estatisticamente através dos testes de Qui-quadrado e Associação Linear, utilizando o programa SPSS 8.0 [5].

RESULTADOS

A população média de mesófilos aeróbios manteve-se constante, ao longo das lagoas, em ambas as estações do ano (Tabela 1). Avaliando o aspecto qualitativo da microbiota mesófila aeróbia presente, houve uma diferença estatisticamente significativa na diversidade média (D) entre os pontos do sistema, mas não entre as estações do ano (Tabela 1). Esta diferença foi mais evidente entre os pontos (PA, P1 e P3), onde ocorre o tratamento físico dos dejetos, e os pontos finais do sistema (P10, P11 e P14). Determinou-se entre 12 e 26 tipos morfológicos distintos nos diferentes pontos de amostragem. Foram identificados, no início do sistema (P1), doze tipos morfológicos que não foram encontrados no final do sistema (P14); enquanto quatro tipos morfológicos do P14 não foram encontrados no P1. Esta diferença pode ser também constatada na menor diversidade do efluente (D média/P14= 2,039) em relação ao afluente (D média/P1= 3,495) do sistema.

A equitabilidade média variou entre 0,443 e 0,635, não apresentando diferença significativa entre os pontos ou épocas do ano. Nos pontos P1, P3, PA e P10 predominaram as colônias do tipo convexa, bordos inteiros, puntiforme, ausência de pigmento e opaca. Já no P9 predominou o tipo convexa, bordos inteiros, puntiforme, ausência de pigmento e transparente; enquanto nos pontos P11 e P14 o tipo convexa, bordos inteiros, forma circular, pigmento amarelo e opaca foi a mais encontrada.

A escolha aleatória de colônias nos sete pontos ao longo do sistema, resultou na caracterização de 1.554 isolados, classificados em 8 grupos (Figura 1). Verificou-se que no afluente, 42,6% dos isolados eram Gram negativos e 49% Gram positivos (P1= 223 amostras). Já no efluente (P14 = 220 amostras), 32,3% e 38% eram, respectivamente, Gram negativas e Gram positivas.

Quando avaliadas as características, tanto morfo-tintórias como bioquímicas, no ponto P1 observou-se maior ocorrência de bacilos Gram negativos, oxidase negativa e com crescimento no ágar MacConkey (33,2%), seguidas por cocos Gram positivos e catalase positiva (18,4%). Já no ponto P14 observou-se um maior número de cocos Gram positivos e catalase negativa (18,6%), seguidas por bacilos Gram negativos, oxidase negativa e com crescimento no ágar MacConkey (16,8%).

Trezentos e doze (20%) amostras isoladas não sobreviveram ao processo de congelamento, sendo que esta perda foi maior nas amostras provenientes dos pontos finais do sistema. Verificou-se que o número de amostras não recuperadas no ponto P1 (18/223) representou 8% do total de amostras isoladas neste ponto, enquanto que no ponto P14, estas amostras (64/220) representaram 29% das amostras isoladas.

DISCUSSÃO

Nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná estão instalados, aproximadamente, 11,5 milhões de suínos. Nesta região, predominam propriedades pequenas, com sistemas de criação de animais confinados [2]. Desta forma, os dejetos animais produzidos contribuem com importante parcela da matéria orgânica liberada nos recursos hídricos da região, chegando, muitas vezes, sem um tratamento prévio[1].

Embora a população média de mesófilos tenha mantido-se constante ao longo do sistema, observava-se que houve uma grande variação nos valores máximos e mínimos, o que reflete a variabilidade das contagens entre as coletas realizadas. Esta variabilidade está, possivelmente, relacionada a fatores climáticos, físico-químicos e concentração de nutrientes que agem diretamente sobre as populações microbianas nas lagoas. Da mesma forma, a manutenção das altas contagens médias de mesófilos no efluente pode estar relacionada com a presença de níveis, ainda elevados, de fósforo e nitrogênio ao final do sistema [17]. Contagens elevadas de mesófilos em ambientes aquáticos ricos em fósforo já foram encontrados anteriormente [10], demonstrando a influência que os nutrientes exercem sobre o aspecto quantitativo da microbiota presente nestes ambientes.

Tabela 1. Número médio, mínimo e máximo (unidades formadoras de colônias/ mL), número de tipos coloniais (S), Diversidade (D) e Equitabilidade (E) médias de bactérias mesófilas aeróbias isoladas em sete pontos de um sistema de lagoas interligadas para o tratamento de dejetos suínos em duas estações climáticas (primavera/verão e outono/inverno), no sul da Brasil.

Ponto	Outono/Inverno					Primavera/Verão				
	média	mínimo - máximo	S	D	E	média	mínimo -máximo	S	D	E
PA	1,2x10 ⁶	1x10 ² - 7,9x10 ⁶	24	3,69 ^a	0,63	1,5x10 ⁶	1x10 ⁴ - 8,3x10 ⁶	21	4,25 ^a	0,61
P1	8,2x10 ⁵	1x10 ⁴ - 3x10 ⁶	24	3,41 ^{ab}	0,54	3,4x10 ⁴	2x10 ³ - 1,4 x10 ⁶	21	3,58 ^{ab}	0,52
P3	7,7x10 ⁵	1x10 ⁴ - 3,9x10 ⁶	24	3,01 ^{ab}	0,51	1,6x10 ⁵	4x10 ³ - 5 x10 ⁶	21	4,14 ^{ab}	0,57
P9	6,6x10 ⁴	1x10 ² - 3,4x10 ⁵	25	2,75 ^b	0,47	2,6x10 ⁴	1x10 ² - 2,8x10 ⁵	25	2,82 ^b	0,48
P10	2,5x10 ⁶	1x10 ³ - 1,34x10 ⁶	25	1,62 ^c	0,44	9,6x10 ⁵	1x10 ⁴ - 3,6 x10 ⁶	12	1,71 ^c	0,64
P11	1,1x10 ⁵	2x10 ² - 6,4x10 ⁵	26	2,02 ^c	0,52	5x10 ⁵	1x10 ² - 3,1x10 ⁶	19	2,18 ^c	0,55
P14	3,2x10 ⁵	6x10 ² - 1,47x10 ⁶	24	1,71 ^c	0,46	1,6x10 ⁶	4x10 ³ - 2,6x10 ⁷	20	2,37 ^c	0,52

a ,b, c = letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística significativa (p<0,005). PA = lagoa de lodo, P1 = chegada dos dejetos brutos, P3 = após o tanque de sedimentação, P9 = após a lagoa anaeróbia, P10= após a lagoa facultativa, P11 = após a lagoa com aeração mecânica, P14 = pós a terceira lagoa aeróbia.

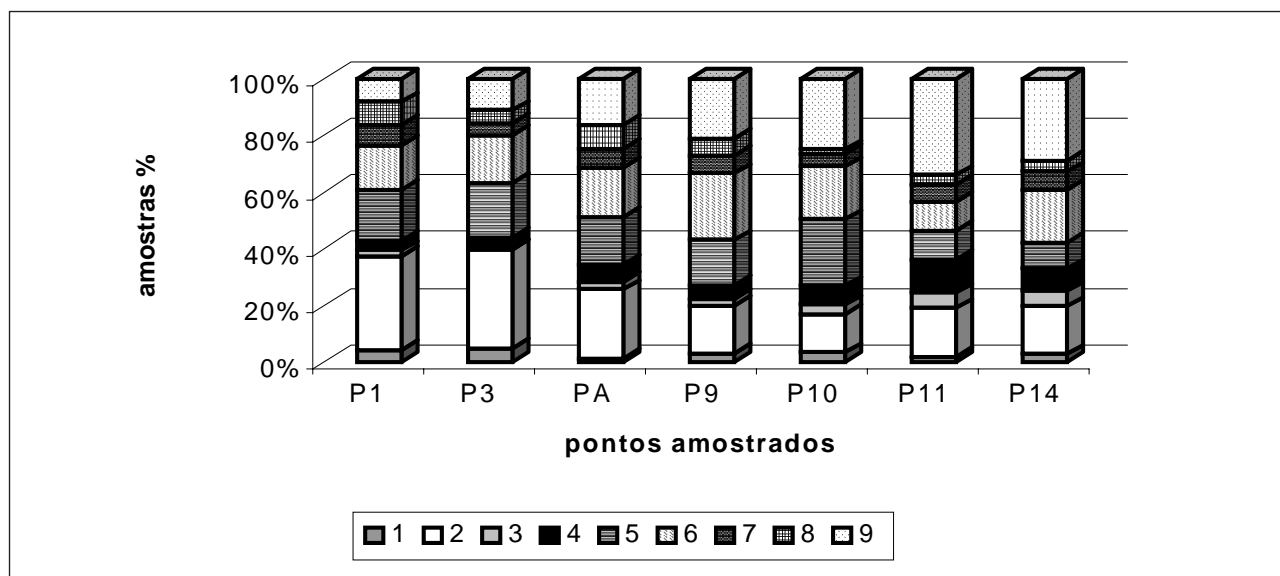


Figura 1. Características de bactérias mesófilas aeróbias isoladas de sete pontos de um sistema de tratamento de dejetos de suínos (P1 = chegada dos dejetos brutos, n=223; P3= após o tanque de sedimentação, n = 242; PA = lagoa de lodo, n = 243; P9 = após a segunda lagoa anaeróbia, n = 228; P10 = após a lagoa facultativa, n = 213; P11= após a lagoa com aeração mecânica, n = 185; P14 = após a terceira lagoa aeróbia n = 220), onde: 1 = bastonetes e cocos Gram negativo/ Oxidase negativo/ sem crescimento em ágar MacConkey; 2 = bastonetes e cocos Gram negativo/ Oxidase negativo/ com crescimento em ágar MacConkey; 3 = bastonetes e cocos Gram negativo / Oxidase positivo/ sem crescimento em ágar MacConkey; 4 = bastonetes e cocos Gram negativo/ Oxidase positivo/ com crescimento em ágar MacConkey; 5 = Coco Gram positivo/ Catalase positiva; 6 = Coco Gram positivo/ Catalase negativa; 7 = Bastonete Gram positivo/ Catalase positiva; 8 = Bastonete Gram positivo/ Catalase negativa; 9 = amostras não recuperadas.

A menor diversidade verificada no efluente em relação ao afluente do sistema, está de acordo com outros estudos [7] que demonstraram tendência à diminuição dos índices de diversidade ao longo de sistemas aeróbios de tratamento de dejetos suínos. Esta menor diversidade do efluente possivelmente reflete o desaparecimento de grupos bacterianos típicos do trato gastrointestinal dos suínos que não resistiram à pas-

sagem por condições ambientais distintas das lagoas [1,8]. Por outro lado, em ambientes aquáticos naturais, como lagos eutróficos [10], verificou-se correlação negativa entre diversidade e contagem bacteriana. Ou seja, ambientes aquáticos não poluídos seriam caracterizados por uma pequena população bacteriana, composta por numerosas espécies. Neste caso, participariam destas populações bacterianas oligotróficas, di-

minuindo a importância das bactérias mesófilas e copiotróficas que foram avaliadas no presente estudo.

Alguns estudos afirmam, ainda, que os nutrientes presentes nos dejetos animais poderiam proteger algumas populações microbianas, aumentando a diversidade em ecossistemas oligotróficos que recebiam estes efluentes [8]. Desta forma, é possível que no sistema do presente estudo a diversidade final observada ainda esteja acima do perfil típico do corpo d'água que recebe o efluente, fato que ainda necessita ser avaliado.

Considerando-se que quando a equitabilidade é igual a um não há população dominante [7], os resultados do presente estudo indicaram que houve predominância de um tipo morfológico em todos os pontos amostrados.

Diferentemente dos resultados verificados no presente trabalho, em um sistema de tratamento de dejetos sólidos, localizado na mesma região, foi observada estabilidade na relação percentual dos microorganismos Gram positivos e Gram negativos nas primeiras semanas de fermentação, com predominância de Gram positivos ao final do processo [15]. Entretanto a compostagem ocorre em condições diferentes de decomposição da matéria orgânica daquelas encontradas em lagoas de estabilização. Desta forma é esperado que outros microorganismos participem e sejam selecionados durante este processo.

Quando avaliadas as características, tanto morfo-tintórias como bioquímicas, observa-se que, apesar da contagem média de mesófilos aeróbios ter permanecido constante ao longo do sistema, o perfil dos microorganismos que compunham esta população modificou-se. No início do sistema a predominância do grupo com características compatíveis com enterobactérias, bacilo Gram negativo, oxidase negativa, com crescimento em ágar MacConkey, reflete a elevada carga de coliformes presentes nos dejetos que chegam no afluente. Já no efluente observou-se o pre-

domínio de bactérias com características compatíveis com o grupo dos enterococos, cocos Gram positivos, catalase negativa. O predomínio de bactérias Gram negativas no início de sistemas de tratamento de dejetos seguida de declínio destas populações bacterianas ao final dos mesmos, tem sido encontrado em outros estudos [3,9]. O fato de serem encontradas possíveis enterobactérias no efluente do sistema avaliado no presente estudo concorda com os resultados obtidos anteriormente, onde se observou uma sobrevivência média ao tratamento de 34% de coliformes totais [17]. O predomínio de enterococos no efluente pode ser explicado pelo fato destas bactérias serem mais resistentes aos ambientes adversos, o que contribui para sua sobrevivência ao longo das lagoas de estabilização [1].

Em relação às amostras isoladas não sobreviveram ao processo de congelamento (20%), há registros na literatura da perda de até 40 % de amostras bacterianas isoladas em ambiente aquático, durante o processo de identificação laboratorial [4]. Embora as técnicas de cultivo bacteriano sejam úteis para a identificação de espécies presentes no ambiente, apenas uma pequena proporção do número total destas pode ser determinada pela contagem direta. Isto porque, uma grande parte das bactérias presentes em amostras ambientais não pode ser cultivada ou não sobrevive por muito tempo em condições *in vitro* [3,7,18]. Desta forma, estudos objetivando a caracterização das populações microbianas presentes no efluente e no corpo d'água receptor necessitarão incluir métodos moleculares que têm sido empregados neste tipo de estudo [8].

CONCLUSÃO

O tratamento dos dejetos ao longo do sistema estudado, apesar de não ter alterado a contagem de mesófilos aeróbios, propiciou modificação na diversidade e no perfil das bactérias presentes.

REFERÊNCIAS

- 1 **Atlas R. & Bartha R. 1998.** Microbial Ecology. 4th edn. California: Benjamin/Cummings, 694 p.
- 2 **Belli Filho P., Costa R.H.R. da, Soares S.R., Castilhos Jr A.B. & Perdomo C.C. 2000.** Gestão Ambiental dos Sistemas de produção de Suínos para o Sul do Brasil. In: Frankenberg C.L.C., Raya-Rodrigues M.T. & Cantelli M. (Eds). *Gerenciamento de resíduos e Certificação Ambiental*. Porto Alegre: PUCRS, pp. 280 - 291.
- 3 **Bhowmik M. L., Pandey B. K. & Surkar U. K. 1994.** Microflora present in wastewater aquaculture ponds and fishes. *Environment & Ecology*. 12: 419- 423.

- 4 **Borsodi A.K., Farkas I. & Kurdi P. 1995.** Numerical analysis of planktonic and reed biofilm bacterial communities of lake Fertő (Neusiedlersee, Hungary/Austria). *Water Research*. 32: 1831 - 1840.
- 5 **Cáceres R.A. 1995.** Estadística multivariante y no paramétrica com SPSS. Madrid: Díaz de Santos, 389 p.
- 6 **Chará J.D.O. 1998.** El potencial de las excretas porcinas para uso múltiple y los sistemas de descontaminación. In: *Memorias del Seminario Internacional Contaminación y Reciclaje en la Producción Porcina: Aspectos Legales Técnicos y Económicos* (Santiago de Cali, Colombia). pp. 49 - 50.
- 7 **Chikh G., Pourquié J., Kaiser P. & Davila A.M. 1997.** Characterization of bacterial flora isolated from a pilot-scale lagoon processing swine manure. *Canadian Journal of Microbiology*. 43: 1079 - 1083.
- 8 **Cho J. C. & Kim S.S.J. 2000.** Increase in bacterial community diversity in subsurface aquifers receiving livestock wastewater input. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 956 - 965.
- 9 **Doyle Y., Guay R., de la Noue J. & Asselin J. 1986.** Aerobic treatment of pig slurry: microbial aspects. *Canadian Journal of Microbiology*. 32: 679 - 686.
- 10 **Edwards M. L., Lilley A.K., Timms-Wilson T.H., Thompson I.P. & Cooper I. 2001.** Characterization of the culturable heterotrophic bacterial community in a small eutrophic lake (Priest Pot). *FEMS Microbiology Ecology*. 35: 295 - 304.
- 11 **Heinonen-Tanski H., Niskanen E. M., Salmela P. & Lanki E. 1998.** Salmonella in animal slurry can be destroyed by aeration at low temperature. *Journal of Applied Microbiology*. 85: 277 - 281.
- 12 **Herold T., Kliche R. & Hensel A. 1999.** Effect of aerobic fermentation on the survival of *Salmonella* Typhimurium *DT 104 and *Escherichia coli* in swine liquid manure. *Berlin Munchener Tierärztlicher Wochenschrift*. 112: 448 - 453.
- 13 **Kearney T. E., Larkin M. J., Frost J. P. & Levett P. N. 1993.** Survival of pathogenic bacteria during mesophilic anaerobic digestion of animal waste. *Journal of Applied Microbiology*. 75: 215-219.
- 14 **Mac Faddin J.F. 2000.** Biochemical Test for identification of Medical Bacteria. 3rd edn. Philadelphia: Williams & Wilkins, 912 p.
- 15 **Santurio G.L.A., Borges V.F. & Schmidt V. 1995.** Compostação sólida de dejetos animais: a antibiose como indicador de maturação do processo. In: *Anais do VII Salão de Iniciação Científica* (Porto Alegre, Brasil). p.89.
- 16 **Schmidt V. & Cardoso M. R. I. 2003.** Sobrevivência e perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* sp. isoladas em um sistema de tratamento de dejetos de suínos. *Ciência Rural*. 33: 881-888.
- 17 **Schmidt V., Gotardi C.P.T., Santos M.A.A. & Cardoso M.R.I. 2002.** Perfil Físico-Químico e Microbiológico de uma Estação de Tratamento de Dejetos Suínos. *ARS Veterinária*. 18: 258-264.
- 18 **Smit E., Leeflang P., Gommans S., van den Broek J., van Mil S. & Wernars K. 2001.** Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat fields as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2284-2291.
- 19 **Strauch D. 1987.** Animal production and environmental health. New York: Elsevier, 324 p.
- 20 **Strauch D. 1988.** Disease agents in feces and their epidemiologic significance. *Tierärztlich Praxis Supplement*. 3: 21-27.
- 21 **Strauch D. 1991.** Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. *Veterinary Science and Technology*. 10: 813-846.
- 22 **Thursfield M. 1986.** Veterinary Epidemiology. London: Butterworths, 280 p.
- 23 **Watanabe M., Rao J. R., Stewart T. A., Xu J., Millar B. C., Xiao L., Lowery C. J., Dooley J. S. G & Moore J. E. 2003.** Prevalence of bacterial faecal pathogens in separated and unseparated stored pig slurry. *Letters in Applied Microbiology*. 36: 208-212.

