



EPAMIG

31^o Congresso Nacional de Laticínios

Instituto de Laticínios Cândido Tostes



18 a 20 de Julho de 2017 - Juiz de Fora - MG

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE BIODIGESTORES
ANAERÓBIOS OPERADOS COM DEJETOS SUÍNOS E COM DEJETOS
BOVINOSSoraia Chafia Naback de Moura⁽¹⁾, Marcelo Henrique Otenio⁽²⁾, Aline Dias Paiva⁽³⁾,
Jailton da Costa Carneiro⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Universidade Presidente Antônio Carlos, Juiz de Fora, MG, Brasil,
soraianaback41@hotmail.com;

⁽²⁾ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG,
Brasil, marcelo.otenio@embrapa.br;

⁽³⁾ Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Departamento de Microbiologia, Imunologia e
Parasitologia, Uberaba, MG, Brasil, aline.paiva@uftm.edu.br;

⁽⁴⁾ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG,
Brasil, jailton.carneiro@embrapa.br

Resumo

Os dejetos animais podem ser tratados utilizando biodigestores pelo processo de biodigestão anaeróbia, produzindo biofertilizante e gerando biogás e energia. O objetivo deste trabalho foi avaliar microbiologicamente a biodigestão anaeróbia em biodigestores de escala piloto, alimentados com dejetos de suínos e com dejetos de bovinos, bem como comparar os métodos de identificação bioquímico e molecular. A morfologia dos isolados bacterianos foi confirmada pela coloração de Gram, as amostras foram identificadas pelo método semi-automatizado BBL *Crystal Identification System*® e genotipicamente pelo sequenciamento do rDNA 16S. O grupo microbiano mais prevalente foi *Enterococcus* com predomínio de *Enterococcus faecium*. A utilização do biofertilizante gerado pela biodigestão de dejetos suínos e bovinos deve ser criteriosa, devido à persistência de espécies potencialmente patogênicas no efluente final.

Palavras-chave: Biodigestão anaeróbia; biodigestores; dejetos animais.

Introdução

A criação de suínos no Brasil predomina em pequenas propriedades e unidades de produção familiar, e um dos maiores problemas no confinamento destes animais é a grande produção de dejetos, com alto potencial poluidor (ANGONESE et al., 2006). A pecuária leiteira destaca-se entre uma das maiores cadeias produtivas do Brasil, ocupando a sexta posição dentre os maiores produtores do mundo, gerando mais de 100 milhões de toneladas de dejetos por ano (IPEA, 2012).

O uso do biodigestor anaeróbio é uma importante ferramenta, pois além de tratar os resíduos, produz o biogás, onde a utilização do gás metano gera energia, e

ainda o biofertilizante. Para redução dos impactos ambientais é necessário identificar a população bacteriana presente nos dejetos animais (MAGALHÃES, 1986; RESENDE et al., 2014).

O biofertilizante é o efluente produzido pelo biodigestor por meio da fermentação anaeróbia da biomassa durante o processo da biodigestão. É composto principalmente por matéria orgânica e Nitrogênio, Fósforo e Potássio (NPK), cuja utilização é a adubação do solo; sua produção tem um baixo custo na agricultura e sem geração de problemas ao solo, em comparação com o uso de fertilizante químico (BARBOSA, LANGER, 2011).

Os micro-organismos existentes nos biodigestores são organismos procariotos e estão enquadrados nos domínios *Archaea* e *Bacteria*. A identificação bacteriana baseada somente em características fenotípicas mostra-se cada vez mais restrita e uma alternativa seria a associação das provas bioquímicas com métodos moleculares, de modo a aumentar a eficácia da identificação bacteriana (KIM et al., 2008). O sequenciamento de fragmentos do gene rDNA 16S permite identificar as bactérias de forma mais confiável, além de oferecer uma outra vantagem que é a identificação de bactérias não cultiváveis (TRINGE et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi identificar as bactérias isoladas de biodigestores alimentados com dejetos de suínos e com dejetos de bovinos, bem como comparar a identificação morfo-bioquímica e molecular dos isolados.

Material e Métodos

Para a identificação bioquímica foram utilizados os Kits comerciais BBL *Crystal Gram-Positive Identification System*® e BBL *Enteric/ Non Fermenter Identification System*®. Para a identificação molecular inicialmente foi feita a extração do DNA utilizando o Kit Dneazy^(R) (Quiagen, Hildem, Alemanha). Em seguida foi feita a reação em cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os *primers* universais 27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) e 907R (CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT). Posteriormente foi realizado o sequenciamento das amostras (rDNA16S) pela empresa ACT Gene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS). A identificação bacteriana foi feita pelo

sistema BBL Crystal (SISTEMAS, 2002) e pelo *Basic Local Alignment Search Tool* (Blast). A análise dos dados foi feita de forma descritiva.

Resultados e Discussão

A comparação dos resultados obtidos com os dois métodos de identificação foi feita usando os critérios de classificação das espécies. Dos 22 isolados avaliados, apenas o SCP 163, SBN 150 e SCP 007, provenientes de dejetos suínos, mostraram concordância de espécie pelos dois métodos, sendo identificados como *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium*, respectivamente. Outros 6 isolados (SCP 023, SCP 012, SCP 008, SCP 046, SCP 006, BCP 002) foram identificados como pertencendo ao mesmo gênero, mas diferindo no que se refere à espécie (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies bacterianas, identificadas pelos métodos bioquímico e pelo método de sequenciamento do gene rDNA 16S

Amostras	Identificação bioquímica	Identificação Molecular
SCP 050	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 005	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 021	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 023	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Staphylococcus lentus</i>
SCP 054	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Enterococcus sp.</i>
SCP 047	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 012	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 008	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 006	<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 046	<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Enterococcus hirae</i>
SCP 007	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 163	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 024	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 036	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 032	<i>Lactococcus lactis ssp hordniae</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 011	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 001	<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Enterococcus hirae</i>
BCP 002	<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Aerococcus sp.</i>
BCP 009	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCP 013	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Arthrobacter sp.</i>
SBN 152	<i>Enterobacter asburiau</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SBN 150	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

BCP: bovino, coco Gram-positivo; SBN: suíno, bacilo Gram-negativo; SCP: suíno, coco Gram-positivo.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Considerando o método molecular como padrão ouro para a identificação bacteriana, das 22 amostras analisadas, a espécie mais prevalente foi *Enterococcus faecium* (n=14). A população de *Enterococcus* compreende bactérias amplamente distribuídas no ambiente, fazendo parte da microbiota intestinal de humanos e

animais (MURRAY, 1990). Estudos anteriores mostraram que *Enterococcus* predominam em biodigestores alimentados com dejetos de bovinos (BAGGE et al.; 2005). Resultados semelhantes também foram encontrados por Resende (2013), que utilizou biodigestores alimentados com dejetos bovinos, da pecuária leiteira, na qual evidenciou a prevalência de *Enterococcus* em amostras recuperadas de afluentes e efluentes.

Conclusões

Fica evidente que o padrão ouro para a identificação é a utilização de ferramentas moleculares. A identificação tradicional não oferece resposta confiável, pois os kits disponíveis no mercado são caracteristicamente validados para isolados clínicos, provenientes de humanos ou animais, o que torna sua utilização em amostras ambientais menos segura ou confiável.

Quando comparados os métodos utilizados evidencia-se que o isolamento e seleção de micro-organismos para trabalhos de microbiologia podem ser suportados por métodos clássicos, entretanto carece de confirmação com ferramentas mais precisas, como biologia molecular, para identificação de gênero e espécie.

Agradecimentos

À Embrapa e à ITAIPU, pelo financiamento do trabalho, mediante financiamento do projeto: Tecnologias para a produção e uso do biogás e fertilizantes a partir do tratamento de dejetos animais.

Referências

- ANGONESE, A. R.; CAMPOS A. T.; PALACIO, S. M.; SZYMANSKI, N. Avaliação da eficiência de um biodigestor tubular na redução da carga orgânica e produção de biogás a partir de dejetos de suínos. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 6., 2006, Campinas - Agrener 2006. [Anais...] Disponível em: <<http://www.feagri.unicamp.br/energia/agrener2006/jdownloads/pdf/56.pdf>>. Acesso em: 25 jan 2017.
- BAGGE, E.; SAHLSTROM, L.; ALBINH, A. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Waterresearch*, v. 39, n. 20, p. 4879-4886, 2005.

BARBOSA, G.; LANGER, M. Uso de biodigestores em propriedades rurais: uma alternativa à sustentabilidade ambiental. **Unoesc & Ciência – ACSA**, Joaçaba, v. 2, n. 1, p. 87-96, jan./jun. 2011.

IPEA. **Plano Nacional de Resíduos Sólidos: diagnóstico dos resíduos urbanos, agrosilvopastoris e a questão dos catadores**. Brasília, DF: IPEA, 2012. (IPEA. Comunicados do IPEA, 145).

KIM, Y.; JUNG, J.; KIM, M.; PARK, J.; BOXALL, A. B. A.; CHOI, K. Prioritizing veterinary pharmaceuticals for aquatic environment in Korea. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 26, p. 167-176, 2008.

MAGÃLHÃES, A. P. T. **Biogás – um projeto de saneamento urbano**. São Paulo: Nobel, 1986. 120 p.

MURRAY, B. E. The life and times of the Enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3, p. 46-65, 1990.

RESENDE, J. A. **Avaliação da diversidade microbiana e do risco clínico-microbiológico de sistemas de biorreatores para a produção de biogás e biofertilizante a partir de dejetos da pecuária leiteira**. 2013. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

RESENDE, J. A.; SILVA, V. L.; OLIVEIRA, T. L. R.; FORTUNATO, S. O.; CARNEIRO, J. C.; OTENIO, M. H. Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 284-291, 2014.

TRINGE, S. G.; HUGENHOLTZ, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 11, n. 5, p. 442-446, 2008.