

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**

**CAMPUS DE CASCAVEL**

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DO SISTEMA ÁGUA RESIDUÁRIA DA  
SUINOCULTURA-SOLO**

**ALEXANDRE CARVALHO DE MOURA**

**CASCAVEL – PARANÁ – BRASIL**

**FEVEREIRO 2015**

**ALEXANDRE CARVALHO DE MOURA**

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DO SISTEMA ÁGUA RESIDUÁRIA DA  
SUINOCULTURA-SOLO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental

Orientador: Dr. Silvio César Sampaio

Co-orientadora: Dra. Luciana Pagliosa  
Carvalho Guedes

CASCADEL – PARANÁ – BRASIL

FEVEREIRO 2015

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Biblioteca Central do Campus de Cascavel – Unioeste**  
**Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965**

M884a

Moura, Alexandre Carvalho de  
Aspectos microbiológicos do sistema água residuária da suinocultura-  
solo./Alexandre Carvalho de Moura. Cascavel, 2015.

55 p.

Orientador: Silvio César Sampaio  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Pagliosa Carvalho Guedes

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Agrícola

1. Solo – Microorganismos. 2. Solo – Bioindicadores. 3. Biomassa  
microbiana. 4. Patógenos. 5. DGGE. 6. Riscos ambientais I. Universidade  
Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.


CDD 21.ed. 631.86

**ALEXANDRE CARVALHO DE MOURA**


"Aspectos microbiológicos de sistemas de tratamento e da aplicação de água residuária da suinocultura no solo"


Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação "*Stricto Sensu*" em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, **aprovada** pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Silvio Cesar Sampaio  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Cascavel

  
Prof.ª Dra. Adriana Pereira da Silva  
Universidade Paranaense – *Campus* de Umuarama

  
Prof. Dr. Marcus Metri Correia  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

  
Prof.ª Dra. Eloy Lemos de Mello  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Cascavel

  
Prof. Dr. Ralphe Rinaldo dos Reis  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Cascavel

Cascavel, 24 de fevereiro de 2015.

## **BIOGRAFIA**

Alexandre Carvalho de Moura, nascido na cidade do Rio de Janeiro em 25 de julho de 1974. Possui bacharelado e licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Santa Úrsula - USU (1997), especialização em análises clínicas pela Faculdade Assis Gurgacz – FAG (2009) e mestrado em Microbiologia, pela Universidade Estadual de Londrina- UEL (2000). Atuou como professor no ensino fundamental e médio no período de 2000 a 2010. Atua também no ensino superior desde 2000. Foi Coordenador do Curso de Ciências Biológicas na Faculdade Assis Gurgacz – FAG no ano de 2010. Atualmente trabalha na Universidade Federal da Fronteira Sul- UFFS, como Professor Assistente na área de Microbiologia nos cursos de graduação em Ciências Biológicas e Nutrição. Participa dos Colegiados dos Cursos de Nutrição e Ciências Biológicas e do Núcleo Docente Estruturante – NDE do curso de Ciências Biológicas. Possui trabalhos de pesquisa nas áreas de Microbiologia ambiental e Alimentos.

*Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.*  
- [Roberto Shinyashiki](#)

Dedico esta tese com todo meu amor para meus filhos Leonardo e Julia, minha Mãe Maria Lucia e minha irmã Patrícia, sem os quais não estaria aqui neste momento. Também a dedico com muito amor para minha namorada Flavia, fundamental na conclusão deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me abençoou e orientou durante todo meu percurso e me permitiu chegar até este momento tão especial em minha vida;

Ao Prof. Dr. Silvio César Sampaio, pela orientação, confiança, amizade e principalmente pelo grande apoio nos momentos mais difíceis;

A Profa. Dra. Luciana Pagliosa Carvalho Guedes, pela co-orientação, paciência, disponibilidade e valiosos conhecimentos transmitidos;

A Profa. Dra. Fabiana Gisele da Silva Pinto, por sua contribuição durante os experimentos e apoio em muitos momentos durante a árdua caminhada;

Ao Prof. Dr. Ralpo Rinaldo dos Reis, pela sua disponibilidade, paciência e transmissão de conhecimento em etapa importantíssima do meu desenvolvimento;

Ao IAPAR, em especial o Dr Arnaldo Colozzi Filho e sua equipe, pela disponibilidade e auxílio no desenvolvimento das análises;

À EMBRAPA, em especial a Dra Mariangela Hungria e Adriana Pereira da Silva, pela disponibilidade, amizade e auxílio no desenvolvimento das análises;

À UNIOESTE e ao Governo do Estado do Paraná, pelos recursos financeiros que permitiram a execução deste trabalho;

Ao corpo docente e servidores do PGEAGRI, pelo suporte teórico, técnico e administrativo que permitiu a conclusão deste trabalho;

Aos amigos e colegas do PGEAGRI, em especial Thaisa, Juliana, Pamela, Kayla, Marcelo e Danielle, pelo auxílio, apoio e amizade durante os últimos 4 anos.

A Direção do *Campus* Realeza da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, pelo apoio e compreensão durante todo o processo de capacitação ao longo dos últimos 4 anos.

Ao Colegiado do Curso de Nutrição e Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, pelo apoio durante o desenvolvimento da TESE de Doutorado;

A todas as pessoas, que de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho de tese.



## RESUMO

A utilização de água residuária em solos agrícolas vem sendo praticada como importante opção para agricultura. Devido à redução na disponibilidade de recursos hídricos, a reutilização de água residuária vem ganhando espaço na agricultura com a agregação de valor para o uso de água. A água residuária da suinocultura é rica em matéria orgânica, composta por diferentes elementos de origem química, física e biológica. Sua adição no solo e recursos hídricos, sem estudos prévios e conhecimento de seus componentes, pode provocar contaminação de águas superficiais e subterrâneas, alterações da biologia destes ambientes, bem como o aporte e acúmulo de grupos de microrganismos no ambiente, incluindo patógenos. A maior parte dos estudos sobre água residuária da suinocultura, principalmente no Brasil, se restringe aos seus componentes físicos e químicos, avaliando seu impacto diretamente sobre o solo, corpos d'água ou na produtividade vegetal. Poucos estudos se concentram na composição microbiana deste tipo de resíduo e principalmente sobre o risco de contaminação ambiental por microrganismos patogênicos ou mesmo sobre o impacto deste elemento na comunidade microbiana do solo. Desta forma estes dejetos animais podem apresentar importante papel como iniciadores de doenças infecciosas em animais e seres humanos. Este trabalho de tese é constituído de dois artigos. No primeiro artigo, foi feito um estudo para verificar a composição bacteriana presente na água residuária da suinocultura, bem como verificar a possibilidade de eliminação destes microrganismos através dos principais sistemas de tratamento anaeróbicos utilizados no Brasil. Foram avaliados em especial os microrganismos patogênicos, de origem gastrointestinal dos suínos e bioindicadores microbianos. As amostras de água residuária utilizadas foram provenientes de granjas que utilizavam de sistemas anaeróbicos com esterqueiras e biodigestores no tratamento do resíduo. Os resultados obtidos mostraram claramente a presença de coliformes, mesofilos aeróbios, bolores e leveduras, enterococos e patógenos na água residuária da suinocultura. Apesar da possibilidade de decréscimo de determinados grupos microbianos ao longo das etapas dos processos de tratamento, não houve eliminação de patógenos em nenhum dos dois sistemas de tratamento, o que pode possibilitar a disseminação de microrganismos e patógenos no meio ambiente. No segundo artigo, o objetivo foi avaliar o efeito da aplicação da água residuária da suinocultura associada a adubação mineral, em área agrícola, após longo tempo de aplicação, na comunidade bacteriana do solo. Assim, foram coletadas amostras de solo com 18 ciclos de produção, com aplicação de água residuária de suinocultura e avaliados os efeitos quantitativos (respiração basal, biomassa microbiana e quociente metabólico) e qualitativos (DGGE) na comunidade bacteriana do solo. Os resultados mostraram que a aplicação de água residuária da suinocultura, principalmente após longo tempo e em concentrações maiores, pode alterar a dinâmica da comunidade bacteriana do solo, impactando no local de despejo. Os resultados dos artigos mostram a necessidade de maiores estudos para aplicação deste tipo de resíduo na agricultura, a fim de minimizar os riscos de contaminação ambiental e ou disseminação de patógenos.

**PALAVRAS – CHAVE:** riscos ambientais; patógenos ; bioindicadores; microrganismos do solo; biomassa microbiana; DGGE.

## ABSTRACT

wastewater use in agricultural soils has been adapted as an important practice for agriculture. Due to the reduction of the availability of the quality of water resources is becoming increasingly important to add value to the use of water. The swine wastewater is rich in organic matter, composed of various elements of chemical origin, physical and biological. Its addition in soil and water resources without previous studies and knowledge of its components, can cause changes in the soil, contamination of surface and groundwater, biology changes in these environments, as well as the contribution and accumulation of groups of microorganisms in the environment, including pathogens. Most studies on swine wastewater, mainly in Brazil, are restricted to its physical and chemical components, evaluating its impact directly on the ground, water bodies or in plant productivity. Few studies focus on the microbial composition of this type of waste and especially on the risk of environmental contamination by pathogenic microorganisms or even on the impact of this element in the soil microbial community. Thus these animal manure may have an important role as initiators of infectious diseases in animals and humans. Thus, this thesis consists of two papers. In the first article, a study was done to check the bacterial composition present in swine wastewater, and to verify the possibility of eliminating these microorganisms through the main anaerobic treatment systems used in Brazil. It was evaluated in particular pathogenic microorganisms of gastrointestinal origin of the pigs and microbial environmental markers. The wastewater samples were taken from pig farms that use bio-manure storage tanks and digesters as treatment methods for the waste. The results clearly showed the presence of biomarkers and pathogens in swine wastewater. Despite the possibility of decrease of certain microbial groups throughout the stages of the treatment process, no elimination of pathogens in either treatment systems. Thus, demonstrates the possibility of the spread of pathogens and microorganisms in the environment. In the second paper, the objective was to evaluate the effect of application of swine wastewater associated with mineral fertilizer in agriculture, after a long time of application of swine wastewater in the soil microbial community. Thus, samples were collected from soils after 18 production culture cycles, with the application of wastewater from pig farms and assessed the quantitative effects (basal respiration, microbial biomass and metabolic quotient) and qualitative (DGGE, biodiversity indices, correlation between the chemical conditions and soil microbial activity) in the soil microbial community. The results showed that the application of swine wastewater, especially after long time and in higher concentrations, can change the dynamics of soil microbial community, impacting the dump site. The results of these studies show the need for further studies to apply this type of waste in agricultural soils, in order to minimize the risk of environmental contamination and/ or spread of pathogens.

**KEYWORDS:** environmental risks; pathogens; bioindicators; soil microorganisms; microbial biomass; DGGE.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>IX</b>
<hr/>	
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>X</b>
<hr/>	
<b>ARTIGO 1</b>	<b>1</b>
<hr/>	
ÁGUA RESIDUÁRIA DE SUINOCULTURA: FONTE DE ÁGUA E NUTRIENTES OU RISCO DE CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA?	
<hr/>	
<b>ARTIGO 2</b>	<b>24</b>
<hr/>	
EFEITOS DE LONGO PRAZO DA APLICAÇÃO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE SUINOCULTURA E ADUBAÇÃO MINERAL SOBRE A MICROBIOTA DO SOLO	

## LISTA DE FIGURAS

### FIGURAS DO ARTIGO 1

---

Figura 1	Sistemas de tratamento empregados na água residuária de suínos e seus respectivos pontos de coleta.	07
Figura 2	Análise das Componentes Principais (ACP) baseada na relação das variáveis microbiológicas e ambientais e nos pontos de coleta dos sistemas 1 e 2	17
Figura 3	Dendrograma de similaridade entre os parâmetros ambientais e microbiológicos	18

### FIGURAS DO ARTIGO 2

---

Figura 1	Similaridade genética (%), entre os perfis de DNA bacteriano presentes no solo submetidos à diferentes concentrações de ARS e adubação mineral.	36
Figura 2	Dendrograma construído com os perfis de 16S rDNA-DGGE de comunidade bacteriana de solo com diferentes concentrações de ARS e adubação mineral.	39

## LISTA DE TABELAS

### TABELAS DO ARTIGO 1

---

Tabela 1	Parâmetros microbiológicos da ARS avaliados nos sistemas de tratamento com esterqueira e biodigestor.	11
Tabela 2	Análise de componentes principais (ACP) baseada na relação das variáveis microbiológicas e ambientais nos dois sistemas de tratamentos da ARS	15

### TABELAS DO ARTIGO 2

---

Tabela 1	Parâmetros microbiológicos (BMS,RBS e qCO <sub>2</sub> ) no solo submetido a diferentes concentrações de ARS e AM.	34
Tabela 2	Índices de diversidade das comunidades bacterianas do solo sob diferentes concentrações de ARS e adubação mineral.	38

# ARTIGO 1

## **ÁGUA RESIDUÁRIA DE SUINOCULTURA: FONTE DE ÁGUA E NUTRIENTES OU RISCO DE CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA?**

## **Água residuária de suinocultura: Fonte de água e nutrientes ou risco de contaminação microbiológica?**

**RESUMO:** A utilização de água residuária da suinocultura na agricultura tem sido uma prática comumente utilizada. Contudo, existem poucas informações a respeito do risco de contaminação microbiana no ambiente por este tipo de efluente. Neste trabalho, foi avaliada a presença de bioindicadores e patógenos de origem do trato gastrointestinal de suínos em água residuária da suinocultura ao longo dos principais sistemas de tratamento anaeróbico. Foram analisadas amostras da água residuária da suinocultura de propriedades que utilizam sistemas de tratamento com esterqueira e biodigestor. As análises demonstram a presença de diferentes bioindicadores e patógenos, tais como coliformes, *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Staphylococcus* sp. e *Pseudomonas* sp. na água residuária nos distintos sistemas de tratamento. Houve redução dos aeróbios, como mesófilos, *Pseudomonas* e bolores apenas no sistema com biodigestor. Não houve eliminação de patógenos nos sistemas de tratamento em estudo. A ineficácia dos tratamentos empregados na eliminação de patógenos pode estar relacionada à contaminação nas etapas finais do tratamento, pela presença de animais ou escoamento do solo adjacente. Sugere-se que o efluente deva passar por processo de desinfecção para ser utilizado na agricultura a fim de que se evitem contaminação ambiental e risco de disseminação de patógenos.

**PALAVRAS-CHAVE:** risco ambiental, microrganismos patogênicos, tratamento anaeróbico, poluição microbiana, enterobactérias.

## **Swine wastewater: is it a source of water and nutrients or a risk of microbial contamination?**

**ABSTRACT:** Swine wastewater (SW) application in cropping areas has been commonly carried out. However, there is little information regarding a microbial contamination risk to the environment caused by this kind of effluent. In this study, the presence of bioindicators and pathogen microorganisms of swine gastrointestinal area in SW were evaluated over both mainly used anaerobic treatment systems in swine farms: biodigester and bio-manure storage tanks. Results showed the presence of different bioindicators and gastrointestinal pathogens from swine in the effluent such as coliforms *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Staphylococcus* sp. e *Pseudomonas* sp. in these systems. There was a reduction in aerobic species only in the biodigester, although there was no elimination in pathogens in any of the studied systems. The ineffectiveness of the applied treatments may be related to the contamination in the final stages of the treatment due to the animal presence or adjacent soil flow. It is suggested a disinfection process at the end of those systems in order to use the effluents to irrigate agricultural soils, avoid environmental contamination and therefore sanitary issues.

**KEYWORDS:** environmental risk, pathogen microorganisms, anaerobic treatments, microbial pollution, enterobacteria.



## INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial observado nas últimas décadas vem exigindo aumento na produção de alimentos e proteínas animais de boa qualidade. Tal situação contribuiu para alterações na suinocultura, como a adoção do sistema de criação intensiva. O sistema é executado em espaço físico reduzido e curto período de tempo, quando comparado com aqueles adotados para outras espécies de animais de médio e grande porte, como os bovinos (PAPPAS, 2013). Neste contexto, a suinocultura vem ganhando espaço no Brasil, o qual exporta tecnologia referente a esse setor. O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína no mundo, atrás apenas da China, Estados Unidos e União Europeia (ABIPECS, 2012).

As alterações tecnológicas na suinocultura impactaram diretamente na produção e despejo de dejetos de origem animal. O acúmulo de dejetos, produzidos em escala industrial, associados ao manejo inadequado, causam problemas ambientais ao solo e corpos hídricos. Assim, a destinação correta dos dejetos animais tornou-se fundamental para a diminuição dos riscos de contaminação ambiental (PERDOMO et al., 2003).

Os efluentes da suinocultura apresentam grande concentração de espécies químicas, que podem atuar como nutrientes na agricultura, como a principal estratégia usada na destinação final desses dejetos. Desta maneira, além de nutrir o solo, tal técnica apresenta baixo custo, reduz a utilização de adubos químicos e possibilita o uso sustentável dos recursos hídricos (PELISSARI, 2009).

Entretanto, o lançamento de dejetos animais no meio ambiente pode promover desequilíbrio dos nutrientes na água e solo, além de gerar excessos de alguns compostos químicos e também a disseminação de patógenos. Tais fatos colocam a suinocultura como potencial atividade poluidora e pode ser apontada como prática iniciadora de doenças infecciosas em animais e seres humanos. Assim, torna-se essencial a realização de controles microbiológicos dos resíduos e dos solos, nos locais de aplicação de águas residuárias de suínos na agricultura (OTABBONG et al., 2007).

A utilização de dejetos de origem animal na agricultura deve ser condicionada ao tratamento prévio adequado, conforme critérios técnicos para tal destinação. Estratégias têm sido propostas visando à remoção de compostos orgânicos e à inativação de patógenos, tais como tratamentos anaeróbicos e métodos de

desinfecção (COSTANTINI et al., 2007). Neste sentido, uma escolha equivocada pode causar alterações químicas, físicas e biológicas prejudiciais ao meio ambiente e seus ecossistemas (DOBLINSKI et al., 2010).

A opção por sistemas anaeróbicos no tratamento de dejetos suínos tem sido a escolha predominante em diversos países do Planeta. O tratamento anaeróbico pode ser realizado em sistemas com uso de bioesterqueiras ou de biodigestores (KUNZ et al., 2009). A destinação final de uma água residuária deve ser feita de modo a se avaliar o melhor método a ser empregado bem como a necessidade do uso de tratamentos secundários com ação sanitizante para a eliminação de patógenos (MASSÉ et al., 2011).

Diferentes estudos com sistemas de tratamento para dejetos de origem animal e humana têm sido realizados ao longo dos últimos anos, visando diminuir o possível impacto poluidor de resíduos sobre solos e águas superficiais e subterrâneas. Em relação aos dejetos de origem humana, a principal preocupação é a presença de patógenos lançados nos corpos hídricos, sem qualquer processo de desinfecção, os quais são causadores de possíveis surtos de doenças de origem microbiana (RAJINIKANTH et al., 2013). Todavia, historicamente, a preocupação com a utilização de dejetos de origem animal tem se limitado ao aspecto químico do ambiente, considerando sua contribuição na agricultura, lixiviação e salinização do solo (MAGGI et al., 2013).

Recentemente, o aspecto microbiológico vem chamando a atenção para estudos no que se refere à presença de microrganismos patogênicos no meio ambiente, principalmente àqueles oriundos de animais endotérmicos submetidos à criação intensiva. Em relação à suinocultura, poucos trabalhos relacionaram os diferentes sistemas de tratamento com a redução ou eliminação de patógenos. Os estudos se restringiram apenas aos microrganismos bioindicadores ou com poucos patógenos envolvidos, tais como *Listeria*, *Erisipelotrix* ou *Salmonella* (KUNZ et al., 2009; CORDERO et al., 2010).

Desta maneira, fica evidente que a suinocultura pode exercer forte impacto negativo no meio ambiente, especialmente sobre importantes corpos hídricos e pode gerar impactos socioeconômicos e sanitários graves em médio ou longo prazo. Assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar a composição microbiana na água residuária da suinocultura em relação aos principais microrganismos de origem gastrointestinal dos suínos associados aos principais sistemas de tratamento

utilizados no Brasil a fim de gerar informações que permitam estudos para determinar ações de planejamento para o desenvolvimento sustentável e uso racional de águas residuárias na agricultura.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Caracterização da área de estudo**

Este estudo foi realizado na região oeste do Paraná (Sul do Brasil), área essencialmente agropecuária, responsável por aproximadamente 12% da produção brasileira de grãos, com um dos maiores plantéis de aves de corte e rebanhos de suínos do Brasil. O setor agroindustrial é formado, principalmente, por cooperativas agrícolas e empresas privadas que buscam ganhos de produtividade, por meio de investimentos em tecnologias agropecuárias, e a implantação de um moderno parque agroindustrial, com incentivos governamentais (ABIPECS, 2012).

As principais atividades desenvolvidas nesta região, do ponto de vista econômico, giram em torno da agricultura (milho, soja e trigo), pecuária (bovinos, aves e suínos) e da agroindústria (laticínios e carnes processadas).

No entanto, esta região se localiza próxima a importantes áreas de proteção ambiental como o Parque Nacional do Iguaçu que inclui a Reserva Biológica de Itaipu. O Parque abriga o maior remanescente de floresta Atlântica (estacional semidecídua) da região Sul do Brasil. Possui uma rica biodiversidade, constituída por espécies representativas da fauna e flora brasileiras, das quais algumas ameaçadas de extinção, além de muitas outras de relevante valor e interesse científico. O Parque Nacional do Iguaçu é uma importante Unidade de Conservação, instituída como Sítio do Patrimônio Mundial Natural pela UNESCO. Este parque, unido pelo rio Iguaçu ao Parque Nacional Iguazú na Argentina, constitui o mais importante contínuo biológico do Centro-Sul da América do Sul, com mais de 600 mil hectares de áreas protegidas e outros 400 mil em florestas ainda primitivas (UNESCO, 2002).

A temperatura média anual da região é de 21 °C e apresenta as maiores temperaturas em fevereiro, com média de 28,5 °C e baixa em julho, com média de 13,3 °C. A precipitação média anual é de 1.900 mm, nos meses de dezembro a fevereiro com maior período de chuva que varia de 500 a 600 mm (IAPAR, 2014). A

precipitação máxima ocorre no verão (janeiro-março) e a mínima no inverno (junho-agosto). Segundo a classificação de Köppen, o clima é subtropical úmido (Cfa: úmido, subtropical, com verões quentes).

### Coleta das amostras

Amostras de água residuária da suinocultura (ARS) foram coletadas, no período de fevereiro a junho de 2013. Foram estudados períodos com diferentes características climáticas, em dois sistemas distintos de tratamento de dejetos animais: o primeiro foi composto de biodigestor e o segundo de esterqueira (Figura 1). O primeiro sistema de tratamento é proveniente de quatro propriedades que possuem um bio-sistema Integrado no tratamento de dejetos. A ARS coletada é tratada em um biodigestor, seguido de um tanque de sedimentação e lagoas facultativas. Nele foram coletadas amostras de efluentes provenientes de três pontos: caixa coletora, biodigestor e lagoa facultativa. O segundo sistema de tratamento é proveniente de quatro propriedades que possuem apenas esterqueiras. As amostras foram coletadas de efluentes, em dois pontos: da caixa coletora e da esterqueira. Todas as coletas foram realizadas em triplicata, totalizando 60 amostras de água residuária disponíveis para análise dos fatores ambientais e microbiológicos.

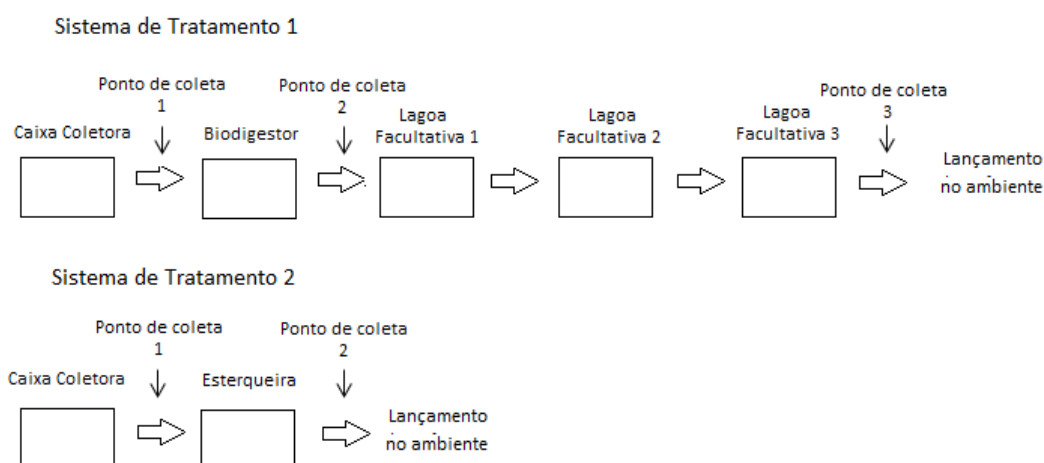


Figura 1: Sistemas de tratamento empregados na água residuária de suínos e seus respectivos pontos de coleta.

## **Fatores ambientais**

Fatores ambientais como pH (método eletrométrico, medidor de pH portátil HANNA ® HI 98127 (pHep®4) e temperatura (medidor de pH portátil HANNA ® HI 98501) foram mensurados, *in loco*, no momento da coleta (APHA, 2005). Em seguida, cada amostra de ARS foi acondicionada em frascos estéreis, refrigerada e encaminhada ao laboratório. As análises microbiológicas foram realizadas a partir de diluições seriadas em solução salina 0,9% até  $10^{-6}$ .

## **Fatores microbiológicos**

Os fatores microbiológicos avaliados foram: Bolor e Levedura; bactérias mesófilas aeróbias; coliformes totais; coliformes termotolerantes; *Escherichia coli*; *Listeria* spp.; *Enterococcus* spp.; *Staphylococcus* spp.; *Clostridium* spp.; *Salmonella* spp.; *Erysipelotrix* spp.; *Pseudomonas* spp.

As quantificações de bolores, leveduras e bactérias mesófilas aeróbias foram executadas de acordo com a metodologia de espalhamento em superfície (APHA, 2005). As análises foram feitas em triplicatas e usadas placas de Petri com Agar BDA, para bolores e levedura, e Agar PCA para mesofilos aeróbios. As contagens foram expressas em unidade formadora de colônias (UFC).

Os coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli* foram avaliados segundo a técnica de tubos múltiplos e pelo método do Número Mais Provável (NMP) em 100 mL de água residuária (APHA, 2005; SILVA et al., 2007). O teste presuntivo foi realizado com o meio Lauril Sulfato Triptose (LST) e incubado a 37 °C por 24 a 48 horas. Para a confirmação de coliformes totais, as alíquotas dos tubos com resultados positivos foram transferidas para tubos contendo Caldo Verde Brilhante (VB). Na confirmação de coliformes termotolerantes, as alíquotas foram transferidas para tubos contendo caldo *Escherichia coli* (EC) e incubadas a 45 °C por 24 horas. Alíquotas de tubos positivos foram semeadas em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e as colônias com características de *E. coli* foram submetidas às provas bioquímicas específicas.

Na caracterização de *Listeria* spp., alíquotas de 100 µL de cada amostra foram semeadas em triplicata, em placas de Petri contendo meio seletivo Agar *Listeria* (ALOA) e incubada a 35 °C por 24 horas (OTTAVIANI et al., 1997). O

resultado foi considerado positivo para crescimento de *Listeria* quando as colônias apresentaram coloração azul.

Os *Enterococcus* spp. foram isolados conforme a metodologia descrita por Silva et al. (2007). A partir das diluições decimais, alíquotas de 100 µL foram transferidas para dois tubos por amostra, contendo caldo Azida e incubadas a 35 °C por 24 horas. A semeadura foi realizada em duplicata dentre as amostras que apresentaram crescimento, em meio seletivo Agar Pfizer (AP) e incubadas a 35 °C por 24 horas. As colônias com coloração típicas foram submetidas às provas bioquímicas específicas.

O isolamento de *Staphylococcus* spp. foi feito com semeadura em placas contendo Agar Baird Parker (BP), em triplicatas por amostra, e incubadas a 35 °C por 24 horas. As colônias típicas foram transferidas para tubos contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e acondicionadas em estufas a 37 °C por 24 horas. Em seguida, foram realizadas provas bioquímicas específicas (APHA 2005; SILVA et al., 2007).

Alíquotas de 100µL foram transferidas das amostras para dois tubos, por amostra a fim de isolar o *Clostridium* spp., contendo Caldo DRCM e incubados em anaerobiose a 35 °C por 48 horas. Os tubos com meio enegrecido foram considerados positivos (SILVA et al., 2007). Nos tubos positivos ou duvidosos, alíquotas foram transferidas para tubos contendo meio Leite Tornassolado (Litmus Milk- LM) e incubados a 35 °C por 48 horas em anaerobiose (SILVA et al., 2007). As amostras positivas apresentaram coloração rosa e formação de gás.

A *Salmonella* foi isolada através dos meios de cultura Caldo Selenito (CS) e Caldo Rappaport (CR). Em seguida, foi realizada a semeadura em três placas por amostra, contendo Agar SS e Agar Verde Brilhante. As colônias características foram submetidas a provas bioquímicas pelo Kit de Enterobactérias (Laborclin) (SILVA et al., 2007).

O método usado para isolamento e identificação de *Erysipelotrix* spp. foi descrito por Hassanein (2001). Dois mililitros da amostra foram inoculados em tubos contendo 10 mL de meio seletivo Caldo Violeta (CV), modificado (37mg/ml de BHI – 0,1% de Tween 80, 0,1% de azida sódica, 0,020 mg/ml de gentamicina, 3,0 mg/ml de tris e 0,001% de cristal violeta) e incubados a 37 °C por 48 horas. Após esse período, foi realizada a semeadura em placas contendo Agar sangue e incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, foi verificada a presença de colônias pequenas e transparentes.

O isolamento e a identificação de *Pseudomonas* foram realizados em Caldo Acetamida. A partir dos tubos positivos, a semeadura foi realizada em placas contendo Agar Leite. A confirmação ocorreu com o crescimento de colônias características para *Pseudomonas* spp. bem como a hidrólise do leite no ágar. Foi realizada contagem de acordo com o método de NMP para quantificação de *Pseudomonas* spp. (SILVA et al., 2007).

### **Análise estatística**

Os fatores ambientais e microbiológicos foram analisados através do teste de média T *student* ( $p < 0,05$ ), o qual foi aplicado na comparação das médias observadas entre dois grupos de amostras independentes que abrangem os resultados das etapas dos sistemas de tratamentos estudados (Figura 1).

Devido à grande amplitude dos valores alcançados, visando estabilizar a variância, os dados foram transformados em log de base 10 ( $\text{Log}_{10}$ ), exceto para as variáveis pH e temperatura. Em seguida, foi realizado o autoescalamento de todas as variáveis. Para avaliar a associação entre as diferentes variáveis e evidenciar a participação individual dos fatores ambientais e microbiológicos nas diferentes etapas de tratamento, foi realizada a análise de componentes principais (PCA) com os parâmetros analisados nos diferentes estágios de cada tratamento anaeróbico. Em complementação à análise estatística multivariada, realizou-se a análise de agrupamento. A medida de dissimilaridade foi feita pelo coeficiente de Pearson em função da correlação. As análises multivariadas foram realizadas com o *software Statistica* (2005), através dos componentes principais e análise de agrupamentos.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Análises microbiológicas dos sistemas de tratamento**

Os valores médios dos fatores ambientais e microbiológicos avaliados nos diferentes sistemas de tratamento de água residuária estão apresentados na Tabela 1. A temperatura e pH são variáveis que exercem forte influência sobre o metabolismo e a viabilidade de microrganismos. Estas variáveis, nos diferentes pontos de coleta dos dois sistemas de tratamento avaliados, apresentaram valores de temperatura entre

23,5-26,5 °C, e de pH entre 6,0-7,5, não apresentam diferença significativa em ambas as variáveis a 5% de significância.

Tabela 1. Teste de média para os parâmetros dos microrganismos avaliados nos diferentes sistemas de tratamento

Fatores ambientais e microbiológicos	Sistema de Tratamento 1 Biodigestor			Sistema de Tratamento 2 Esterqueira	
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
pH	7,2 A	7,7 A	6,7 A	6,8 a	6,3 a
temperatura	23,6 A	24,7 A	24,9 A	24,5 a	22,5 a
<i>Pseudomonas</i> spp.	23,0 A	17,8 AB	12,1 B	1,9 x 10 <sup>3</sup> a	6,8 x 10 <sup>2</sup> b
bolor e levedura	5,9 x 10 <sup>4</sup> A	1,3 x 10 <sup>3</sup> B	0,0 B	1,2 x 10 <sup>6</sup> a	7,1 x 10 <sup>3</sup> b
mesofilos aeróbios	4,4 x 10 <sup>3</sup> A	4,3 x 10 <sup>2</sup> B	4,6 x 10 B	2,3 x 10 <sup>4</sup> a	2,1 x 10 <sup>3</sup> b
coliformes totais	6,1 x 10 <sup>4</sup> A	6,1 x 10 <sup>4</sup> A	6,1 x 10 <sup>4</sup> A	2,4 x 10 <sup>3</sup> a	2,4 x 10 <sup>3</sup> a
coliformes termotolerantes	6,1 x 10 <sup>4</sup> A	6,1 x 10 <sup>4</sup> A	2,8 x 10 <sup>4</sup> A	2,4 x 10 <sup>3</sup> a	2,4 x 10 <sup>3</sup> a
<i>Listeria</i> spp.	9,4 x 10 <sup>8</sup> A	7,6 x 10 <sup>5</sup> A	2,3 x 10 <sup>3</sup> A	8,1 x 10 <sup>6</sup> a	4,6 x 10 <sup>4</sup> b
<i>Staphylococcus</i> spp.	2,1 x 10 <sup>5</sup> A	9,8 x 10 <sup>3</sup> A	3,1 x 10 <sup>5</sup> A	1,3 x 10 <sup>4</sup> a	5,3 x 10 <sup>3</sup> a

Letras diferentes correspondem às médias estatisticamente diferentes (p<0,05) dentro de cada sistema de tratamento, quanto à contagem de microrganismos. Letras maiúsculas correspondem ao sistema de tratamento 1 e letras minúsculas ao sistema 2.

Unidades: *Pseudomonas*; bolor e levedura; mesofilos aeróbios e *Listeria* (unidades formadoras de colônia –UFC); coliformes totais; coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* (número mais provável- NMP); temperatura (Graus Celsius)

A temperatura de 25 °C contribui para a viabilidade dos microrganismos pesquisados, porém, está distante de valores que estimulam a produção de proteínas letais. Assim, a produção de proteínas de estresse oxidativo pelos microrganismos aumenta à medida que a temperatura aumenta e se aproxima dos limites da faixa de valores ótimos, aproximadamente 37 °C. Já as baixas temperaturas diminuem o metabolismo microbiano e são responsáveis pela manutenção de grande diversidade microbiana no ambiente por período prolongado (MURRAY & GRZYMSKI, 2007).

Tendo em vista que os microrganismos isolados e identificados são classificados como mesofilos (temperatura) e neutrófilos (pH), os valores dessas variáveis ambientais, detectados no momento da coleta da ARS, não propiciam qualquer estresse metabólico aos microrganismos. Portanto, as faixas de temperatura e pH observadas neste trabalho permitiram a viabilidade dos microrganismos por um período maior do que o tempo de retenção hídrica dos sistemas de tratamento aplicados às propriedades avaliadas.



Em relação ao sistema de tratamento 1, apenas no último estágio de tratamento houve eliminação de bolores e leveduras. Além disto, não se observou a eliminação de quaisquer dos gêneros ou grupos bacterianos analisados.

É importante observar que, apesar deste sistema de tratamento não eliminar os microrganismos bacterianos, houve diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo dos aeróbios estritos ao longo dos diferentes estágios de tratamento (Tabela 1). No grupo dos anaeróbios estritos e facultativos, não houve diferença significativa para os coliformes, uma vez que são microrganismos anaeróbios facultativos, quantificados em valores elevados e as propriedades não possuem isolamento da área, com possibilidade de contaminação contínua das lagoas por lixiviação do solo adjacente. Contudo, observou-se aumento na contagem dos gêneros *Listeria* e *Staphylococcus*. Os resultados podem ser explicados pelas diferenças tecnológicas nos tratamentos e nas condições ambientais empregadas nas fazendas. Ademais, a sobrevivência de microrganismos pode ser afetada por diversos fatores, tais como variações da temperatura, concentração de sólidos totais, tempo de retenção hídrica, concentração de ácidos graxos voláteis e pH (CARRINGTON et al. 1982).

As análises das amostras provenientes do sistema de tratamento 2 também apresentaram redução significativa para os microrganismos aeróbios nas diferentes etapas (Tabela 1). Por outro lado, nesse caso, não foi observada a eliminação de bolores nem de leveduras, apenas redução significativa ( $p < 0,05$ ). Bolores e leveduras são microrganismos mais resistentes do que os grupos microbianos, principalmente em relação à variação de pH. O sistema empregado não apresentou condições de fermentação favorável para eliminação de microrganismos esporuláveis e resistentes como os bolores.

Em relação ao grupo dos anaeróbios estritos e facultativos, não houve diferença significativa ao longo do tratamento. Desta maneira, o processo de tratamento dos resíduos da suinocultura em sistemas secundários não foi capaz de eliminar os grupos analisados. Os resultados de Ramirez et al. (2005) corroboram os dados deste estudo, com valores semelhantes para bactérias entéricas, sem diminuição significativa ao longo dos diferentes estágios de tratamento. A permanência dessas bactérias na ARS pode ser explicada por um ingresso contínuo de material no sistema, além da possibilidade de contaminação devido a fatores externos como equipamentos, utensílios contaminados, animais, alimentos, água e antrópico.

É importante observar que, apesar das amostras avaliadas serem provenientes de granjas sem histórico de notificação de doenças ou de isolamentos de patógenos, diversas espécies de microrganismos foram identificadas com potencial patogênico nos diferentes estágios dos dois sistemas de tratamento: *Salmonella enterica* (90% das amostras), *Clostridium perfringens* (80%), *Enterococcus faecalis* (100%), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (85%) e *Escherichia coli* (100%).

Em relação à *Salmonella enterica*, o alto percentual de isolamento observado neste estudo foi semelhante ao relatado por Letellier et al. (1999), que isolaram esse agente em 100% das amostras de resíduos provenientes de fazendas de suinocultura, a qual foi obtida sob clima temperado e alto nível tecnológico de manejo. A alta incidência deste microrganismo nas amostras analisadas demonstra prevalência desse patógeno na área estudada. E pode estar associada a diversos fatores como: manejo inadequado dos animais, baixa qualidade de alimentos ou água dispensados aos animais bem como pelo precário programa de erradicação de salmonelose.

A associação desses fatores é responsável pela presença do referido patógeno em distintas localidades no mundo, independente de suas características socioeconômicas ou ambientais. A *Salmonella* spp. pode sobreviver por período prolongado em excretas líquidas quando associada a fatores ambientais favoráveis. Considerando que esse microrganismo também poder ser excretado no ambiente por animais saudáveis, a eliminação do dejetos pode ser fonte de contaminação ambiental, principalmente nos primeiros dias do despejo.

Neste estudo, todos os isolados de *Salmonella* (100%) foram identificados como *Salmonella enterica*. Os dados estão de acordo com diversos trabalhos publicados (RAMIREZ et al., 2005; CORDERO et al., 2010). O risco ambiental se torna maior, tendo em vista a proximidade de aviários às granjas de suínos onde a ARS foi coletada. Desta forma, a dispersão de *Salmonella* sp. pode ocasionar além de danos à saúde dos animais e humanos, impacto econômico na indústria de aves da região.

O isolamento de *Clostridium perfringens* em 80% das amostras indica alta concentração desse microrganismo na ARS, pois estudos comprovam a dificuldade de isolamento do mesmo, somente relatado quando presente em grande concentração no dejetos animal (STRAUCH e BALLARINI, 1994). Apesar de Mc Laughlin et al. (2012) documentarem alta incidência desse patógeno em lagoas de estabilização de dejetos da suinocultura, os valores aqui obtidos são geralmente maiores do que os da

literatura. Cordero et al. (2010) identificaram e isolaram esse agente em apenas 6,6% das amostras analisadas. O *Clostridium perfringens* é resistente ao ambiente e comumente isolado de dejetos provenientes do trato gastrointestinal de animais endotérmicos, além de ser utilizado como indicador de origem fecal em água.

O *Erysipelothrix rhusiopathiae* foi isolado em 80% das amostras em todas as fazendas avaliadas. Os valores podem ser considerados elevados quando comparados aos estudos com tais microrganismos que relatam baixo ou nenhum isolamento. As diferenças observadas nos resultados deste estudo, em relação ao *Erysipelothrix rhusiopathiae*, e os dados da literatura podem estar relacionados às diferenças nas condições em que os dejetos estão expostos no sistema de drenagem, o contato com desinfetantes e a vazão do sistema de tratamento (CORDERO et al., 2010). O *Erysipelothrix rhusiopathiae* é frequentemente relacionado aos suínos e pode sobreviver por 20 dias ou mais no ambiente e até seis meses em dejetos suínos. Além disto, pode ser considerado causador de importante zoonose, pela contaminação de animais que tenham acesso a este microrganismo após aplicação de ARS no campo.

Os resultados deste estudo em relação à prevalência de *Enterococcus faecalis* foram os esperados, já que o trato gastrointestinal de suínos é citado como reservatório natural de *Enterococcus faecalis*. Desta maneira, justifica a eliminação do mesmo nas fezes como fonte de infecção para outros animais e seres humanos. Os resultados aqui descritos estão de acordo com o estudo de Masse et al. (2011), cujas contagens de *Enterococcus faecalis* em dejetos de suínos foram acima de  $10^4$  ufc, sem diminuição significativa ao longo do tratamento de digestão anaeróbia.

Diante dos resultados, observa-se que a fração líquida de dejetos de suínos é capaz de transportar e garantir a sobrevivência de diferentes patógenos entéricos. Sua presença em níveis elevados associada ao manejo inadequado nas granjas de suínos, tais como isolamento precário das lagoas facultativas, falta de respeito ao tempo de retenção da ARS nas etapas de tratamento e a capacitação deficiente dos funcionários, denota o risco de contaminação ambiental pela utilização da ARS.

Apesar da carência de estudos que comprovem surtos de doenças com origem microbiana, ocasionadas por despejo de dejetos da suinocultura no meio ambiente, o isolamento de patógenos neste tipo de resíduo gera indícios de que isto possa ocorrer. Assim, como este estudo, outras pesquisas vêm demonstrando a presença de patógenos em corpos d'água, próximos aos locais de criação animal utilizado para diferentes finalidades (RODRIGUEZ & ARAÚJO, 2010). Estudos com patógenos

em relação ao perfil de resistência a antimicrobianos revelam diferentes perfis de resistência (dados não apresentados), incluindo bactérias multirresistentes (Anexo 1).

### **Análises multivariadas dos parâmetros estudados**

A relação entre os parâmetros microbiológicos e os fatores ambientais (pH e temperatura) nos diferentes estágios dos sistemas de tratamentos anaeróbicos foi realizada através da análise de componentes principais (PCA). Houve redução no número de variáveis e fornecimento de visão estatisticamente privilegiada do conjunto de dados. Assim, foram obtidos quatro componentes principais (CP), que representam 91% da informação do conjunto original de dados (Tabela 2). Os demais componentes podem ser negligenciados, pois não apresentaram influência significativa a 5% de similaridade (FURTADO, 1996; JOHNSON & WICHERN, 1999).

Tabela 2. Análise de componentes principais dos parâmetros microbiológicos associados aos ambientais

	ANÁLISE			
	CP1	CP2	CP3	CP4
Autovalor	3,45	2,45	1,37	0,91
Proporção	0,38	0,27	0,15	0,10
Acumulada	0,38	0,65	0,80	0,91
<i>Pseudomonas</i> spp.	0,799 *	-0,005	0,538	0,025
bolor e leveduras	0,746 *	-0,628 *	-0,079	0,086
mesofilos aeróbios	0,766 *	-0,538	-0,020	-0,133
coliformes totais	-0,660 *	-0,644 *	-0,301	0,049
coliformes termotolerantes	-0,630 *	-0,673 *	-0,299	0,073
<i>Listeria</i>	0,484	-0,755 *	0,295	-0,104
<i>Staphylococcus</i> spp.	-0,432	-0,332	0,427	-0,686 *
pH	-0,043	-0,284	0,729 *	0,598
temperatura	-0,645 *	-0,378	-0,296	0,192

\* Variáveis significativas com índices absolutos maiores que 0,6.

A CP1 conseguiu desdobrar os pontos dos sistemas do tratamento 1 (pontos 1, 2 e 3) e do sistema do tratamento 2 (pontos 4 e 5). O sistema de tratamento com biodigestor (sistema 1) teve maior representatividade com microrganismos indicadores de poluição de origem gastrointestinal, com os vetores demonstrando forte influência dos grupos dos coliformes totais e termotolerantes (Figura 2). A presença dos coliformes era esperada, uma vez que são grupos de bactérias pertencentes à família enterobacteriaceae, eliminadas em grande número pelas fezes dos animais.

O sistema de tratamento com bioesterqueira (sistema 2) foi influenciado por microrganismos do grupo dos bolores e leveduras, mesófilos aeróbios e *Pseudomonas*, o que demonstra baixa eficácia no tratamento de microrganismos anaeróbios ou aeróbios facultativos. Em relação à CP2 (Figura 2), o vetor demonstra forte influência dos coliformes totais, termotolerantes e *Listeria*. Os maiores valores absolutos desses microrganismos estão associados aos pontos de coleta bruto (ponto 1 para o sistema 1; ponto 4 para o sistema 2), com discreto decréscimo ao longo das etapas de ambos os sistemas de tratamento.

Desta forma, não houve diferenças significativas ao longo dos processos de tratamento, possivelmente por se tratarem de microrganismos facultativos em sistemas de tratamentos anaeróbios. O CP3 representou 15% na variação total dos dados e foi influenciado principalmente pelo pH. O decréscimo observado entre os pontos iniciais e finais dos sistemas de tratamento 1 e 2 (Tabela 1) não foi suficiente para interferir significativamente no metabolismo dos microrganismos. O CP4 representa 10% da variação total dos dados, influenciado principalmente por *Staphylococcus*. Nos dois sistemas de tratamento, não houve redução significativa desses microrganismos. Tais microrganismos estão relacionados a surtos de doenças transmitidas por alimentos e água em locais onde ocorrem descargas de dejetos sem tratamento adequado (GANDHI & CHIKINDAS, 2007; LOIR et al., 2003).

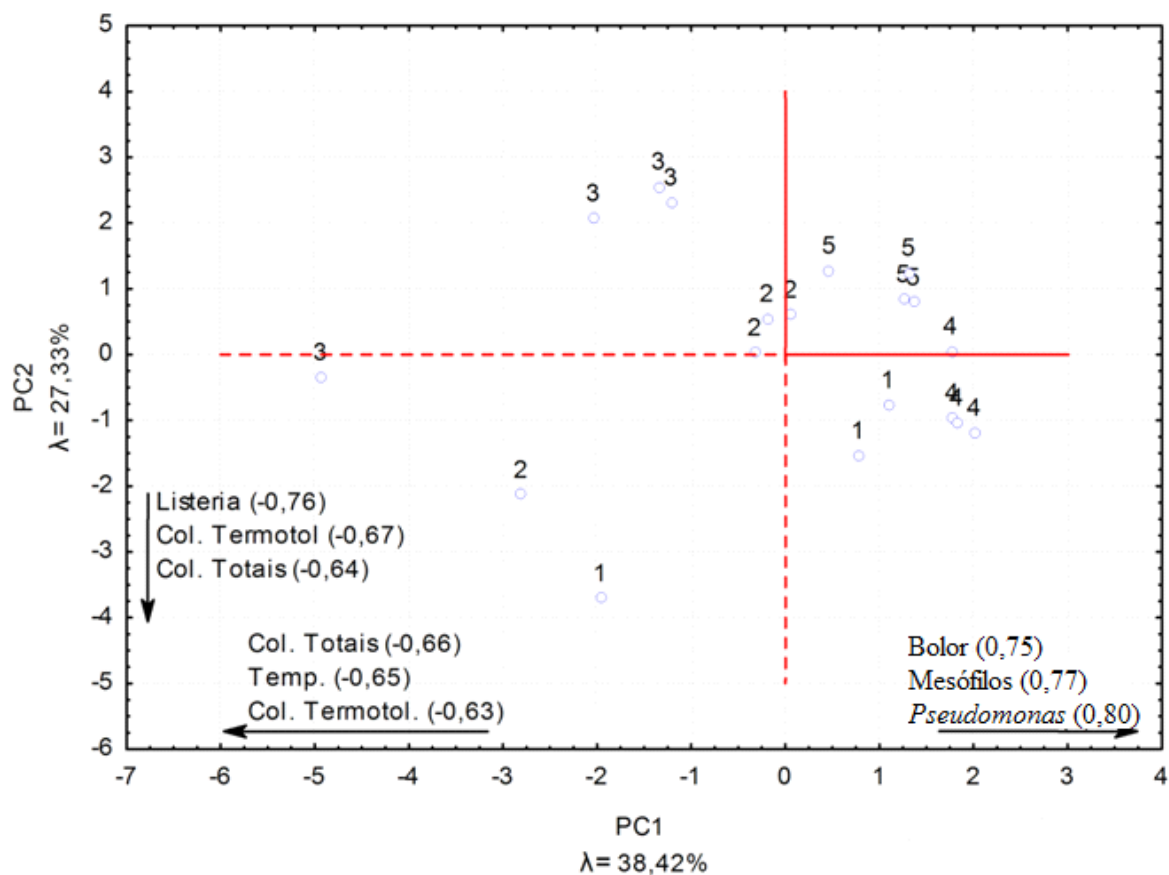


Figura 2. Gráfico das variáveis microbiológicas e ambientais e pontos de coleta dos sistema 1 (pontos 1, 2 e 3) e sistema 2 (pontos 4 e 5), em relação aos dois primeiros componentes de variação: eixo X (componente 1) e eixo Y (componente 2).

Os dados foram submetidos à análise de agrupamento com a finalidade de aproximar variáveis de maior semelhança entre si, em relação aos fatores microbiológicos e ambientais nas diferentes etapas dos sistemas de tratamento 1 e 2. A análise permitiu complementar, de maneira eficiente, os resultados obtidos com o uso da PCA, observando similaridade entre os grupos formados na análise de agrupamento com os CPs (Figura 3).

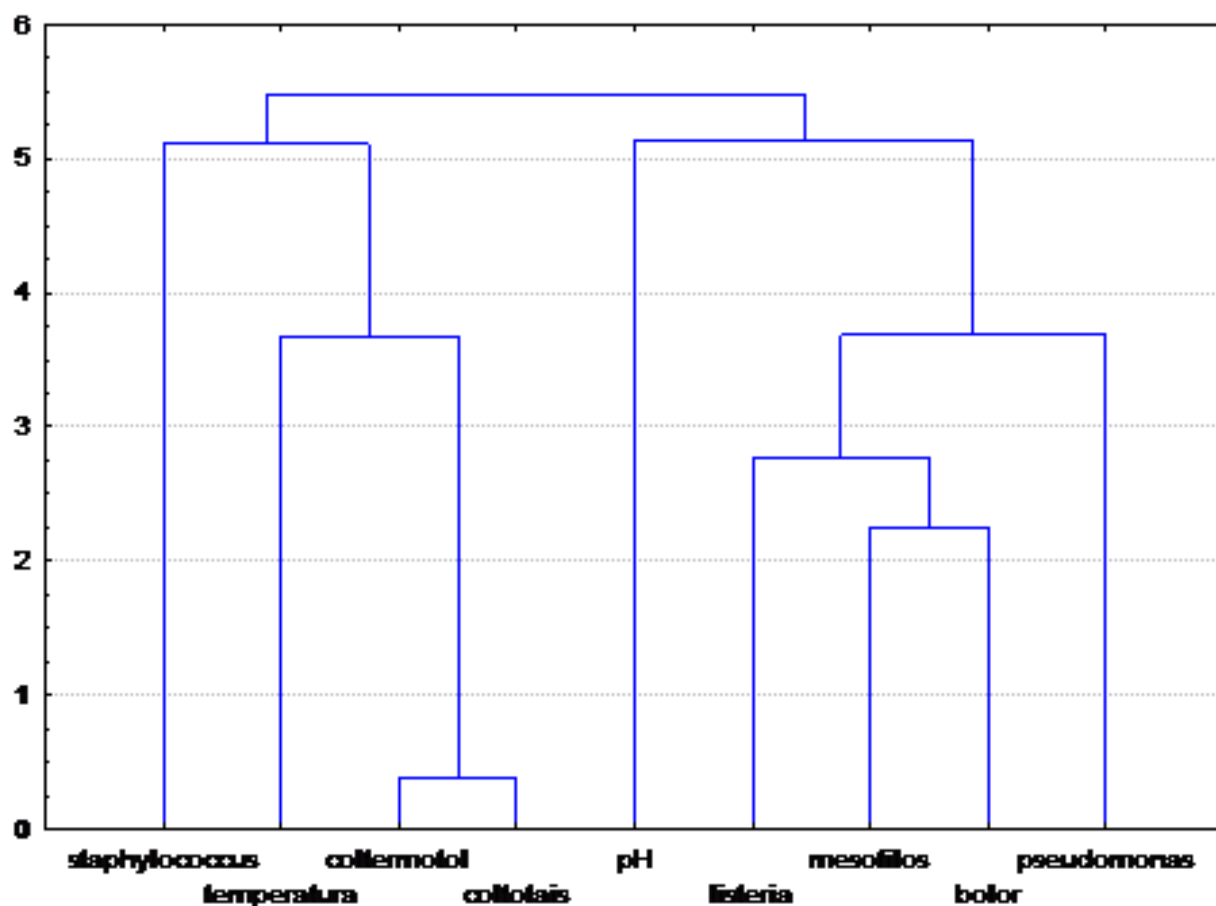


Figura 3. Dendrograma de dissimilaridade pelo Método de Ward, baseado na distância euclidiana entre os parâmetros ambientais e microbiológicos

Na Figura 3 está representado o dendrograma obtido pela análise de agrupamento, em que estão representados os valores da proporção de dissimilaridade. A 55% de dissimilaridade (45% de similaridade) possibilitou a formação de dois grupos, constituídos pelas variáveis analisadas nas diferentes estações de tratamento de ARS.

O grupo I é composto pelas variáveis coliformes totais, coliformes termotolerantes, temperatura e *Staphylococcus*. As variáveis coliformes totais e termotolerantes apresentam elevado nível de similaridade (99%). Esse resultado se explica, pois as mesmas apresentam-se altamente relacionadas. Pertence à mesma família de microrganismos, além de possuírem a mesma origem do trato gastrintestinal de animais endotérmicos. A temperatura observada nas amostras apresentou maior similaridade com os coliformes e contribuiu para a manutenção e viabilidade desses microrganismos nos dejetos suínos. O grupo II é formado pelas variáveis mesofilos aeróbios, *Pseudomonas*, *Listeria*, bolor e levedura e pH. A maior

similaridade foi observada entre os mesófilos aeróbios e bolores. Pode estar associada ao fato de tais microrganismos serem aeróbios. A proximidade entre *Listeria*, mesófilos e bolores pode estar relacionada ao fato de a *Listeria* ser microrganismo aeróbico facultativo.

## **CONCLUSÕES**

A ARS pode conter microrganismos patogênicos provenientes do trato gastrointestinal dos animais, mesmo sem sinais clínicos de doenças e condições ambientais permitem a sobrevivência dos microrganismos, mesmo em tratamento anaeróbicos.

Os sistemas de tratamento avaliados foram ineficazes na eliminação dos microrganismos indicadores e patógenos de origem do trato gastrointestinal de suínos.

A presença e multiplicação de microrganismos no ambiente dependem da associação do sistema de tratamento com outras ações sanitizantes mais efetivas para cada grupo de microrganismo;

Os resultados deste trabalho demonstram o risco de contaminação ambiental na utilização de ARS na fertirrigação, com possibilidade de dispersão de patógenos provenientes deste tipo de dejetos no meio ambiente próximos às criações de suínos.



## LITERATURA CITADA

- APHA. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 ed. Washington: APHA, AWWA, WEF, 2005.
- ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Relatório 2012 da suinocultura Industrial. Disponível em <[www.abipecs.org.br](http://www.abipecs.org.br)> Acessado em set de 2012.
- Bååth, E.; Anderson, T.H. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology & Biochemistry*. 35:955–963, 2003.
- Baroni, S.; Soares, I. A.; Barcelos, R. P.; Moura, A. C.; Pinto, F.G.S.; Rocha, C.L.M.S.C.A. Microbiological Contamination of Homemade Food, Food Industry, Dr. Innocenzo Muzzalupo (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/53170. Available from: <http://www.intechopen.com/books/food-industry/microbiological-contamination-of-homemade-food>. 2013.
- Carrington, E. G.; Harman, A.; Pike E. B. Inactivation of *Salmonella* during anaerobic digestion of sewage sludge. *Journal of Applied Bacteriology* 1982; 53: 331-334.
- Cordero, A. Bacteriological characterization of wastewater samples obtained from a primary treatment system on a small scale swine farm. *Bioresource technology*. 101 (9):2938–44, 2010.
- Costantini, V. P.; Azevedo, A. C.; Li, X.; Williams, M. C.; Michel, F. C.; Saif, L. J. Effects of different animal waste treatment technologies on detection and viability of porcine enteric viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5284–5291, 2007.
- Demoling, F.; Nilsson, L. O.; Bååth, E. Bacterial and fungal response to nitrogen fertilization in three coniferous forest soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 40:370–379, 2008.
- Doblinski, A. F.; Sampaio, S. S.; Nóbrega, L. H.; Gomes, S. D.; Dal Bosco, T. C. Nonpoint source pollution by swine farming wastewater in bean crop. *Engenharia Agrícola e Ambiental*. 14 (1):87–93, 2010.
- Gandhi M; Chikindas M. L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol.* 113:1–15, 2007.
- IAPAR. Instituto Agronômico do Paraná. Cartas climáticas do estado do Paraná. Londrina. IAPAR, 2014.

- Johnson, R. A.; Wichern, D. W. Applied Multivariate statistical analysis, 4. ed., Rio de Janeiro: Prentice-Hall. 816p, 1999.
- Korting, H.C.; Lukacs, A.; Vogt, N.; Urband, J.; Ehret, W.; Ruckdeschel, G. Influence of the pP-value on the growth of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Propioni bacterium acnes* in continuous culture. *ZblHyg.* 193:78-90, 1992.
- Kunz, A.; Miele, M.; Steinmetz, R.L.R. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. *Bioresour. Technol.* 100:5485–5489, 2009.
- Lauber, C. L.; Strickland, M. S.; Bradford, M. A.; Fierer, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology & Biochemistry.* 40:2407–2415, 2008.
- Letellier, A.; Messier, S.; Paré, J.; Ménard, J.; Quessy, S. Distribution of Salmonella in swine herds in Québec. *Veterinary Microbiology.* 67:299-306, 1999.
- Loir, Y.; Baron, F.; Gautier, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res.* 2:63–76, 2003.
- Maggi, C. F.; Freitas, P. L.; Sampaio, S. C.; Dieter, J. Impacts of the application of swine wastewater in percolate and in soil cultivated with soybean. *Engenharia Agrícola (Online).* 33:279-290, 2013.
- Markošová, R.; Ježek, J. Indicator bacteria and limnological parameters in fish ponds. *Water Research.*, 28 (12): 2477-2485, 1994.
- Massé, D.; Gilbert, Y.; Topp, E. Pathogen removal in farm-scale psychrophilic anaerobic digesters processing swine manure. *Bioresource Technology.* 102, (2):641-646, 2011.
- Matthies, C.; Erhard, H. P.; Drake, H. L. Effects of pH on the comparative culturability of fungi and bacteria from acidic and less acidic forest soils. *Journal of Basic Microbiology.* 37: 335–343, 1997.
- Mclaughlin, M. R.; Brooks, J. P.; Adeli, A. Temporal flux and spatial dynamics of nutrients, fecal indicators, and zoonotic pathogens in anaerobic swine manure lagoon water. *Water research.* 46 (16):4949–60, 2012.
- Murray, A.; Grzymski, J. Diversity and genomics of Antarctic marine microorganisms. *Philos Trans R Soc. Lond B Biol. Sci.* 362:2259–2271, 2007.
- Ottabong, E.; Arkhipchenko, I.; Orlova, O.; Barbolina, I.; Shubaeva, M. Impact of piggery slurry lagoon on the environment: A study of groundwater and rive Igolinka

at the Vostochnii Pig Farm, St Petersburg, Russia. *Acta Agriculture Scandinavica* Section B-Soil and Plant Science. 2007.

Ottaviani, F., Ottaviani, M., Agosti, M. Differentialágar medium for *Listeria monocytogenes*. In: Quimper Froid Symposium Proceedings. 16–18, 1997.

Pappas, G. Socio-economic, industrial and cultural parameters of pig-borne infections. Institute of Continuing Medical Education of Ioannina, Ioannina, Greece Clinical Microbiology and Infection. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2013.

Pelissari, R. A. Z.; Sampaio, S. C.; Gomes, S. D.; Crepalli, M. S. Lodo têxtil e água residuária da suinocultura na produção de mudas de *Eucalyptusgrandis* (W, Hill exMaiden). *Engenharia Agrícola*. 29:288-300, 2009.

Perdomo, C. C.; Oliveira, P. A. V.; Kunz, A.; Sistemas de tratamento de dejetos suínos: Inventário Tecnológico. Embrapa Suínos e Aves, Documentos, n. 85. Concórdia, 2003.

Petkov G. S.; Kostadinova G. S.; Denev S. A.; Mihaylova G. S.; Pavlov, D. C. Microbial pollution of soil around slurry storage lagoons at a pig-farm. *Applied Soil Ecology*. 34(1):10-18, 2006.

Pires, A.; Martinho, G.; Chang, N. B. Solid waste management in European countries: A review of systems analysis techniques. *Journal of Environmental Management*. 92(4):1033-1050, 2011.

Rajinikanth, R.; Lim, J. W.; Mao, Y.; Chen, C. L.; Wang, J. Y. Anaerobic co-digestion of source segregated brown water (feces-without-urine) and food waste: For Singapore context. *Science of the Total Environment*. 443: 877-886, 2013.

Ramírez, G.; Martínez, R.; Herradora, M.; Castrejón, F.; Galván, E. Isolation of *Salmonella* spp. from liquid and solid excreta prior to and following ensilage in ten swine farms located in central México. *Bioresour. Technol*. 96, 587–595, 2005.

Ricca, D. M.; Ziemer, C. J.; Kerr, B. J. Changes in bacterial communities from swine feces during continuous culture with starch. *Anaerobe*.16 (5):516–21, 2010.

Rodriguez, S.; Araujo, R. Occurrence of Thermotolerant *Campylobacter* species insurface Waters of a Mediterranean area and in its prevailing pollution sources. *Journ. Appl. Microbiology*, (3), 2010.

Rohlf F. J. NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. Manual. Applied Biostatistics, New York, USA. 2000.

Rousk, J.; Brookes, P. C.; Bååth, E. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggests functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:1589–1596, 2009.

Rousk, J.; Brookes, P. C.; Bååth, E. Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 42 (6): 926–934, 2010.

Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A.; Taniwaki, M. H.; Santos, R. F. S.; Gomes, R. A. R.; Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. Livraria Varela, São Paulo, 3ª edição. 2007.

StatSoft, Inc. (2005). STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

UNESCO. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. 25th Session of the WHC. WHC-01/CONF.208/24. 8, 2002.

Viancelli, A.; Kunz, A. Performance of two swine manure treatment systems on chemical composition and on the reduction of pathogens. *Chemosphere*. 90, (4):1539–44, 2013.

# **ARTIGO 2**

**EFEITOS DE LONGO PRAZO DA ASSOCIAÇÃO DE ÁGUA  
RESIDUÁRIA DA SUINOCULTURA E ADUBAÇÃO MINERAL SOBRE A  
MICROBIOTA DO SOLO**

## **EFEITOS DE LONGO PRAZO DA ASSOCIAÇÃO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DA SUINOCULTURA E ADUBAÇÃO MINERAL SOBRE A MICROBIOTA DO SOLO**

**RESUMO:** A aplicação de água residuária de suinocultura em solos agrícolas pode gerar impactos na comunidade bacteriana do solo quando realizada em longo prazo. O objetivo deste trabalho foi avaliar possíveis alterações na comunidade microbiana do solo após oito anos de aplicação contínua de água residuária de suinocultura. As doses de água residuária aplicadas desde o início do experimento foram 0; 100; 200 e 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>, combinadas com adubações na semeadura (com e sem adição da adubação recomendada). No solo, foram feitas três coletas em cada parcela para a determinação da respiração basal, biomassa microbiana e quociente metabólico, análise de DGGE, correlação entre as condições químicas do solo e atividade microbiana na comunidade bacteriana do solo. Alterações significativas na estrutura da comunidade microbiana do solo com a aplicação de água residuária de suinocultura foram observadas. Doses maiores de ARS (200 e 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) influenciaram de forma significativa e privilegiaram a permanência de alguns grupos específicos de bactérias em detrimento de outros.

**PALAVRAS-CHAVE:** dejetos suínos, diversidade bacteriana do solo, reúso de água, biomassa microbiana, respiração basal.

## LONG-TERM EFFECTS OF SWINE WASTEWATER IN ASSOCIATION WITH MINERAL FERTILIZER ON SOIL MICROBIOTA

**ABSTRACT:** Swine wastewater application in cropping areas may impact on soil microbial community when managed for a long term. Thus, this study aimed at evaluating possible changes in soil microbial community along eight years of continuous application of swine wastewater. The wastewater rates (0; 100; 200 and 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) have been applied during eight years since the beginning and were associated with two fertilizations at sowing (with and without the recommended fertilization). Three samples of soil were collected from each trial plot to determine basal respiration, microbial biomass and metabolic quotient, DGGE analysis, biodiversity indices, correlation between soil chemical conditions and microbial activity on soil microbial community. Significant changes were observed in the structure of soil microbial community with swine wastewater application. Higher doses of SWW (200 and 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) influenced more significantly, favoring the permanence of specific groups of microorganisms rather than diversity.

**KEYWORDS:** swine manure, bacterial diversity on soil, water reuse, microbial biomass, basal respiration.

## INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e as alterações climáticas constatadas nas últimas décadas vêm contribuindo para a busca de novos métodos e técnicas que minimizem o consumo e maximizem o uso da água enquanto recurso natural. Alternativas sustentáveis são necessárias, principalmente em setores como a agricultura em que a demanda hídrica é bem maior do que nos setores industriais e urbanos. A utilização de águas residuárias da criação animal na irrigação possibilita a conservação dos recursos hídricos, melhora a qualidade do solo em longo prazo e reduz custos de fertilização (SAMPAIO et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011; MAGGI et al., 2013; BATISTA et al., 2014).

Porém, como qualquer técnica não consolidada, o uso de águas residuárias de origem animal pode gerar efeitos indesejáveis na composição física, química e biológica do meio ambiente. Dentre os fatores citados, o biológico destaca-se no contexto da saúde de animais e de seres humanos. Os suínos apresentam rica microbiota no sistema gastrointestinal, a qual pode ser liberada no meio ambiente pelas fezes. Estudos associados aos microrganismos oriundos destes resíduos e o solo são complexos e multifatoriais. O tamanho, a atividade, a estrutura e a diversidade de comunidades microbianas no solo são afetados por diversos fatores bióticos e abióticos (ROUSKI et al. 2010; CUNHA et al., 2012).

Portanto, a deposição de água residuária da suinocultura (ARS) em solos agrícolas pode alterar a comunidade microbiana do solo com a tendência de decaimento de microrganismos de origem intestinal e patogênicos, em curto espaço de tempo. Contudo, pequenas subpopulações podem se adaptar onde os processos ecológicos do solo são importantes na regulação de populações bacterianas, a partir das relações entre os seres vivos e as características do solo (ROGERS & SMITH, 2007; SANTOS & MEURER, 2012).

Recentemente, estudos têm avaliado a influência de aplicação das águas residuárias de diferentes origens na comunidade microbiana do solo. Os principais trabalhos se restringem à disposição de águas residuárias de origem humana (SOUZA et al. 2011; SIMÕES et al., 2013; HEINZE et al., 2014). O impacto da aplicação da água residuária de suinocultura na microbiota do solo é pouco estudado e restringe-se à avaliação quantitativa (FINOCCHIARO & KREMER, 2010; SILVA et al., 2010; LOURENTE et al., 2011; VIEIRA et al., 2011; SOUSA et al., 2014).



Por outro lado, trabalhos com maior amplitude de parâmetros quantitativos e qualitativos são observados na meso e macrofauna do solo (TESSARO et al., 2013; ALMEIDA, 2013). Esses trabalhos demonstram indicativos concretos que a água residuária de suinocultura pode disponibilizar grande diversidade de microrganismos em solos agrícolas. Assim, as comunidades microbianas do solo são alteradas de forma significativa.

Estudos com maior amplitude quantitativa e qualitativa necessitam de técnicas complexas na avaliação da composição microbiana do solo. Neste sentido, destacam-se a respiração basal, a biomassa microbiana e as ferramentas moleculares como a Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) (MILTNER et al. 2011; VAN ELSAS et al, 2012). A respiração basal avalia a atividade metabólica e o estresse ambiental dos microrganismos presentes no solo. A biomassa microbiana permite observar alterações quantitativas na comunidade microbiana e está relacionada com a decomposição natural e ciclagem de nutrientes. Enquanto a análise molecular em DGGE é útil na identificação de alterações na composição da comunidade bacteriana.

Neste estudo, foram avaliados os efeitos quantitativos (respiração basal, biomassa microbiana e quociente metabólico) e qualitativos (DGGE, correlação entre as condições químicas do solo e atividade microbiana) na comunidade microbiana do solo a partir da aplicação de água residuária de suinocultura (ARS) associada à adubação mineral.

## **MATERIAL E METODOS**

### **Área experimental, tratamentos e coleta das amostras**

O estudo foi realizado em área experimental localizada a 24° 48' de Latitude Sul e 53° 26' de Longitude Oeste e altitude de 760m. O Clima é subtropical úmido (Cfa), com temperatura média anual de 21 °C. Apresenta maiores temperaturas em fevereiro, com média de 28,5 °C e menores em julho, com média de 13,3 °C. A precipitação média anual é de 1.900 mm, nos meses de dezembro a fevereiro com maior período de chuva e variação de 500 a 600 mm (IAPAR, 2014).

A área experimental conta com histórico de oito anos de aplicação de ARS, organizada em 24 parcelas de 1,60 m<sup>2</sup>. Os tratamentos em esquema fatorial associam ARS e adubação mineral (AM); foram instalados em 2006 e usados até a coleta de

dados no ano de 2013, totalizando 18 ciclos de produção. Durante os tratamentos, utilizou-se a sucessão de culturas soja-milho-aveia. ARS foi aplicada uma única vez antecedente à semeadura. Do 1º ao 6º ciclo de produção, a ARS foi coletada em Lagoa de Estabilização, do 7º ao 13º ciclo, ela foi coletada na saída do Biodigestor e do 14º ao 18º ciclo, antecedente à entrada para Biodigestor. Simultaneamente à aplicação de ARS foi avaliado o efeito da AM (Nitrogênio:Fósforo:Potássio) na formulação 0:20:20, respectivamente.

Os tratamentos foram determinados pela combinação dos níveis de ARS (0, 100, 200 e 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) e AM (Ausência (A) e Presença (P) e três repetições). Nominaram-se os tratamentos da seguinte forma: A-ARS-0; A-ARS-100; A-ARS-200; A-ARS-300; P-ARS-0; P-ARS-100; P-ARS-200; P-ARS-300.

Após o 18º ciclo de produção, na cultura de soja, foram coletadas três amostras com 200 g do solo, em cada parcela experimental, com auxílio do trado holandês na camada de 20 cm. As amostras foram homogeneizadas e acondicionadas em sacos plásticos; identificadas, refrigeradas e encaminhadas para análise. As análises de biomassa microbiana (BMS) e respiração basal (RBS) foram realizadas no IAPAR-Londrina e a análise de DNA das comunidades bacterianas no solo pela técnica de Eletroforese em Gel Desnaturante (DGGE) na EMBRAPA-Londrina. No laboratório, as amostras foram novamente homogeneizadas, peneiradas em malha de 4 mm e extraídos os resíduos vegetais. Amostras de solo também foram enviadas ao laboratório Agrilab-Botucatu, para determinação dos parâmetros físico-químicos dos solos das parcelas.

### **Parâmetros físico-químicos do solo**

O solo da área experimental foi classificado como latossolo vermelho distroférico típico (EMBRAPA, 2006). Foram coletadas e analisadas amostras de solo de cada lisímetro na profundidade de 0-60 cm e homogeneizadas de acordo com RAIJ et al. (2001). Os resultados obtidos foram considerados como a caracterização da área.

Os valores médios das características químicas do solo estão apresentados na Tabela 1 em cada tratamento.

Tabela 1 Caracterização química do solo das parcelas avaliadas

Parcelas	água		g dm <sup>-3</sup>				mg dm <sup>-3</sup>		mmolc dm <sup>-3</sup>		
	pH	MO	NO3	inorg.	N	N org	P	S	CTC		
A-ARS-0	7,1	30,6	26,60	41,77	931,00	889,00	3,91	1,23	128,67		
P-ARS-0	7,2	29,0	28,93	46,43	1113,00	1066,67	12,31	4,20	122,80		
A-ARS-100	7,1	36,4	46,43	61,60	1183,00	1121,33	8,13	4,20	134,76		
P-ARS-100;	6,5	29,7	58,10	95,43	1022,23	926,67	9,23	10,50	111,50		
A-ARS-200	6,7	33,5	41,77	61,60	1365,00	1303,33	11,62	3,38	118,30		
P-ARS-200	6,3	30,0	30,10	42,93	1012,67	952,67	23,17	12,63	114,85		
A-ARS-300	6,5	33,8	34,77	47,60	1003,33	955,33	23,36	5,89	125,57		
P-ARS-300	6,5	32,6	2,43	46,43	1110,67	1064,00	34,83	11,51	124,76		
Parcelas	mmolc dm <sup>-3</sup>						mg dm <sup>-3</sup>				
	Al	H+Al	Na	Ca	Mg	K	Mn	Cu	Fe	Zn	B
A-ARS-0	0,00	11,99	4,25	73,48	42,86	0,34	84,67	4,53	31,90	2,91	0,14
P-ARS-0	0,00	4,16	4,25	74,46	42,57	1,61	57,67	4,36	12,86	2,89	0,15
A-ARS-100	0,00	10,62	4,50	77,64	45,85	0,64	68,33	4,98	11,43	18,93	0,21
P-ARS-100;	1,04	15,23	5,00	62,51	31,74	2,02	43,00	3,69	11,90	8,20	0,21
A-ARS-200	0,00	14,16	3,88	65,98	36,32	1,84	52,33	7,47	26,19	23,87	0,32
P-ARS-200	3,33	28,01	4,13	56,24	27,75	2,85	58,33	7,24	20,95	17,29	0,33
A-ARS-300	0,63	20,81	4,50	66,67	35,26	2,84	60,33	7,29	12,86	27,33	0,39
P-ARS-300	0,83	23,83	4,38	64,23	33,49	3,21	55,33	7,96	11,90	25,71	0,39

## **Respiração Basal (RBS), Biomassa microbiana (BMS) e Quociente Metabólico (qCO<sub>2</sub>)**

A avaliação da RBS foi determinada a partir da liberação de CO<sub>2</sub> nas amostras não fumigadas após 10 dias de incubação. A análise foi realizada segundo JENKINSON & POWLSON (1976).

A determinação do teor de C da BMS foi realizada por fumigação-extração (VANCE et al., 1987). O C da BMS foi calculado pela diferença das amostras fumigadas e não fumigadas, usando o fator de correção de 0,33. Os valores foram expressos em microgramas de C da BMS por grama de solo seco.

O qCO<sub>2</sub> foi obtido através do cálculo de divisão da RBS pela BMS (C min/C microbiano × 100).

## **Análise de DNA do solo pela técnica de Eletroforese em Gel Desnaturante (DGGE) e índices de biodiversidade**

A extração do DNA total do solo avaliado em DGGE foi realizada em amostras de 0,25 g de solo com o *Ultraclean Soil DNA Kit*, conforme especificações do fabricante (Mobio Laboratories, Inc. Califórnia, EUA). Duas reações de amplificação do DNA bacteriano total do solo foram utilizadas.

A primeira consistiu em amplificar o DNA dos organismos presentes no solo, o qual foi amplificado com iniciador universal fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3) tendo como alvo a região que codifica o rDNA 16S (1500 pb) (WEISBURG et al., 1991). A reação da PCR consistiu em: 3,0 µL desoxinucleotídeos (dNTPs) 1,5 mM; 1,5 µL MgCl<sub>2</sub> 50,0 mM; 5,0 µL tampão 10X [20 mM Tris- HCl (pH 8,4)]; 1,5 µL de cada iniciador (fD1 and rD1) 10 pmoles; 0,2 µL 5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA); 1 µL de DNA do solo (30 ng); água Milli-Q estéril para completar o volume final de 50 µL. O programa de PCR pode ser detalhado em: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min; 15 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s; 93 °C por 45 s; anelamento do iniciador a 55 °C por 45 s, e extensão a 72 °C por 2 min; a reação foi finalizada a 4 °C.

A segunda amplificação ocorreu com a utilização 1 µL (~20 ng) do produto da primeira reação de amplificação como molde. Os iniciadores utilizados foram o F-968

(5'CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAACGCGA

AGAACCTTAC-3), com o grampo de GC e o R-1401 (5'-GCGTGTGTACAAGACCC-3) (NÜBEL et al., 1996). Houve a amplificação de aproximadamente 430 pb da 16S rDNA, correspondendo à região hipervariável V3. A mistura de PCR foi preparada como: 5,0µL dNTPs 1,5 mM; 1,3 µL MgCl<sub>2</sub> 50,0 mM; 2,5 µL tampão 10X [20 mM Tris- HCl (pH 8,4)]; 1,0 µL de cada iniciador (F-968 and R-1401) 10 pmoles; 0,2 µL 5 U da Taq DNA polimerase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA); 1 µL do produto de PCR da primeira reação com fD1 e rD1 iniciadores (~10 ng); água Milli-Q estéril para completar o volume final de 25 µL.

A amplificação ocorreu com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; 2 ciclos a 94 °C por 1 min, a 60 °C por 2 min, e a 72 °C por 2 min; 2 ciclos a 94 °C por 1 min, a 59 °C por 2 min, e a 72 °C por 2 min, 94 °C por 1 min, 58 °C por 2 min, 72 °C por 2 min (2 ciclos); 94 °C por 1 min, 57 °C por 2 min; 72 °C por 2 min (2 ciclos); 94 °C por 1 min, 56 °C por 2 min, 72 °C por 2 min (2 ciclos); 94 °C por 1 min, 55 °C por 2 min, 72 °C por 2 min; e por 10 min a 72 °C.

A segunda amplificação foi confirmada ao serem aplicados 2 µL do produto da PCR em gel de agarose a 1% (w/v) em TAE 0.5X (10 mM Tris-acetato e 0,5 mM de dissódio EDTA (pH 8,3), utilizando como marcador o *Low DNA Mass™* (Invitrogen-Life Technologies). Géis foram corados com brometo de etídio (0,3 µg mL<sup>-1</sup>) e visualizados com luz UV.

A análise da comunidade bacteriana por DGGE foi realizada pelo Sistema D-Code (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), utilizando 25 µL do último produto de PCR para cada replicata de cada tratamento. Utilizou-se gel de poliacrilamida 6% (w / v) com gradiente variando de 35 a 55% de solução desnaturante (7 M de ureia e 40% (v / v) de formamida) e 0% de solução (sem ureia e formamida adicionada). A eletroforese foi realizada com Tampão TAE 0.5X, primeiro com uma pré-corrída a 60 °C e 100 V durante 1 hora e, em seguida, a uma voltagem constante de 100 V durante 16 horas. Em seguida, os géis foram corados com brometo de etídio e fotografado sob luz UV.

Uma mistura padrão de bactérias do solo foi preparada em laboratório, a qual consistiu em igual proporção de *Klebsiella* sp, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Pantoea* sp., *Enterobacter* sp., *Paenibacillus polymyxa*, *Klebsiella variicola* e *Rhizobium*. A mistura bacteriana foi aplicada em três colunas de cada gel.

Todas as imagens encontradas foram normalizadas por identificação de bandas do mix de bactérias padrão nas colunas de referência, mantendo-se as posições das

bandas de referência. Após essa etapa, via SPADE (*Species Prediction and Diversity Estimation*) transformaram-se as imagens do DGGE em índices de biodiversidade dos microrganismos: índice Shannon (H), *Evenness* (E) e de riqueza (ACE) (*Abundance-based Coverage Estimator*).

### **Análise dos dados**

Considerando que a área experimental tem como fatores a ARS (0, 100, 200 e 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) e AM (Ausência (A) e Presença (P)), as quais propiciaram um delineamento em esquema fatorial 4x2, com três blocos, foram realizadas análises exploratórias dos parâmetros quantitativos (BMS, RBS e qCO<sub>2</sub>), pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na análise dos parâmetros qualitativos a partir dos resultados de DGGE e consequente determinação dos índices de biodiversidade (H, E e ACE), a análise foi semelhante à usada nas variáveis quantitativas, ou seja, esquema fatorial 4x2 do experimento em campo.

Na análise de similaridade entre os perfis de bandas por DGGE, utilizou-se o algoritmo UPGMA e coeficiente de Jaccard (J) com 5% de tolerância. Visando avaliar os parâmetros do solo que mais interferem na comunidade microbiana, estimaram-se as correlações de Spearman entre os parâmetros avaliados com as propriedades químicas do solo das parcelas. Ressalta-se que os parâmetros dos solos das parcelas tiveram efeitos do uso de longo prazo (8 anos de experimentação) da associação de ARS e AM, na sucessão anual de rotação de culturas soja-milho-aveia.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As comunidades bacterianas do solo foram avaliadas quanto aos fatores quantitativos como RBS, BMS e  $qCO_2$  e qualitativos a partir da biodiversidade pela técnica do DGGE, correlação entre os parâmetros físico-químicos do solo e a comunidade microbiana e índices de Shannon (H), *Evenness* (E) e de riqueza (ACE).

### Fatores quantitativos (RBS, BMS e $qCO_2$ )

Observa-se na Tabela 2 que apenas o fator ARS apresentou efeitos, com altos níveis de significância, em RBS, BMS e  $qCO_2$ . Nos níveis de ARS, destaca-se a dose de  $100\text{ m}^3\text{ ha}^{-1}$  com maiores valores de RBS e  $qCO_2$  que representam a dinâmica viva por meio da respiração dos microrganismos. A BMS estimada a partir do C do solo das parcelas foi crescente frente aos níveis de ARS, seguindo padrão semelhante ao acúmulo de C ao longo dos oito anos com aplicação de ARS em todos os 18 ciclos de produção da área experimental.

TABELA 2. Análise de Variância (p-valor) e teste de média para os parâmetros quantitativos dos microrganismos do solo. **Analysis of variance (p-value) and average test for quantitative parameters of soil microorganisms.**

ARS e AM	RBS	BMS	$qCO_2$
0	2,078 c	243,133 b	8,633 c
100	4,976 a	350,017 a	14,221 a
200	4,369 b	384,817 a	11.408 b
300	4,356 b	378.083 a	11,610 b
A	3,968 A	347,179 A	11,218 A
P	3,921 A	330,179 A	11,718 A
ARS	0,000*	0,000*	0,000*
AM	0,741	0,225	0,316
ARS*AM	0.238	0,330	0,409
CV (%)	8,71	9,35	10,31

As médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna, não apresentam diferenças significativas no teste de Tukey a 5% de significância. As médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na coluna, não apresentam diferenças significativas no teste de Tukey a 5% de significância.

A: ausência de Adubação mineral; P: presença de adubação mineral; CV: coeficiente de variação; RBS expresso em  $\mu\text{g C-CO}_2\text{ g}^{-1}\text{ solo hora}^{-1}$ ; CBM  $\mu\text{g C-BMS g}^{-1}\text{ solo}^{-1}$ ;  $qCO_2$  em  $\text{mg C-CO}_2\text{ g}^{-1}\text{ C-BMS. h}^{-1}$

Diferentes fatores ambientais como a temperatura e disponibilidade de nutrientes, influenciam a atividade microbiana no solo (SUGIHARA et al. 2010). A temperatura média do solo analisado no momento da coleta foi de  $28\text{ }^\circ\text{C}$ . A maioria dos microrganismos do solo pertencem ao grupo dos mesófilos, sendo assim o fator temperatura não interferiu negativamente no metabolismo dos microrganismos do

solo analisado. Os nutrientes incorporados ao solo pela aplicação de maiores concentrações de ARS podem ter contribuído para a semelhança metabólica entre os microrganismos presentes nos níveis de 200 e 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de ARS. Importantes nutrientes, que atuam como co-fatores enzimáticos de processos respiratórios, como Zinco, Cobre e Manganês, apresentaram valores crescentes proporcionais às doses de ARS acumulando-se no solo no decorrer do experimento. A maior disponibilidade nas concentrações de 200 e 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> (Tabela 1), aumentou a estabilidade metabólica dos microrganismos em relação aos parâmetros avaliados.

Portanto, a ARS aumenta a quantidade de microrganismos no solo, impactando no local de despejo deste tipo de dejetos (GAMA-RODRIGUES, 2008). Porém o aumento da atividade microbiana com ARS possui limite como o decréscimo de sua atividade dias após a aplicação de ARS, inclusive com valores próximos a áreas sem aplicação de ARS, como observado por GUERRERO et al. (2007). Por outro lado, aplicação contínua de ARS pode levar a estabilidade metabólica dos microrganismos presentes no solo, indicando efeitos residuais em maiores concentrações, possivelmente ocasionados pelo acúmulo de matéria orgânica, como observado neste estudo e por VIEIRA et al. (2004). A estabilidade pode ser associada à adição de compostos lábeis presentes na ARS, que aumentam a quantidade de recursos disponíveis ou parcialmente aproveitáveis pelos microrganismos. Entretanto, com o passar do tempo, esta fonte vai sendo esgotada e a comunidade de microrganismos vai mudando, sendo selecionadas aquelas espécies capazes de decompor materiais mais complexos ou recalcitrantes (McGUIRE & TRESEDER, 2010; SOUSA et al., 2014).

O fluxo de CO<sub>2</sub> correlaciona-se com a intensidade dos processos catabólicos, sendo assim, um aumento na RBS indica uma maior atividade metabólica dos microrganismos. O aumento nas taxas de RBS nas parcelas com ARS pode representar alteração metabólica de microbiota do solo devido à aplicação da ARS e se relacionar diretamente ao aumento da biomassa microbiana (CATTELAN & VIDOR, 1990).

Comportamento semelhante à RBS, também foi encontrado para qCO<sub>2</sub>. Houve aumento de qCO<sub>2</sub> nos tratamentos com 100m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de ARS com subsequente decréscimo para os tratamentos com 200 e 300 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> de ARS. O Aumento de RBS e qCO<sub>2</sub> poderia indicar condição de estresse fisiológico com os microrganismos aumentando a liberação de CO<sub>2</sub> devido sua intensa atividade metabólica visando



manutenção do metabolismo (ANDERSON & DOMSCH, 2010). O resultado da  $qCO_2$  demonstra adaptação da BMS às condições de maior matéria orgânica disponibilizada ao solo nos tratamentos com níveis de 200 e 300  $m^3 ha^{-1}$  de ARS.

O resultado da BMS seguiu uma tendência semelhante à RBS e  $qCO_2$ , no entanto sem apresentar valores maiores na parcela com 100  $m^3 ha^{-1}$  de ARS, quando comparada as de 200 e 300  $m^3 ha^{-1}$  de ARS. Estes resultados demonstram uma adaptação metabólica dos microrganismos em concentrações menores de ARS, seguido de aumento metabólico acompanhado ao aumento de biomassa, demonstrando equilíbrio no sistema sem condições de estresse que induzam o decréscimo na eficiência dos microrganismos (ISLAM & WEIL, 2000).

### **Fatores qualitativos (DGGE, H, E e ACE)**

A técnica de DGGE permitiu detectar diversidade de microrganismos do solo, incluindo aqueles não cultiváveis, por meio das diferenças entre as intensidades e posições de bandas. Na Figura 1, apresentam-se apenas as bandas da primeira repetição, pois se encontrou alta similaridade (99,9%) entre as repetições do respectivo tratamento. A análise da Figura 1 sugere presença de diferentes grupos, com algumas comunidades dominantes, representadas por bandas de maior intensidade.

Os perfis de DNA bacteriano são distintos entre as parcelas com e sem ARS, apesar de evidenciarem comunidades em comum entre os tratamentos. A AM não interferiu na diversidade bacteriana.

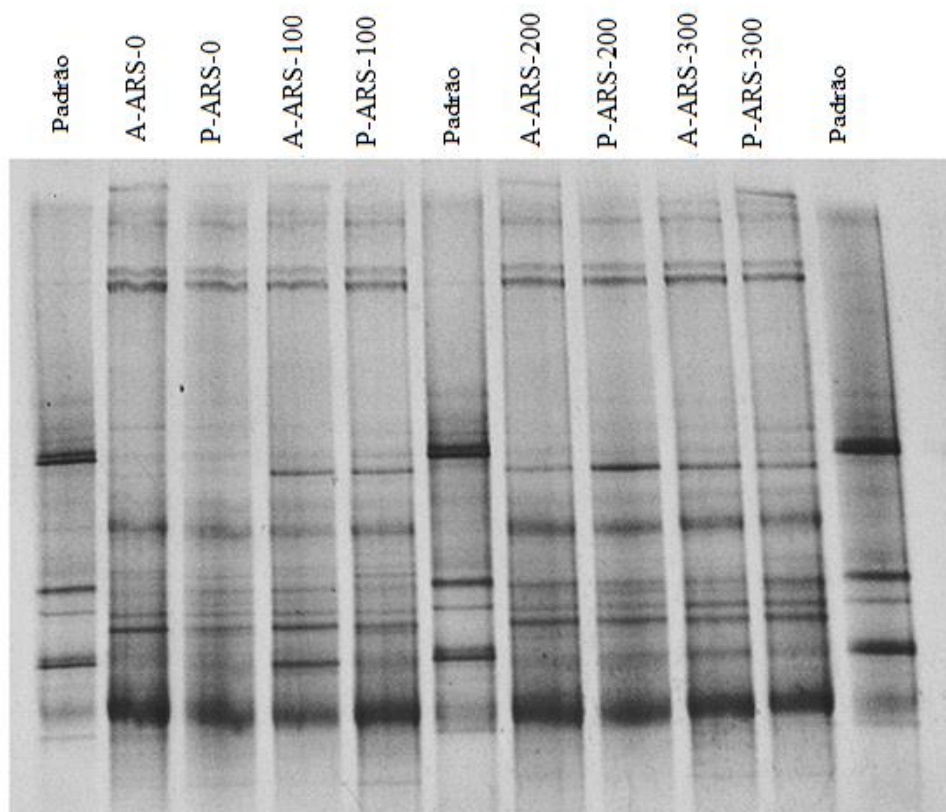


FIGURA 1. Similaridade genética (%), entre os perfis de DNA total do solo, obtida nos tratamentos estudados para primeira repetição. **Genetic similarity (%) among the total soil DNA profiles obtained in the studied treatments for first repetition.**

As parcelas que não receberam ARS apresentaram maior diversidade bacteriana, com bandas distintas das demais (seta 1). Entretanto, os tratamentos que receberam ARS possuem maior quantidade de comunidades dominantes, representada por bandas espessas (seta 2). Deste modo, a ARS contribui para a permanência de grupos dominantes nos solos, principalmente quando são aplicadas concentrações maiores e períodos prolongados. Apesar de passar por tratamento anaeróbico, a ARS pode transportar grande quantidade de microrganismos como aqueles de origem do trato gastrointestinal dos animais. Assim, o diferente aporte de microrganismos deve induzir, ao usuário da técnica, maiores cuidados e estudos de impacto ambiental na área agrícola que utiliza a ARS na agricultura.

Um solo com teor elevado de matéria orgânica tende a manter a população microbiana mais estável ao longo do ano; provavelmente, em decorrência da riqueza de nichos ecológicos, pela heterogeneidade das fontes de carbono (DE FEDE et al., 2001; GRAYSTON et al., 2001). A biodiversidade alterada pela ARS é um risco à qualidade do solo, pois a redução da diversidade microbiana pode ser um importante

indicador da perda de manutenção das funções bioquímicas no ecossistema e, por consequência, da qualidade do solo. A dominância de algumas espécies de microrganismos parece não ser tão importante quanto à manutenção da diversidade, isso porque a dominância reflete de forma mais imediata à flutuação microbiana de curto prazo e a diversidade revela o equilíbrio entre os diversos organismos e os domínios funcionais no solo (LAVELL, 2000).

Além da técnica de DGGE, indicadores mais tradicionais, como os índices H e ACE, indicam também maior biodiversidade e o número de espécies em parcelas em que não houve aplicação de ARS (Tabela 3). Nas parcelas sem ARS, o maior valor do índice Evenness (E) indica ainda distribuição equitativa entre as diferentes espécies presentes no solo, com menor dominância que aquelas observadas nas parcelas com ARS, corroborando com a análise por DGGE. Neste sentido, Hidri et al. (2010) demonstraram que a ARS, quando altera as características físico-químicas, também modifica a comunidade bacteriana. Uma observação importante dos autores e também visto neste trabalho é que maiores concentrações de ARS, associadas a um período prolongado, pode alterar de modo significativo a estrutura bacteriana nativa do solo.

TABELA 3. Índices de diversidade<sup>1</sup> de comunidades bacterianas sob diferentes concentrações de ARS e adubação mineral. **Diversity indices<sup>1</sup> of bacterial communities under different concentrations of SWW and mineral fertilization.**

Diversidade Bacteriana	Tratamentos							
	A-ARS-0	P-ARS-0	A-ARS-100	P-ARS-100	A-ARS-200	P-ARS-200	A-ARS-300	P-ARS-300
H	2.817±0.095a	2.883±0.091a	2.590±0.085b	2.595±0.086b	2.623±0.087b	2.615±0.090 b	2.654± 0.092	2.663 ±0.086
ACE	42.4±19.1	45.6±20.2	19.8±3.5	20.0±3.7	24.4±6.7	27.0±6.4	24.5±7.8	22.4 ±4.4
Total de bandas	19	20	15	15	17	17	16	16
E	0.96	0,96	0.95	0.95	0.93	0.93	0.95	0.95

<sup>1</sup>Valores obtidos ± desvio padrão

As médias seguidas de mesmas letras minúsculas na linha não apresentam diferenças significativas no teste de Tukey a 5% de significância.

O resultado da técnica de agrupamento corrobora com as análises realizadas pelas demais técnicas e índices de avaliação de biodiversidade (DGGE, H, ACE e E). No agrupamento, formaram-se dois grupos principais (G1 e G2), com 81% de similaridade sob diferentes concentrações de ARS (Figura 2). O grupo 1 (A-ARS-0; P-ARS-0) e 2 (A-ARS-100; P-ARS-100; A-ARS-200; P-ARS-100; A-ARS-300 e P-ARS-300) incluem, respectivamente, os tratamentos sem ARS e com ARS.

No grupo 2, dois subgrupos foram observados com 91% de similaridade. O primeiro representado pelos tratamentos A-ARS-100 e P-ARS-100. O segundo, com similaridade acima de 94%, é representado pelos tratamentos A-ARS-200, A-ARS-300, P-ARS-200 e P-ARS-300. Em cada concentração de ARS, o fator AM não apresentou diferença (100% similaridade).

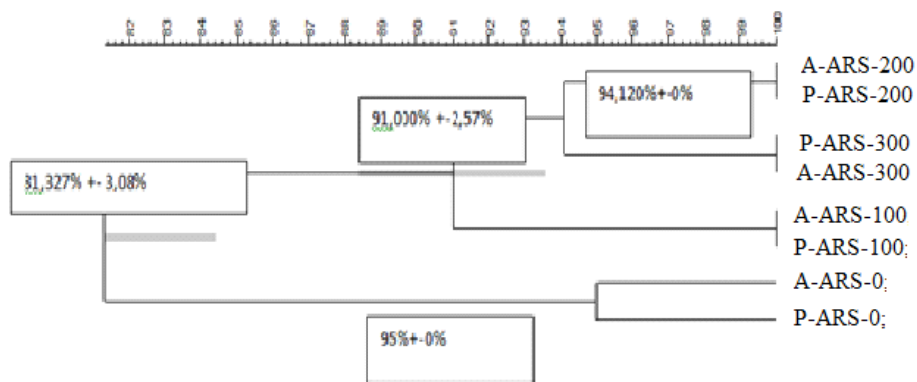


FIGURA 2. Dendrograma construído com os perfis de 16S rDNA-DGGE de comunidade de solo com diferentes concentrações de ARS e adubação mineral. As diferenças entre os perfis são indicadas por percentual de similaridade. O Coeficiente de similaridade de Jaccard (5% de tolerância) e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA). **Dendrogram constructed with profiles of 16S rDNA-DGGE soil community with different SWW concentrations and mineral fertilizer. The differences between profiles are indicated by percentage similarity. Jaccard similarity coefficient (5% tolerance) and cluster analysis by the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA).**

### Correlação entre as características do solo e fatores quantitativos (RBS, BMS e qCO<sub>2</sub>)

A partir da análise de correlação de Spearman, com 5% de significância, entre a RBS, BMS e qCO<sub>2</sub> com os parâmetros físico-químicos do solo, é possível verificar

que a RBS possui correlação positiva com MO (0,52) e Zn (0,47) e negativa com o Mn (-0,45) e Fe (-0,42). O BMS obteve correlação positiva com Zn (0,73), MO (0,57), Cu (0,57), N (0,43), P (0,42) e com o N-org (0,41). Apenas uma correlação positiva de S (0,49) foi observada com  $qCO_2$ .

A correlação positiva entre MO com RBS e BMS era esperada, visto que BMS é a principal constituinte da matéria orgânica viva, que disponibiliza nutrientes para a comunidade microbiana, portanto, aumenta sua atividade metabólica e, conseqüentemente, a respiração (GAMA-RODRIGUES et al., 2008).

Considerando que Cu, Zn e Mn atuam como cofatores de enzimas respiratórias como a super óxido-dismutase, é possível fazer algumas análises interessantes. A correlação positiva entre o Zn e RBS e BMS indica que a ARS disponibiliza esse elemento para os microrganismos, que aumentam a atividade metabólica e respectiva taxa de crescimento. Por outro lado, a correlação positiva do Cu, apenas com BMS, indica que tal elemento na ARS não interferiu na taxa de respiração, mas contribuiu para a multiplicação dos microrganismos. A correlação positiva apenas com BMS também foi observada com P, elemento fundamental para o crescimento microbiano, que participa da formação dos ácidos nucléicos e síntese dos compostos orgânicos de alta energia, como a adenosina trifosfato.

A correlação negativa entre RBS com Mn e com o Fe, possivelmente, foi devido à concentração considerável do elemento Mn na ARS ( $40 \text{ mg}^{-1} \text{ dm}^{-3}$  a  $100 \text{ mg}^{-1} \text{ dm}^{-3}$ ) e Fe no solo ( $7 \text{ mg}^{-1} \text{ dm}^{-3}$  a  $68 \text{ mg}^{-1} \text{ dm}^{-3}$ ), que podem interferir negativamente no metabolismo energético dos microrganismos via estresse oxidativo e morte celular (FARINA et al., 2013).

A correlação positiva de S com  $qCO_2$  indica que o aumento desse elemento pode aumentar a eficiência metabólica dos microrganismos. O teor de S no solo ocorreu devido à presença de AM aliada à ARS. Fertilizantes formulados com menor concentração de nitrogênio, fósforo e potássio, como o utilizado neste estudo, contêm aproximadamente 5% de S, contribuindo simultaneamente com a ARS na disponibilização desse nutriente no solo. O S compõe enzimas e coenzimas, participa do metabolismo de carboidratos e auxilia na fixação de N na forma livre e simbiótica, logo, a disponibilidade do mesmo, associada a diversos nutrientes presentes na ARS, contribui para o aumento da taxa metabólica dos microrganismos do solo.

## CONCLUSÕES

O uso de ARS em longo prazo interferiu de forma significativa na quantidade e qualidade de microrganismos do solo enquanto a adubação mineral não induziu qualquer efeito significativo na população microbiana;

Os elementos Zinco, Cobre, Fósforo e Nitrogênio foram importantes para manutenção e crescimento da população microbiana, porém, o Manganês e o Ferro afetaram negativamente a população microbiana;

O uso prolongado de ARS, principalmente nas doses maiores ( $200$  e  $300 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ ), induziu à menor diversidade de grupos de microrganismos no solo e consolidou a permanência de determinados grupos bacterianos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M.A.X.; SOUTO, J.S.; SOUTO, P.C. Composição e sazonalidade da mesofauna do solo do semiárido paraibano. *Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável*, v.8, n.4, 2013.
- ANDERSON, T.H., DOMSCH, K.H. Soil microbial biomass: The ecophysiological approach. *Soil Biology and Biochemistry*, v.42, n.12, p.2039-2043, 2010.
- BATISTA, R.O.; MARTINEZ, M.A.; PAIVA, H.N.; BATISTA, R.O.; CECON, P.R. O efeito da água residuária da suinocultura no desenvolvimento e qualidade de mudas de *Eucalyptus urophylla*. *Ciência Florestal, Santa Maria*, v. 24, n. 1, p. 127-135, jan.-mar., 2014
- CATTELAN, A.J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função de variações ambientais. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, v.14, p.133-142, 1990.
- CUNHA, E.Q.; STONE, L.F.; FERREIRA, E.P.B.; DIDONET, A.D.; MOREIRA, J.A.A. Atributos físicos, químicos e biológicos de solo sob produção orgânica, impactados por sistemas de cultivo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande*, v. 16, n. 1, p. 56-63, 2012.
- DE FEDE, K.L.; PANACCIONE, D.G.; SEXTONE, A.J. Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by BIOLOGR community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rDNA genes. *Soil Biology and Biochemistry, Oxford*, v. 33, n. 11, p. 1555-1562, 2001.
- FARINA, M.; AVILA, D.S.; ROCHA, J.B.T.; ASCHNER, M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International* v. 62, n. 5, p. 575–594, 2013.
- FINOCCHIARO, R. G.; KREMER, R. J. Effect of municipal wastewater as a wetland water source on soil microbial activity. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 4, p. 1974-1985. 2010.
- GAMA-RODRIGUES, E.F.; GAMA-RODRIGUES, A.C. Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P.E.; CAMARGO, F.A.O. *Fundamentos da matéria orgânica do solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais*. 2.ed. Porto Alegre, Metrópole, 2008. 654p.



GRAZZIOTTI, P.H. Atividade microbiana e produção da lavoura cafeeira após adubação com dejetos líquidos de suínos. *Bioscience Journal*, Uberlandia, v. 30, n. 4, p. 1041-1049, July/Aug. 2014.

GRAYSTON, S.J.; GRIFFITH, G.S.; MAWDESLEY, J.L.; CAMPEBELL, C.D.; BARDGETT, R. D. Accounting of variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 33, n. 4/5, p. 533-551, 2001.

GUERRERO, C.; MORAL, R.; GÓMEZ, I. Microbial biomass and activity of an agricultural soil amended with the solid phase of pig slurries. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 17, p. 3259-3264, 2007.

HEINZE, S.; CHEN, Y.; EL-NAHHAL, Y.; HADAR, Y.; JUNG, R.; SAFI, J.; SAFI, M.; TARCHITZKY, J.; MARSCHNER, B. Small scale stratification of microbial activity parameters in Mediterranean soils under freshwater and treated wastewater Irrigation. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 70, p. 193-204, 2014.

HIDRI, Y.; BOUZIRI, L.; MARON, P.A.; ANANE, M.; JEDID, N.; HASSAN, A.; RANJARD, L. Soil DNA evidence for altered microbial diversity after long-term application of municipal wastewater. *Agronomy for Sustainable Development*. v. 30, p. 423–431, 2010.

HIDRI, Y.; FOURTI, O.; ETURKI, S.; JEDIDI, N.; CHAREF, A.; HASSEN, A. Effects of 15-year application of municipal wastewater on microbial biomass, fecal pollution indicators, and heavy metals in a Tunisian calcareous soil. *Journal Soils Sediments*, v. 14, p. 155–163, 2014.

IAPAR. INSTITUTO AGRONÓMICO DO PARANÁ. Cartas climáticas do estado do Paraná. Londrina, 2014.

ISLAM, K.R.; WEIL, R.R. Land use effects on soil quality in a tropical forest ecosystem of Bangladesh. *Agriculture Ecosystems and Environment*, v. 79, p. 9-16, 2000.

JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-V: A method for measuring soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 8, p. 209-213, 1976.

LAVELLE, P. Ecological challenges for soil science. *Soil Science*, Washington, v. 165, n. 1, p. 73-86, 2000.

LEJON, D.P.H.; CHAUSSOD, R.; RANGER, J.; RANJARD, L. Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil (Morvan, France), *Microbial Ecology*, v. 50, p. 614–625, 2005.

LOURENTE, E.R.P.; MERCANTE, F.M.; ALOVISI, A.M.T.; GOMES, C.F.; GASPARINI, A.S.; NUNES, C.M. Atributos Microbiológicos, Químicos e Físicos de Solo Sob Diferentes Sistemas de Manejo e Condições de Cerrado. *Pesq. Agropecuária Trop.*, Goiânia, v. 41, n. 1, p. 20-28, jan./mar. 2011.

MAGGI, C.F.; FREITAS, P.L.; SAMPAIO, S.C.; DIETER, J. Impacts of the application of swine wastewater in percolate and in soil cultivated with soybean. *Engenharia Agrícola (Online)*, v. 33, p. 279-290, 2013.

McGUIRE, K.L.; TRESEDER, K.K. Microbial communities and their relevance for ecosystem models: Decomposition as a case study. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 42, n. 4, p. 529-535, 2010.

MEDEIROS, S.S.; Gheyi, H.R.; Pérez-Marin, A. M.; Soares, F.A.L.; Fernandes P.D. Características químicas do solo sob algodoeiro em área que recebeu água residuária de suinocultura. *R. Bras. Ci. Solo*, 35:1047-1055, 2011.

MILTNER, A. BOMBACH, P.; SCHMIDT-BRUCKEN, B.; KASTNER, M. SOM genesis: microbial biomass as a significant source. *Biochemistry*, v. 111, p. 41-55, 2012.

MORRIS, C.E.; BARDIN, M.; BERGE, O.; FREY-KLETT, F.N.; GIRARDIN, H.; GUINEBRETIERE, M.H.; LEBARON, P.; THIERY, J.M.; TROUSSELLIER, M. Microbial Biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiology and Molecular Biology Review*, v. 66, n. 4, p. 592-616, 2002.

NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKÉ, A. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal Bacteriology*, v. 178, p. 5636-43, 1996.

RAIJ, B.V.; ANDRADE, J.C. de; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas: Instituto Agrônômico, p.285, 2001.

ROGERS, M.; SMITH, S.R. Ecological impact of application of wastewater biosolids to agricultural soil. *Water and Environment Journal*, v. 21, p. 34–40, 2007.

ROUSK, J.; BÅÅTH, E.; BROOKES, P.C., LAUBER, C.L.; LOZUPONE, C.; CAPORASO, J. G.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Soil bacterial and fungal

communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal*. v. 4, p. 1340–1351, 2010.

SAMPAIO, S.C.; FIORI, M.G.S.; OPAZO, M.A.U.; NÓBREGA, L.H.P. Comportamento das formas de nitrogênio em solo cultivado com milho irrigado com água residuária da suinocultura. *Engenharia Agrícola (Online)*, v. 30, p. 138-149, 2010.

SANTOS, R.C.; MEURER, E.J. Microrganismos em percolado, após aplicações de dejetos líquidos de suínos. *Biosci. J.*, v. 28, n. 6, p. 1000-1006, 2012.

SILVA, R.R.; SILVA, M.L.N.; CARDOSO, E.L.; MOREIRA, F.M.S.; CURI, N.; ALOVISI, A.M.T. Biomassa e atividade microbiana em solo sob diferentes sistemas de manejo na região fisiográfica Campos das Vertentes – MG. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 34, p. 1585-1592, 2010.

SIMÕES, K.S.; PEIXOTO, M.F.S.P.; ALMEIDA, A.T.; LEDO, C.A.S.; PEIXOTO, C.P.; PEREIRA, F.A.C. Água residuária de esgoto doméstico tratado na atividade microbiana do solo e crescimento da mamoneira. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.17, n.5, p.518–523, 2013.

SOUZA, J.A.A.; BATISTA, R.O.; RAMOS M.M.; SOARES, A.A. Contaminação microbiológica do perfil do solo com esgoto sanitário. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 33, n. 1, p. 5-8, 2011.

SOUSA, F.A.; SILVA, E.B.; CAMPOS, A.T.; GANDINI, A.M.M.; CORRÊA, J.M.; SPARLING, G.P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research*, v. 30, p.195-207, 1992.

SUGIHARA, S.; FUNAKAWA, S.; KILASARA, M.; KOSAKI, T. Effect of land management and soil texture on seasonal variations in soil microbial biomass in dry tropical agroecosystems in Tanzania *Applied Soil Ecology*, v. 44, p. 80–88, 2010.

TESSARO, D.; SAMPAIO, S.C.; ALVES, L.F.A.; DIETER, J.; CORDOVIL, C.S.C.M.S.; DE VARENNES; PANSSERA, W. Macrofauna of soil treated with swine wastewater combined with chemical fertilization. *African Journal of Agricultural Research*. v. 8, p. 86-92, 2013.

TREONIS, A.M.; AUSTIN, E.E.; BUYER, J.S. Effects of organic amendment and tillage on soil microorganisms and microfauna. *Applied Soil Ecology* v. 46, p. 103-110, 2010.

- VAN ELSAS, J.D.; CHIURAZZI, M.; MALLON, C.A.; ELHOTTOVÁ, D.; KRISTUFEK, V. SALLES, J.F. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. PNAS. 2012, 109 (4), p. 1159-1164, 2012.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology and Biochemistry, v. 19, p. 703-707, 1987.
- VASSEUR, L.; CLOUTIER, C.; LABELLE, A.; DUFF, J.N.; BEAULIEU, C.; ANSSEAU, C. Responses of Indicator Bacteria to Forest Soil Amended with Municipal Sewage Sludge from Aerated and Non-Aerated Ponds. *Environmental Pollution*, v. 92, p. 67-72, 1996.
- VIEIRA, F.C.B.; HERBES, M.G.; CERETTA, C.A. Uso de esterco líquido de suínos na agricultura e evolução de CO<sub>2</sub>. In: Fertbio 2004 - Avaliação das Conquistas: Bases para estratégias futuras, Lages. Resumos. Lages: CBCS/UDESC, 19 a 23 de julho de 2004.
- VIEIRA, G.D.A.; CASTILHOS, D.D.; CASTILHOS, R.M.V. Atributos microbianos do solo após a adição de lodo anaeróbio da estação de tratamento de efluentes do arroz. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, v. 35, p. 543-550, 2011.
- WEISBURG W.G; BARNS S.M; PELLETIER D.A. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal Bacteriology*, v. 173, p. 697-703, 1991.