

**III-197 - ESTUDO BACTERIOLÓGICO EM ATERRO EXPERIMENTAL:
AVALIAÇÃO DA CODISPOSIÇÃO DE RESÍDUOS SÓLIDOS DOMICILIARES E
DE RESÍDUOS SÓLIDOS DE SERVIÇO DE SAÚDE**

Bianca Ramalho Quintaes⁽¹⁾

D.Sc. em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - UFRJ. Mestre em Microbiologia Médica – UERJ. Gerente do Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisas da Companhia Municipal de Limpeza Urbana do Município do Rio de Janeiro - COMLURB.

Juacyara Carbonelli Campos

D.Sc. em Engenharia Química - PEQ/COPPE/UFRJ. Engenharia Química/UFRJ. Professora Adjunta do Departamento de Processos Inorgânicos da Escola de Química/UFRJ.

Marco Antônio Lemos Miguel

DSc. em Microbiologia de Alimentos – IMPG/CCS/UFRJ. Biologia/UFRJ. Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia/UFRJ.

Marco André Giovaninni Hinojosa

Mestrando em Engenharia Ambiental/UERJ/PEAMB. Biologista do Laboratório de Microbiologia da Gerência de Pesquisas da COMLURB.

André Luiz Ferreira Menescal Conde

Biólogo/USU. Biologista da Gerência de Pesquisas Aplicadas da COMLURB.

Endereço⁽¹⁾: Estrada do Pau Ferro, 1310 (Bl 01/402) - Freguesia – Rio de Janeiro - RJ - CEP: 22745-056 - Brasil - Tel: 55 (21) 3417 2118 – Fax: 55 (21) 3417 2091 - e-mail: bianca.quintaes@comlurb.rj.gov.br

RESUMO

Dentre os diferentes tipos de resíduos gerados pelo homem, os produzidos nos serviços de atendimento à saúde têm merecido maior atenção nos últimos anos, principalmente, pelas discussões geradas pelo seu tratamento e disposição final. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da codisposição de resíduos sólidos domiciliares e de resíduos sólidos de serviço de saúde na microbiota do lixiviado gerado em células de aterro experimental. Para isso, foram construídas três unidades de confinamento de resíduos diferenciadas pelo percentual de resíduos sólidos domiciliares (RSD) e resíduos sólidos de serviços de saúde (RSS): Célula RSD (100% de resíduos sólidos domiciliares); Célula RSS (100% de resíduos sólidos de serviço de saúde) e Célula COD (célula que simula codisposição contendo 98% de resíduos sólidos domiciliares e 2% de resíduos sólidos de serviço de saúde). Além das verificações diárias de volume de lixiviado gerado, temperatura e pH, as modificações da microbiota dos lixiviados das células foram acompanhadas ao longo de 810 dias de confinamento através de métodos dependentes de cultivo (análises quantitativas de indicadores de contaminação ambiental e pesquisa de enterobactérias e de *Staphylococcus aureus*) e de métodos independentes de cultivo (eletroforese em gel com gradiente de desnaturação – DGGE-PCR). Foi avaliado o padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos e a atividade inibitória dos lixiviados gerados nas células. A caracterização microbiológica dos lixiviados das células mostrou que não há diferenças estatisticamente significativas quanto aos valores de coliformes totais, *Escherichia coli*, enterococos e *Pseudomonas aeruginosa* entre as células durante o período avaliado. As seguintes enterobactérias de importância médica foram identificadas predominantemente nos lixiviados das três células: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* sp e *Proteus mirabilis*. Após 810 dias de confinamento, os lixiviados não apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Salmonella enterica* sorovar Choleraesuis. A análise estatística dos padrões de resistência aos antimicrobianos revelou semelhanças significativas entre as três células. Em contrapartida, os resultados gerados pela análise dos agrupamentos dos perfis de DGGE demonstram que houve baixa similaridade entre as comunidades microbianas presentes nos lixiviados das células, sugerindo que as microbiotas destas amostras são diferentes e que modificaram ao longo do tempo de confinamento dos resíduos. Nas condições estudadas, os resultados obtidos sugerem que não houve diferenças significativas no comportamento das células dando suporte à prática da codisposição de RSS e RSD.

PALAVRAS-CHAVE: Resíduos Sólidos, Codisposição, Lixiviado de Aterro, Microbiologia, DGGE-PCR.

INTRODUÇÃO

A necessidade de coleta, tratamento e disposição final para os Resíduos Sólidos de Serviço de Saúde (RSS) diferenciada dos Resíduos Sólidos Domiciliares (RSD) divide as opiniões de pesquisadores e legisladores. Alguns pesquisadores consideram os RSS potenciais agentes de disseminação de microrganismos patogênicos para os seres humanos e outros animais, além de veículo para disseminação de marcadores de resistência a drogas antimicrobianas. Para outros, há poucos estudos epidemiológicos que possam ter seunexo causal nos resíduos sólidos urbanos em geral e nos resíduos sólidos de serviço de saúde, em particular. Além disso, os custos necessários para estabelecer e manter sistemas eficazes de tratamento de RSS excedem os recursos disponíveis em determinadas localidades.

Visto sob esse prisma, conhecer as comunidades microbianas e as relações biológicas que tomam parte nos resíduos sólidos pode ser útil também quando se coloca a questão sobre a periculosidade ou não dos Resíduos Sólidos de Serviço de Saúde (RSS) dispostos em aterro, sem tratamento prévio. Embora essa seja uma questão não-resolvida, os países desenvolvidos adotam uma política cautelosa e consideram tais resíduos como resíduos que exigem tratamento especial (perigosos, patogênicos, patológicos, entre outras denominações). A recomendação de incineração dos resíduos, ou de parte deles, é uma constante.

Tecnologias avançadas, tais como a incineração, a autoclave e forno de micro-ondas, podem ser inacessíveis ou de alcance limitado por falta de suporte técnico ou de investimentos. No Brasil, onde são coletadas cerca de 890 toneladas de resíduos sólidos de serviço de saúde por dia, e em diversos países em desenvolvimento, as propostas de gerenciamento apontam para a recomendação de incineração destes resíduos, ou de parte deles.

Nesse contexto, a capacidade de liberar microrganismos e substâncias que comprometem o meio ambiente não é inerente aos resíduos originários dos estabelecimentos relacionados à assistência à saúde. Os resíduos gerados em domicílio, no comércio e na indústria, bem como os efluentes das estações de tratamento de águas, são conhecidos pela sua contribuição com carga de medicamentos antimicrobianos e saneantes nas águas residuais e de microrganismos de diferentes fontes de contaminação, como fraldas, preservativos, absorventes e papéis sanitários, além de materiais perfurantes e escarificantes.

Quanto à disposição de resíduos sólidos de serviço de saúde em aterros sanitários, por ser uma medida em desuso nos países desenvolvidos, pouco se sabe sobre a microbiota dos resíduos sólidos ali depositados. Assim, a avaliação da diversidade microbiana é um dos principais passos em direção ao entendimento das propriedades metabólicas espécie-específica responsáveis pela decomposição dos resíduos sólidos. Um entendimento mais profundo da dinâmica dessa população microbiana fornecerá subsídios para uma avaliação precisa dos riscos ambientais e da estabilidade dos aterros de resíduos.

Como consequência da disposição dos resíduos sólidos em aterro, o lixiviado é atualmente considerado a emissão mais impactante sob o ponto de vista ambiental. O impacto do lixiviado de aterro sobre a microflora e microfauna é determinado por fatores como elevadas concentrações de matéria orgânica, e de nitrogênio amoniacal, além de outros contaminantes transportados pela massa de resíduos. Nesse sentido, o aterro sanitário se mostra como um sistema heterogêneo complexo quanto às características físicas, químicas e biológicas onde diferentes microrganismos coexistem e interagem.

As características do lixiviado gerado a partir da disposição dos resíduos sólidos de serviço de saúde em aterro sanitário podem se assemelhar às dos efluentes hospitalares. A entrada de bactérias de origem hospitalar em um ambiente pode representar uma grande fonte de disseminação de resistência aos antimicrobianos. Os efeitos dos rejeitos hospitalares (esgoto e águas residuais) e urbanos no meio ambiente estão associados às falhas no tratamento destes efluentes e a liberação de microrganismos e de substâncias químicas e moléculas orgânicas capazes de alterar as características dos ecossistemas.

O confinamento dos resíduos em aterros sanitários pode fornecer às comunidades microbianas as condições adequadas às suas interações e sucessões que conduziriam à inocuidade deste aterro, mas também é possível que estas condições sejam favoráveis às recombinações e mutações genéticas, tornando o lixiviado um veículo para microrganismos multirresistentes e produtores de mecanismos de patogenicidade.

Considerando-se a necessidade de informações que respondam a essas questões, o estudo de um aterro sanitário experimental para o confinamento de resíduos sólidos de serviço de saúde e de resíduos sólidos domiciliares proporcionará o monitoramento da presença e da diversidade de microrganismos patogênicos que permitam entender se os resíduos sólidos de serviço de saúde e os resíduos sólidos domiciliares se diferenciam ou não quanto à sua microbiota e ao seu potencial patogênico.

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da codisposição de resíduos sólidos domiciliares e de resíduos sólidos de serviço de saúde na microbiota do lixiviado gerado em células de aterro experimental.

MATERIAIS E MÉTODOS

IMPLANTAÇÃO DAS CÉLULAS

A construção das células obedeceu aos critérios básicos de construção de aterros sanitários (ABNT- NBR 15849:2010): impermeabilização do solo, compactação dos resíduos, drenagem de lixiviado, drenagem de gases, de drenagem de águas pluviais, controle de entrada dos resíduos (pesagem do veículo), a descarga dos resíduos sólidos, espalhamento, a compactação dos resíduos sólidos, o cobrimento com uma camada de solo de cobertura e monitoramento ambiental.

Foram montadas 3 células, dispostas lado a lado, separadas por uma distância de 2,0m de base (talude), numa área plana total de 129m², conforme modelo apresentado na Figura 1. Cada célula apresenta as seguintes dimensões: 4,5 m de base menor, 6,0 m de base maior, 5,0 m de altura e 6,0 m de profundidade, totalizando uma capacidade de volume de 157,5 m³. Para formação dos taludes e das bermas foram utilizados resíduos de construção civil.

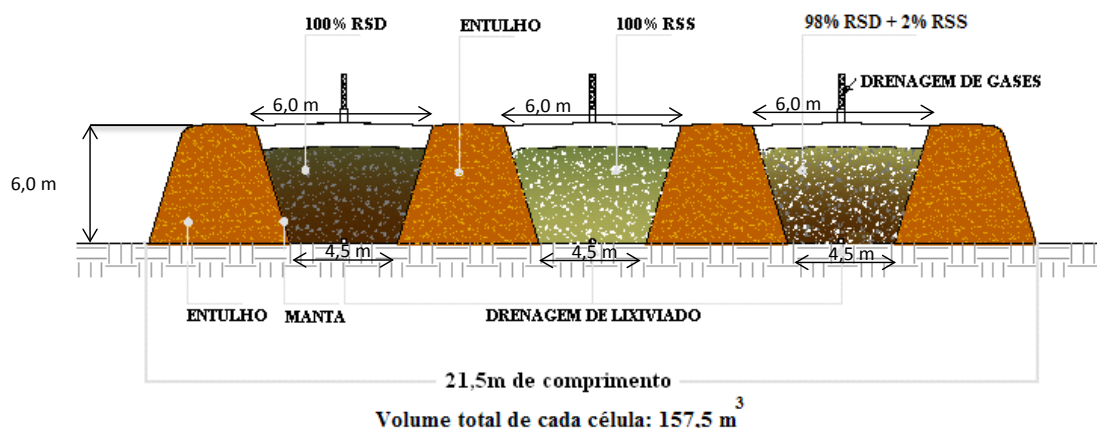


Figura 1: Modelo de aterro experimental.

CONTEÚDO DAS CÉLULAS

As células foram identificadas como RSD, para o confinamento exclusivo de Resíduos Sólidos Domiciliares; RSS, para o confinamento exclusivo de Resíduos Sólidos de Serviço de Saúde e COD, como sendo a célula de codisposição destes resíduos. As diferentes concentrações de RSD e RSS em cada célula estão demonstradas na Tabela 1, com destaque para a célula de codisposição, que apresenta a relação percentual real de RSD e RSS coletadas diariamente no município do Rio de Janeiro.

Tabela 1: Massa dos resíduos sólidos (ton.) destinados ao preenchimento das Células RSD, RSS e COD.

CÉLULA	MASSA (TON)	RSD (%)	RSS (%)
RSD	43,350	100	0
RSS	13,680	0	100
COD (RSD+RSS)	42,360 + 0,847	98	2

COMPOSIÇÃO FÍSICA DOS RESÍDUOS SÓLIDOS DE PREENCHIMENTO

Do conteúdo de cada caminhão, foi retirado 1 contêiner de 240L de RSD. Os resíduos foram homogeneizados com o apoio de uma pá mecânica. As coletas dos RSS foram realizadas em 2 dias consecutivos a partir do roteiro de diversos estabelecimentos relacionados à assistência à saúde.

As amostras foram coletadas segundo o método de quarteamento (ASTM, 2003). Após a homogeneização, os resíduos foram divididos em quatro partes iguais. De cada parte desta retiraram-se duas amostras de posições diametralmente opostas. Cada amostra equivaleu a um contêiner de 200L. O total amostrado nesta etapa foi de aproximadamente 1600L. O procedimento de quarteamento foi repetido por mais três vezes nas amostras fracionadas, com diminuição do total amostrado para 800L, 400L e 200L (amostra final).

Da amostra de 200L, realizou-se a separação dos materiais e a diferenciação em 11 componentes: papel; papelão; plástico (polietileno, polipropileno e poliestireno); vidro (incolor/ colorido); metal (ferroso/não ferroso); têxtil; matéria orgânica putrescível; madeira; eletroeletrônico; materiais inertes e outros.

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DO LIXIVIADO POR MÉTODOS DEPENDENTES DE CULTIVO

As análises foram realizadas segundo o Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater (2012). As populações de coliformes totais, *Escherichia coli* e enterococos foram expressas em Números Mais Prováveis por 100 mililitros de amostra (NMP100mL⁻¹) e determinadas pela Técnica dos Tubos Múltiplos.

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DO LIXIVIADO POR MÉTODOS INDEPENDENTES DE CULTIVO

O protocolo da Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (PCR-DGGE) foi conduzido em 6 etapas: coleta da amostra, extração do ácido nucléico, amplificação pela PCR do gene alvo, separação dos amplificados da PCR pela DGGE, visualização dos perfis, e análise de dados.

SUSCEPTIBILIDADE DAS ESTIRPES ISOLADAS AOS ANTIMICROBIANOS

Foi determinada utilizando o método de difusão em ágar segundo o CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2013).

PESQUISA DE MARCADORES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM ENTEROBACTÉRIAS

A pesquisa de enterobactérias produtoras de ESBL (enzimas beta-lactamases de espectro estendido) e produtoras de carbapenemases foi realizada segundo o CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). A detecção de enterobactérias produtoras de AmpC teve por base a metodologia da aproximação do disco, modificada (YAN *et al.*, 2002; DALMARCO *et al.*, 2006).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A Análise estatística dos dados está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Ferramentas estatísticas aplicadas aos resultados obtidos em cada parâmetro analisado no presente estudo.

PARÂMETRO	FERRAMENTA ESTATÍSTICA
Microrganismos indicadores de contaminação	Análise da variância de Kruskal-Wallis Teste de comparações múltiplas
Susceptibilidade aos antimicrobianos	Análise da probabilidade exata de Fisher
PCR-DGGE	Análises de agrupamento – coeficiente de Jaccard e UFGMA

RESULTADOS E DISCUSSÃO

COMPOSIÇÃO FÍSICA DOS RESÍDUOS SÓLIDOS DE PREENCHIMENTO

A Figura 2 apresenta uma vista panorâmica da área onde foi instalado o experimento decorrido após 810 dias desde a construção.



Figura 2: Vista panorâmica das células experimentais após 810 dias de confinamento.

A Figura 3 mostra a composição física dos RSD destinados às células. O maior percentual encontrado entre os componentes dos RSD foi a matéria orgânica putrescível, representada pelos restos de alimentos processados, alimentos fora da validade, cascas de frutas e legumes e fezes. Quanto aos componentes recicláveis dos RSD, o plástico aparece com maior valor percentual dentre os materiais potencialmente recicláveis (19,14%), seguido pelo papel (15,99%).

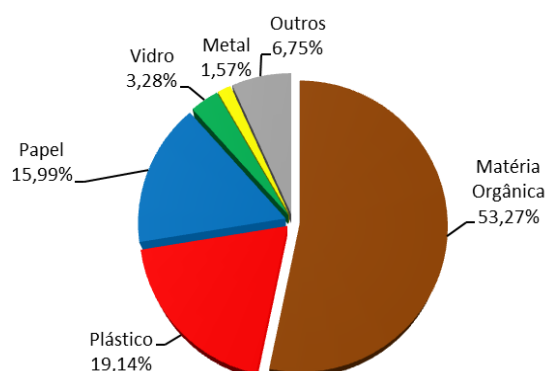


Figura 3: Composição física dos RSD destinados ao preenchimento das Células RSD e COD.

O percentual médio de matéria orgânica putrescível do município do Rio de Janeiro nos últimos cinco anos foi de 53,48%, compatibilizando-se com o valor encontrado para os RSD utilizados neste experimento. Do mesmo modo, os percentuais de papel/papelão identificados nos RSD destinados ao experimento (15,99%) e de plástico (19,14%) se encontraram dentro da média verificada ao longo dos 5 anos de pesquisa. Assim sendo, foi assegurada a semelhança dos resíduos de preenchimento com o que é disposto nos aterros do Rio de Janeiro.

Quanto aos RSS, a Figura 4 apresenta os percentuais dos componentes identificados nestes resíduos. Do total de materiais recicláveis nos RSS, os produtos plásticos corresponderam a maior fração (38,07%), seguida pelos componentes “Outros” (30,63%). Em contraposição aos RSD, o componente “matéria orgânica”, representada por peças anatômicas, sangue, vísceras e restos de alimentos, encontra-se em menor percentual em relação aos materiais recicláveis, contribuindo com 12,61%.

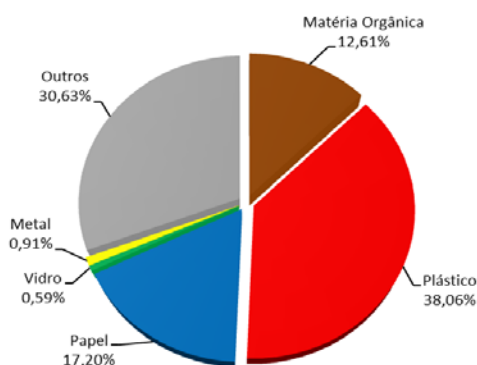


Figura 4: Composição física dos RSS destinados ao preenchimento das Células RSS e COD.

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DO LIXIVIADO POR MÉTODOS DEPENDENTES DE CULTIVO

Na Tabela 3 estão apresentados os valores médios e as variações para as populações de coliformes totais nas 3 células. As populações médias de coliformes foram similares entre as 3 células. Como os coliformes totais englobam microrganismos que têm origem ambiental e fecal, além da *E. coli*, de origem exclusivamente fecal, a detecção deste parâmetro tanto nas Células RSD e COD, como na Célula RSS pode ser atribuída a qualquer material presente nos resíduos, incluindo os alimentos.

Valores inferiores aos obtidos no presente trabalho foram relatados por Umar e outros (2011), na análise quantitativa de indicadores patogênicos em lixiviado de um aterro semi-aeróbio na Malásia, com valores para coliformes totais de $6,6 \times 10^3$ UFC 100mL⁻¹ e para *E. coli*, $1,5 \times 10^3$ UFC 100mL⁻¹.

O aterro metropolitano de Gramacho, situado no município de Duque de Caxias, RJ, foi desativado em 2011 e recebeu os RSU do município do Rio de Janeiro durante 35 anos. As análises bacteriológicas do lixiviado gerado pelo aterro no final de sua operação revelaram valores de $1,6 \times 10^5$ NMP 100mL⁻¹ para coliformes totais, e $4,9 \times 10^3$ NMP 100mL⁻¹ para *E. coli*. O aterro de Seropédica, com 2 anos de operação, recebe, em média, 9.000 ton. de RSU diariamente e os valores médios para coliformes totais no lixiviado bruto foram 5×10^2 NMP100mL⁻¹.

Tabela 3: Valor médio de coliformes totais de acordo com as células de disposição de resíduos.

Célula	Número de observações	Coliformes totais (NMP 100mL ⁻¹).			
		Média	Mediana	Mínimo	Máximo
RSD	54	$3,9 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	0	$8,0 \times 10^5$
RSS	54	$4,8 \times 10^4$	$5,0 \times 10^2$	0	$2,3 \times 10^6$
COD	54	$3,1 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$	0	$3,5 \times 10^5$

RSD – Resíduos Sólidos Domiciliares RSS – Resíduos Sólidos de Serviço de Saúde COD – Codisposição de RSD e RSS

A Tabela 4 apresenta o NMP de *E. coli* em 100mL de lixiviado nas 3 células de resíduos. *E. coli* é o único membro do grupo coliforme que satisfaz a maior parte dos critérios para um indicador ideal de poluição bacteriana de origem exclusivamente fecal (PARUCH *et al.*, 2012), sendo considerado o indicador mais sensível e a medida mais adequada de contaminação fecal em ambiente natural de água, solos e plantas (EDBERG *et al.*, 2000; HALLER *et al.*, 2009). *E. coli* apresentou valores menores na Célula RSS, comparando-se com as demais.

Tabela 4: Valor médio de *E. coli* em NMP 100mL⁻¹ de acordo com as células de disposição de resíduos.

CÉLULA	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES	<i>E. coli</i> (NMP 100ML ⁻¹)			
		MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
RSD	54	2,7x10 ⁴	6,0x10 ²	0	5,0x10 ⁵
RSS	54	8,6x10 ³	2,0x10 ²	0	3,0x10 ⁵
COD	54	1,4x10 ⁴	8,0x10 ²	0	3,0x10 ⁵

RSD – Resíduos Sólidos Domiciliares RSS – Resíduos Sólidos de Serviço de Saúde COD – Codisposição de RSD e RSS

Não foi possível estabelecer correlação entre os valores observados e o tempo de confinamento, tendo sido detectadas populações de coliformes totais e de *E. coli* com 15 dias de confinamento (primeira observação) e com 810 dias de confinamento (última observação) nas 3 células. Os resultados obtidos apontam para entender o aterro de resíduos sólidos como um sistema biológico dinâmico, em que diferentes fases de crescimento microbiano ocorrem simultaneamente.

Em oposição, nos trabalhos de Bidone e outros (2005), os valores obtidos para coliformes totais e termotolerantes obedeceram a curvas que evidenciaram quatro fases distintas do crescimento bacteriano: ausência inicial de bactérias, caracterizando a fase lag, momento em que há recuperação de danos celulares e síntese de enzimas para o desencadeamento da próxima fase, em que há a multiplicação em crescimento balanceado, fase logarítmica, seguida da fase estacionária e da fase de declínio, quando os nutrientes do sistema se esgotam.

Outro ponto a ser abordado é a presença de *E. coli* na maioria das observações, além de ter apresentado o maior valor populacional dentre os microrganismos do grupo dos coliformes. Isso indica que os resíduos sólidos confinados em aterro oferecem as condições para que *E. coli* sobreviva e se desenvolva, ainda que fora do trato intestinal. Aliás, o trato intestinal é o habitat primário deste microrganismo e, até recentemente, *E. coli* não demonstrava capacidade de sobreviver bem no ambiente, ou seja, em habitats secundárias, tais como água de superfície, sedimentos e solo (ISHII *et al.*, 2008). No entanto, tem sido demonstrado que *E. coli* pode sobreviver nesses ambientes durante longos períodos de tempo e crescer, mesmo em clima temperado (IBEKWE *et al.*, 2011).

A Tabela 5 mostra os resultados para os ensaios de determinação do NMP de enterococos em 100mL de lixiviado. Houve uma variação de 0 a 1,3x10⁵ NMP100-1mL na Célula COD, que apresentou valores similares ao da Célula RSD para este parâmetro. Grisey e outros (2010), na análise quantitativa de lixiviado de aterro fora de operação, demonstraram baixos valores de enterococos nas amostras, variando de 30 a 349 UFC 100mL⁻¹.

Tabela 5: Valor médio de enterococos em NMP 100mL⁻¹ de acordo com as células de disposição de resíduos.

CÉLULA	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES	ENTEROCOCOS (NMP 100ML ⁻¹ .)			
		MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
RSD	54	7,0x10 ³	8,0x10 ²	0	1,1x10 ⁵
RSS	54	2,1x10 ³	8,0x10 ¹	0	5,0x10 ⁴
COD	54	6,3x10 ³	7,0x10 ²	0	1,3x10 ⁵

RSD – Resíduos Sólidos Domiciliares RSS – Resíduos Sólidos de Serviço de Saúde COD – Codisposição de RSD e RSS

Esse grupo de microrganismos foi menor na Célula RSS na maioria das observações. Isso pode estar associado à ausência de fezes in natura nos RSS, em contraposição aos RSD, que apresentam em sua composição física, fezes humanas e, principalmente, fezes de animais mamíferos e aves, além de materiais provenientes de animais domésticos (areia e absorventes para higiene). O aumento da população de animais em domicílio vem sendo considerada como um problema de saúde pública pela presença de microrganismos patogênicos e por serem reservatórios de bactérias resistentes aos antimicrobianos, como os enterococos resistentes à vancomicina (VRE) (CINQUEPALMI *et al.*, 2013).

Na Tabela 6 estão anotados os valores médios da população de *P. aeruginosa* quantificada no lixiviado das células. A avaliação comparativa entre as células mostrou semelhanças entre os valores observados, ressaltando a versatilidade bioquímica desse microrganismo e capacidade de sobreviver em diferentes ambientes.

Tabela 6: Valor médio de *P. aeruginosa* nos lixiviados gerados nas células de disposição de resíduos.

CÉLULA	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES	<i>P. aeruginosa</i> (NMP 100ML ⁻¹ .)			
		MÉDIA	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
RSD	54	9,1x10 ³	4,0x10 ¹	0	2,4x10 ⁵
RSS	54	6,5x10 ³	1,3x10 ²	0	2,4x10 ⁵
COD	54	4,8x10 ³	1,3x10 ²	0	8,0x10 ⁴

RSD – Resíduos Sólidos Domiciliares RSS – Resíduos Sólidos de Serviço de Saúde COD – Codisposição de RSD e RSS

Por ser um microrganismo aeróbio estrito, a detecção de *P. aeruginosa* ao longo de todo o experimento indica que o aterro apresenta pontos de aerobiose entre os diversos materiais acumulados, além do oxigênio dissolvido na água da chuva suprimindo suas necessidades de crescimento.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DAS POPULAÇÕES BACTERIANAS

Os valores médios das populações bacterianas de coliformes totais, *E. coli* e *P. aeruginosa* nas três células não mostraram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) ao longo de 810 dias de monitoramento (54 observações), quando submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. Os dados revelam que somente para a população de enterococos a probabilidade associada à estatística de Kruskal-Wallis é menor que 5%, nível de significância do teste.

Isso indica que para enterococos os lixiviados das células apresentaram valores diferenciados, ou seja, ao menos uma das células apresentou comportamento diferente no que tange ao parâmetro de valor médio populacional deste grupo de microrganismos.

Com o objetivo de se determinar em qual (is) células essa diferença ocorreu, recorreu-se ao teste de comparações múltiplas sugerido por Siegal e Castellan (1988). Uma vez que as diferenças entre as Células RSD e RSS e entre as Células RSS e COD excedem o valor crítico, ambas as comparações foram significantes e pode-se inferir que a diferença foi gerada pelos dados originários da Célula RSS. A análise da média indicou que a população de enterococos foi menor na Célula RSS do que nas outras.

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DO LIXIVIADO POR MÉTODOS INDEPENDENTES DE CULTIVO

Para comparar as comunidades microbianas presentes no lixiviado das 3 células foram analisados os perfis de bandas obtidos pela técnica de DGGE em 2 tempos distintos: 2011, com 270 dias de confinamento dos resíduos e 2013, com 810 dias de confinamento. Uma vez que os ecossistemas encontrados nos aterros são heterogêneos e que as comunidades microbianas presentes nesses ecossistemas parecem não estar distribuídas uniformemente nas camadas de resíduos (SAWAMURA *et al.*, 2010), o lixiviado apresenta-se como um concentrador dessa diversidade, constituindo um bom meio para o estudo da diversidade microbiana presente nos aterros (SANTOS, 2010).

A similaridade entre as estruturas das comunidades bacterianas presentes nas amostras foi determinada com base na presença ou ausência das bandas detectadas no gel. Ao considerar a presença/ausência, semelhanças entre os padrões de bandas, tomadas em pares, podem ser expressas em um valor percentual utilizando-se um coeficiente de similaridade (DIEZ *et al.*, 2001). Foi utilizado o coeficiente de similaridade de Jaccard e como método de classificação hierárquica, o UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Average). Os resultados dessas análises geraram, em forma gráfica, um dendrograma para cada grupo de perfis de bandejamento. As análises foram realizadas com o auxílio do software BIONUMERICS 6,0.

Com o objetivo de avaliar as similaridades dos perfis de bandejamento para comparação entre as células, foram analisados os agrupamentos em cada ano, conforme apresentado na Figura 5 para o ano de 2011 e na Figura 6, para o ano de 2013.

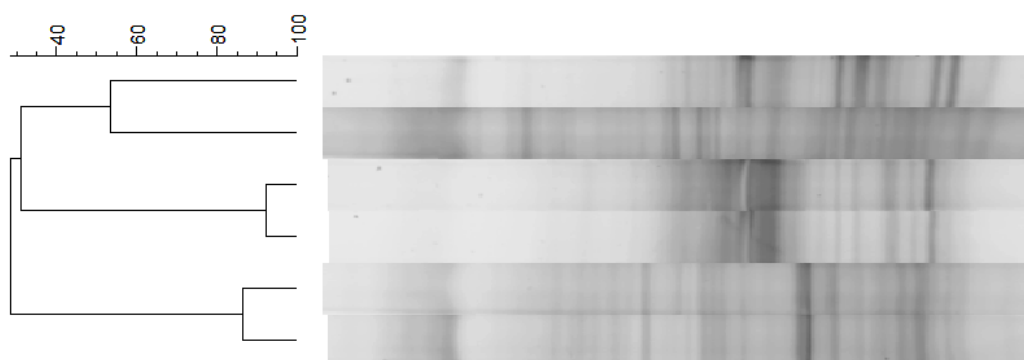


Figura 5: Estrutura das comunidades bacterianas dos lixiviados das células coletados em 2011 com base nos perfis de fragmentos 16S DNAr. Dendrograma e perfil de bandas.



Figura 6: Estrutura das comunidades bacterianas dos lixiviados das células coletados em 2013 com base nos perfis de fragmentos 16S DNAr. Dendrograma e perfil de bandas.

Os dados obtidos com a aplicação do coeficiente Jaccard mostram alto valor de similaridade entre os fingerprints do DGGE gerados em duplicata das 3 células e nos dois períodos, confirmando a reprodutibilidade da técnica de DGGE para amostras de lixiviado de resíduos sólidos.

O perfil de bandas obtido com análise do DNA das comunidades microbianas das amostras das Células RSD, RSS e COD coletadas no ano de 2011 apresentaram baixo coeficiente de similaridade (<35%) entre elas. RSD e COD foram reunidas em um mesmo grupo, mas com baixo coeficiente de similaridade (32%). RSS não foi incluída nesse grupo principal e mostrou um coeficiente de similaridade de 29%.

A riqueza e o dinamismo das comunidades microbianas refletem o comportamento que deve ser esperado em amostras ambientais (DUNBAR *et al.*, 2000), como é o caso do lixiviado de aterro de resíduos sólidos, em que diferentes variáveis concorrem para influenciar os ecossistemas, como, por exemplo, a composição física dos resíduos, o regime de chuvas locais e a percolação da água, a compactação dos resíduos, a presença de poluentes e a disponibilidade de nutrientes. De acordo com Bassin e Rosado (2011), o número de bandas diferentes geradas pelo PCR-DGGE pode estimar a riqueza da comunidade microbiana.

No entanto, como descrito por Santos (2010), perfis de DGGE semelhantes podem ficar agrupados com valores baixos de similaridade quando apenas a presença ou ausência das bandas é levada em consideração. No caso do presente estudo, todas as comparações revelaram baixas similaridades, indicando que nenhuma inferência sobre riqueza (número de bandas) deve ser realizada com a informação obtida a partir dos perfis gerados pela técnica de DGGE. Dessa forma, os resultados do DGGE foram considerados como um apoio para a análise exploratória da heterogeneidade microbiana, devendo ser associados à análise de sequenciamento dos fragmentos de DNA.

SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DAS ESTIRPES DE ENTEROBACTÉRIAS

A totalidade das amostras foi sensível à gentamicina (GEN) e à ciprofloxacina (CIP) na Célula RSD, à amicacina (AMI), aztreonam (ATM), GEN, cefepime (CPM) e CIP, na Célula RSS e na Célula COD, a sensibilidade total das amostras foi observada para AMI, CPM e CIP. O antimicrobiano cefazolina (CFZ) demonstrou o maior percentual de resistência em todas as células.

Dentre os 192 isolados de enterobactérias foram observados fenótipos de sensível (S), resistência a um único antimicrobiano (R1), resistência a dois antimicrobianos (R2) e multirresistência (MRA) nas 3 células. A Figura 7 mostra os fenótipos identificados em cada célula. As 3 células apresentaram perfil de multirresistência como o perfil de maior incidência. A presença de estirpes sensíveis aos antimicrobianos testados foi menor na Célula COD.

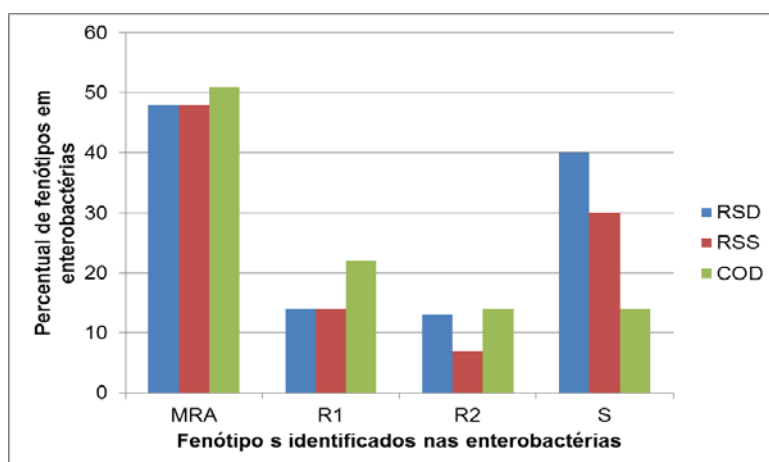


Figura 7: Percentual de perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos identificados nas enterobactérias para cada célula. MRA, multirresistência; R1, resistente a 1 antimicrobiano; R2, resistente a 2 antimicrobianos; S, sensível

Não houve diferenças estatísticas entre as proporções de padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos observados nas estirpes bacterianas isoladas nas células. Não foram detectadas estirpes de *P. aeruginosa* multirresistentes.

PESQUISA DE MARCADORES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM ENTEROBACTÉRIAS

Estirpes de enterobactérias com suspeita de produção de ESBL e de carbapenemases foram detectadas em 15,6% e 19,4% das amostras isoladas na Célula RSD, respectivamente; em 10,7% e 23,2% na Célula RSS, respectivamente e em 13,6% e 27,1% na Célula COD, respectivamente; Não foram detectadas estirpes de enterococos resistentes à vancomicina (VRE) e com perfil de alto nível de resistência aos aminoglicosídeos (HLAR) em nenhuma célula.

CONCLUSÕES

O presente trabalho simulou 3 células de aterro sanitário para disposição e codisposição de Resíduos Sólidos Domiciliares e Resíduos Sólidos de Serviço de Saúde. Através de determinados parâmetros bacteriológicos e a aplicação de uma técnica de biologia molecular, os resultados sugerem que a codisposição de RSD e de RSS pode ser empregada como método de destinação final destes resíduos, sem prejuízos à saúde pública e ao meio ambiente. Destacam-se as seguintes considerações:

- As células construídas mostraram ser um bom modelo de estudo para os parâmetros biológicos de lixiviados de aterro;
- Os valores verificados para os indicadores de contaminação ambiental das 3 células sugerem que estes microrganismos ainda persistem no lixiviado após 810 dias de confinamento;
- O sistema de aterramento sanitário de resíduos foi capaz de reduzir as populações de microrganismos indicadores de poluição fecal desde o início do confinamento;
- Os líquidos lixiviados das células experimentais de Resíduos Sólidos Domiciliares e da Codisposição não apresentaram diferença significativa na microbiota ao longo do estudo, enquanto que os da Célula RSS apresentaram valores inferiores para coliformes totais, *Escherichia coli* e enterococos em relação às demais células;

- A codisposição de Resíduos Sólidos Domiciliares e Resíduos Sólidos de Serviço de Saúde não se diferenciou da disposição exclusiva de Resíduos Sólidos Domiciliares, quanto à resistência aos antimicrobianos,
- Microrganismos com perfil de multirresistência hospitalar foram isolados nas 3 células de forma significativamente semelhante;
- A técnica de DGGE-PCR foi útil para evidenciar a baixa similaridade entre os padrões de bandejamento obtidos dos lixiviados de células confinando RSD e RSS e a codisposição destes resíduos;
- Em relação às características ecológicas das células, a técnica de PCR-DGGE associada ao sequenciamento pode ser útil na aplicação de estratégias mais eficientes no tratamento de lixiviado de aterros, através da seleção, utilização e estímulo de populações microbianas específicas presentes nos processos biológicos de degradação dos resíduos sólidos;
- Nas condições estudadas, os resultados obtidos sugerem que não houve diferenças significativas no comportamento das células dando suporte à prática da codisposição de RSS e de RSD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NORMA BRASILEIRA (NBR) 15849 – Resíduos sólidos urbanos – Aterros sanitários de pequeno porte – Diretrizes para localização, projeto, implantação, operação e encerramento. Rio de Janeiro, 2010.
2. ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - International, Standard Test Method for Determination of the Composition of Unprocessed Municipal Solid Waste. In: ASTM 5231-92 - US, 2003.
3. BASSIN, J. P.; ROSADO, A. S. Técnicas de biologia molecular aplicadas ao estudo da diversidade microbiana. In: Processos biológicos avançados para tratamento de efluentes. Ed Interciência, Rio de Janeiro, 2011.
4. BIDONE, F.R.A.; SOUZA, L.F.; MACHADO, R.M. Micro-organismos de interesse em saúde pública pesquisados em percolado de aterro sanitário de codisposição de resíduos sólidos de serviço de saúde com resíduos sólidos urbanos. XXVII CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. 2005. Anais. Porto Alegre – RS, 2005.
5. CINQUEPALMI, V.; MONNO, R.; FUMAROLA, L.; VENTRELLA, G.; CALIA, C.; GRECO, M. F.; DE VITO, D.; SOLEO, L. Environmental Contamination by Dog's Faeces: A Public Health Problem? International Journal of Environment and Research Public Health, v.10, p.72-84, 2013.
6. CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100 – S22, 2013.
7. DALMARCO E. M.; BLATT, S. L.; CORDOVA, M. M. Laboratory Identification of Extended-Spectrum β -lactamases – A review. RBAC, vol. 38, p.171-177, 2006.
8. DIEZ, B.; C. PEDROS-ALIO; T. L. MARSH; R. MASSANA. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. Applied and Environmental Microbiology, v. 67, p. 2942-2951, 2001.
9. DUMBAR, J.; TICKNOR, L.O.; KUSKE, C. R. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. Applied and Environmental Microbiology, v.66, n.7, p. 2943, 2000.
10. EDBERG, S. C.; RICE, E.W.; KARLIN, R. J.; ALLEN, M. J. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. Society for Applied Microbiology, v.29, p.106S–116S, 2000.
11. GRISEY, E., BELLE, E. DAT, J. MUDRY, J., ALEYA, L. Survival of pathogenic and indicator organisms in groundwater and landfill leachate through coupling bacterial enumeration with tracer tests. Desalination, v.261, p. 162–168, 2010.
12. HALLER, L.; POTE, J.; LOIZEAU, J.; WILDI, W. Distribution and survival of faecal indicator bacteria in the sediments of the Bay of Vidy, Lake Geneva Switzerland. Ecology and Industrials, v.9, p. 540-547, 2009.

13. IBEKWE, A. M.; MURINDA, S. E.; GRAVES, A. K.; Genetic Diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from human and animal sources uncovers multiple resistances from human sources. PLoS ONE, v.6, 2011.
14. ISHII, S.; MEYER, K.P.; SADOWSKY, M.J. Relationship between phylogenetic groups, phenotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. Applied and Environmental Microbiology, v.73, p.5703–5710, 2007.
15. PARUCH, A. M.; MAEHLUM, T. Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. Ecological Indicators, v.23, p.140–142, 2012.
16. SAWAMURA, H.; YAMADA, M.; ENDO, K.; SODA, S.; ISHIGAKI, T.; IKE, M. Characterization of microorganisms at different landfill depths using carbon utilization patterns and 16S Rrna gene based T-RFLP. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 109, n. 2, p. 130-137, 2010.
17. SANTOS A. L. Diversidade molecular microbiana de lixiviados de aterros. Rio de Janeiro, 2010. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.
18. SIEGAL, S.; CASTELLAN, N. J. Estatística não-paramétrica para requeit do comportamento. Porto Alegre, Brasil, 2ª edição, 1988.
19. STANDARD METHODSD FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 22ª edição, 2012.
20. UMAR, M. AZIZ, H. A., YUSOFF, M. F. Assessing the chlorine disinfection of landfill leachate and optimization by response surface methodology (RSM). Desalination, v. 274, p.278-283, 2011.
21. YAN, J.; KO, W.; JUNG, W.; CHUANG, C.; WU, J. Emergence of *Klebsiella 13requeinte* isolates producing inducible DHA-1 –Lactamase in a University Hospital in Taiwan. Journal of Clinical Microbiology, v.40, p. 3121–3126, 2002.