

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados

SORAIA CHAFIA NABACK DE MOURA

**Identificação e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de
bactérias isoladas de biodigestores anaeróbios operados com
dejetos suínos e com dejetos bovinos**

Juiz de Fora

2017

SORAIA CHAFIA NABACK DE MOURA

**Identificação e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias
isoladas de biodigestores anaeróbios operados com dejetos suínos e com
dejetos bovinos**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado profissional em Ciência e
Tecnologia do Leite e Derivados, da
Universidade Federal de Juiz de Fora,
como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre

Orientador: Dr. Marcelo Henrique Otenio

Co-orientadora: Dra. Aline Dias Paiva

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Moura, Soraia Chafia Naback.

Identificação e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de biodigestores anaeróbios operados com dejetos suínos e com dejetos bovinos / Soraia Chafia Naback de Moura. – 2017.

73 p. : il.

Orientador: Marcelo Henrique Otenio

Coorientadora: Aline Dias Paiva

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2017.

1. biodigestão anaeróbia. 2. biorreatores. 3. resistência bacteriana. 4. dejetos animais. I. Otenio, Marcelo Henrique, orient. II. Paiva, Aline Dias, coorient. III. Título.

Soraia Chafia Naback de Moura

**Identificação e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias
isoladas de biodigestores anaeróbios operados com dejetos suínos e com
dejetos bovinos**

Dissertação de Mestrado do Programa de Mestrado Profissional em Ciência e
Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Henrique Otenio
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Dr. Jailton da Costa Carneiro
Embrapa Gado de Leite

**Juiz de Fora
2017**

Ao meu marido Israel que sempre esteve ao meu lado me apoiando e incentivando meu crescimento profissional, a minha mãe por suas incansáveis orações, ao meu pai (in memoriam) que sentiria muito orgulho de mais uma etapa vencida, a minha irmã Sora, ao Júlio e ao meu sobrinho César pelo companheirismo e carinho. Dedico

AGRADECIMENTOS

Foi um percurso longo e laborioso para concluir mais esta etapa, contudo foi de grande valia para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço primeiramente a Deus, por nunca permitir em nenhum momento que eu desistisse ao longo do trajeto.

À Faculdade de Farmácia e Bioquímica- UFJF, ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes e à Embrapa Gado de Leite, do programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, pela oportunidade que me foi dada de ingressar no curso de mestrado.

À Embrapa Gado de Leite que deu aporte financeiro, de infraestrutura e de pessoal para realização do trabalho e também à ITAIPU pelo aporte financeiro para a realização da dissertação.

Ao meu orientador Marcelo Henrique Otenio por sua dedicação, ensinamentos e compreensão com meu jeito reservado de ser. Agradeço com muito carinho.

À minha co-orientadora Aline Dias Paiva pela paciência e carinho. Agradeço por sua disponibilidade de sempre responder as minhas dúvidas, por seus ensinamentos valiosos e por sua preciosa amizade, com a qual fui presenteada.

Ao Álvaro que antecedendo ao meu trabalho operou os biodigestores e isolou todo material de trabalho para minha parte prática.

Aos estagiários do Laboratório do Rúmем: Laura, Ranaíla, Carolina, Natália, Yasmim e em especial ao Marlon pela ajuda, amizade e pelos bons momentos que compartilhamos.

Ao Júnior, Marlice e Jailton pelo apoio e amizade.

À Prof^a Dr^a Marta Fonseca Martins que me acolheu no laboratório, e por seus ensinamentos que com certeza ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Genética Molecular, em especial à Isabela que tão prontamente me ajudou.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Furtado pela sua simpatia na vice-coordenação do mestrado.

As minhas amigas Lúcia Cangussu, Fabíola Angelo, Carolina Fernandes, Nathália Barbosa e Aline Ribeiro pelas palavras de apoio e incentivo.

Aos colegas do mestrado pela amizade e companheirismo.

Agradeço a todos da minha família em especial, à Luiza minha prima que sempre torceram por mim.

À minha irmã, seu marido e meu irmão que sempre me apoiaram e vibraram com minhas conquistas.

Ao meu marido meu grande amor por estar sempre ao meu lado compartilhando meus objetivos, e incentivando-me a prosseguir e ir sempre um pouco mais além.

Aos membros da banca examinadora, pela presença e colaboração.

A todos, meu muito obrigada!

RESUMO

Os dejetos animais podem ser utilizados em biodigestores no processo de biodigestão anaeróbia, produzindo biofertilizante e gerando biogás e energia. Pelo fato do processo biológico produzir biogás e biofertilizante é importante identificar a população bacteriana, bem como seu perfil de resistência aos antimicrobianos. O objetivo deste trabalho foi avaliar microbiologicamente a biodigestão anaeróbia, e a resistência a antimicrobianos de bactérias, em biodigestores de escala piloto, alimentados com dejetos de suínos e com dejetos de bovinos, bem como comparar os métodos de identificação bioquímico e molecular. Inicialmente a morfologia dos isolados bacterianos foi confirmada pela coloração de Gram, em seguida as amostras foram identificadas fenotipicamente pelo método semi-automatizado BBL *Crystal Identification System*® e posteriormente genotipicamente pelo sequenciamento das amostras de rDNA 16S. O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi determinado pelo método de disco-difusão. Os grupos microbianos encontrados foram os Bacilos Gram Negativos da família *Enterobacteriaceae* e os cocos Gram positivos, com a prevalência de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium*, respectivamente. Quanto a susceptibilidade aos antimicrobianos, para os isolados do gênero *Staphylococcus* a penicilina foi a droga que apresentou o maior índice de resistência (78,9%), seguida da oxacilina (57,9%), sendo a maioria dos isolados (94,7%) sensíveis à combinação de ampicilina-sulbactam e ao levofloxacino (78,9%). Para os isolados do gênero *Enterococcus* os maiores índices de resistência foram detectados para a rifamicina (48%) e eritromicina (32%), com elevada sensibilidade ao levofloxacino (88%) e à vancomicina (80%). As linhagens de *E.coli* avaliadas apresentaram uma alta sensibilidade à amicacina (85,7%) e a maior resistência se deu para o antimicrobiano ampicilina (42,8%). A utilização do biofertilizante gerado pela biodigestão de dejetos suínos e bovinos deve ser criteriosa, devido à persistência de espécies potencialmente patogênicas no efluente final, algumas das quais apresentam resistência a antimicrobianos relevantes para o tratamento em humanos e em animais.

Palavras-Chave: Biodigestão anaeróbia. Biodigestores. Resistência bacteriana. Dejetos animais.

ABSTRACT

Animal waste can be used in the anaerobic biodigestion process producing biofertilizer and generating biogas and energy. Due to the production of biogas and biofertilizer in the biodigester, it is important to identify its bacterial population as well as the antimicrobial susceptibility profile. The aim of this study was to evaluate the diversity of enterobacteria and of Gram-positive cocci isolated from pilot scale anaerobic biodigestors fed with porcine and bovine fecal matter and to compare biochemical and molecular methods of identification. Initially, the morphology of the bacterial isolates was confirmed by Gram staining, then the samples were identified phenotypically by the semi-automated BBL Crystal Identification System® biochemical kit, and finally genotypically by sequencing rDNA 16S. The antimicrobial susceptibility profile was determined by the disc diffusion method. The microbial groups found were the Gram negative bacilli belonging to the family *Enterobacteriaceae* and the Gram- positive cocci, with the prevalence of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium*, respectively. For the *Staphylococcus* species, the highest resistance rate was detected for penicillin (78,9%) and oxacillin (57,9%), with the great majority (94,7%) susceptible to ampicillin/sulbactam and levofloxacin (78,9%). For the isolates belonging to the genus *Enterococcus*, the highest resistance ratios were detected for rifamicin (48%) and erythromycin (32%), and with high susceptibility to levofloxacin (88%) and vancomycin (80%). The *Escherichia coli* strains exhibited high susceptibility to amikacin (85,7%), showing the highest resistance ratio to the antimicrobial ampicillin (42,8%). The use of biofertilizers produced from the biodigestion of swine and bovine fecal matters must be judicious due to the persistence of potentially pathogenic species in the final effluent, some of which show resistance to relevant antimicrobial in the treatment of human and animal infections.

Keywords: Anaerobic biodigestion. Biodigestors. Bacterial resistance. Animal waste.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da digestão anaeróbia de matéria orgânica complexa	23
Figura 2 – Esquema do princípio da técnica da PCR 31	35
Figura 3 – Prevalência de espécies bacterianas identificadas pelo método bioquímico	47
Figura 4 – Prevalência de espécies bacterianas identificadas pelo método de sequenciamento do gene rDNA 16S	49

LISTA DE TABELAS

Tabela1 – Isolados bacterianos, identificados pelo método bioquímico	45
Tabela 2 – Isolados bacterianos identificados pelo método de sequenciamento do gene rDNA 16S	47
Tabela 3 – Espécies bacterianas identificadas pelos métodos bioquímico e pelo método de sequenciamento do gene rDNA 16S	49
Tabela 4 – Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão para os CGP isolados de amostras dos dejetos de suínos e dos dejetos de bovinos	53
Tabela 5 – Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão para os BGN (ENT) isolados de amostras de dejetos suínos.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
ASB	Ampicilina/Sulbactam
ATCC	American Type Culture Collection - Coleção Americana de Cultura Tipo
BCP	Bovino coco positivo
BE	Bile Esculina
BGN	Bastonetes Gram-negativos
BGN NF	Bastonetes Gram-negativos não fermentadores
BHI	Brain heart infusion -
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool - Ferramenta básica de busca de alinhamentos locais
CGP	Cocos Gram positivos
CGP/C+	Cocos Gram positivos/Catalase positiva
CGP/C-	Cocos Gram positivos/Catalase negativa
CLSI	“ClinicalLaboratory Standards Institute” - Instituto de Padronização para Laboratórios Clínicos
CO₂	Dióxido de carbono
CPM	Cefepime
DNA	<i>Desoxyribonucleicacid</i> – Ácido Desoxirribonucléico
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EMB	Ágar Eosina de Metileno
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ENT	Bastonetes Gram negativos família <i>Enterobacteriaceae</i>
ERI	Eritromicina
GEN	Gentamicina
H₂	Hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LEV	Levofloxacino
MER	Meropenen
NMP	Número mais provável
PCR	Polymerase Chain Reaction - Reação da cadeia da polimerase

PEN	Penicilina
pH	Potencial hidrogeniônico
PTZ	Piperaciclina/Tazobactam
PVC	Policloreto de vinil
PYR	Pyrrolidonilaril amidase
RIF	Rifamicina
RNA	<i>Ribonucleicacid</i> – Ácido Ribonucléico
OXA	Oxacilina
SBN	Suíno bacilo negativo
SCP	Suíno coco positivo
ST	Sólidos totais
SV	Sólidos voláteis
STX	Sulfametoxazol/trimetropim
TRH	Tempo de Retenção Hidráulica
TSA	Ágar tripcaseína de soja
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
VAN	Vancomicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 PECUÁRIA SUÍNA E BOVINA	15
3.2 DEJETOS PRODUZIDOS PELA PECUÁRIA SUÍNA E BOVINA	16
3.2.1 Dejetos de suínos	16
3.2.2 Dejetos de bovinos	17
3.3 APROVEITAMENTO DA BIOMASSA COMO FONTE ALTERNATIVA DE ENERGIA RENOVÁVEL.....	18
3.4 BIODIGESTORES: UTILIZAÇÃO E TIPOS	19
3.5 PROCESSO DE BIODIGESTÃO ANAERÓBIA.....	21
3.5.1 Fatores que afetam a biodigestão	24
3.6 PRODUÇÃO DO BIOGÁS	25
3.7 PRODUÇÃO DO BIOFERTILIZANTE E SUA UTILIZAÇÃO	27
3.8 PREVALÊNCIA E PERSISTÊNCIA DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS NOS BIOFERTILIZANTES	29
3.9 POPULAÇÃO MICROBIANA PRESENTE NOS BIODIGESTORES	30
3.10 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS	32
3.10.1 Métodos clássicos para identificação de micro-organismos	32
3.10.2 Sistemas automatizados e semi-automatizados para identificação de micro-organismos	34
3.10.3 Métodos moleculares para identificação de micro-organismos	34
3.11 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 SELEÇÃO DOS ISOLADOS	38
4.2 AVALIAÇÃO MORFO-TINTORIAL PELA COLORAÇÃO DE GRAM	39
4.3 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA POR MÉTODO BIOQUÍMICO SEMI- AUTOMATIZADO	39
4.4. IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA POR MÉTODO MOLECULAR	40
4.4.1 Extração de DNA total dos isolados bacterianos	40

4.4.2 Reação em cadeia da polimerase	42
4.4.3 Sequenciamento do rDNA 16S	42
4.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO	43
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	45
5.2 PREVALÊNCIA BACTERIANA DAS AMOSTRAS ISOLADAS DOS DEJETOS SUÍNOS E DOS DEJETOS BOVINOS	52
5.3 ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ÀS DROGAS ANTIMICROBIANAS DE LINHAGENS BACTERIANAS ISOLADAS DOS DEJETOS SUÍNOS E DOS DEJETOS BOVINOS	52
6 CONSIDERAÇÕES GERAIS	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A criação de suínos existente no Brasil está em pequenas propriedades e unidades de produção familiar, e um dos maiores problemas no confinamento destes animais é a grande produção de dejetos com alto potencial poluidor (ANGONESE et al., 2006). A pecuária leiteira destaca-se entre uma das maiores cadeias produtivas do Brasil, ocupando a sexta posição dentre os maiores produtores do mundo, sendo que na região sudeste do território brasileiro encontra-se o maior rebanho leiteiro, que gera mais de 100 milhões de toneladas de dejetos por ano (IPEA, 2012).

Desta forma, tanto a criação de suínos como a criação de bovinos, produzem grandes quantidades de dejetos, e estes quando não tratados, constituem uma importante fonte poluidora para o solo e água, podendo levar a desequilíbrios ambientais e causar problemas de saúde tanto em humanos como em animais (ANGONESE et al., 2006; AMARAL et al., 2004).

Em virtude do avanço tecnológico os produtores rurais estão aprimorando e utilizando as energias renováveis como uma alternativa tecnológica, gerando ótimos resultados, com melhoria na gestão dos recursos econômicos, evitando os agravos à saúde humana e animal bem como à contaminação dos recursos naturais. Uma dessas inovações tecnológicas é o uso da biodigestão na produção do gás como fonte de energia e como forma de redução dos gastos utilizando os biodigestores para a produção da energia a partir de dejetos suínos e bovinos e ainda o uso do efluente como biofertilizante.

O uso do biodigestor é uma importante ferramenta, pois além de tratar os resíduos ele reutiliza parte da energia que seria perdida no processo produtivo, através da produção do biogás por digestão anaeróbia. É um método promissor de produção de energia, a partir de fontes renováveis como o estrume animal, com efeitos significativos na sustentabilidade ambiental e ainda representa um ganho econômico para o produtor.

Contudo há a necessidade de identificar a população bacteriana presente nos dejetos suínos e bovinos, bem como sua resistência aos antimicrobianos, para avaliar o risco microbiológico dos mesmos (RESENDE et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar microbiologicamente a biodigestão anaeróbia, e a resistência a antimicrobianos de bactérias em biodigestores de escala piloto, alimentados com dejetos de suínos e com dejetos de bovinos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as bactérias isoladas de biodigestores alimentados com dejetos de suínos e com dejetos de bovinos.
- Comparar a identificação morfo-bioquímica e molecular dos microorganismos isolados.
- Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das linhagens bacterianas identificadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PECUÁRIA SUÍNA E BOVINA

A pecuária suína destaca-se como uma importante atividade socioeconômica no Brasil e contribui para a geração de empregos, especialmente na região sul do país (MIEELE, 2006). Na região oeste do Paraná, a suinocultura destaca-se como uma importante fonte de renda, gerando aproximadamente 217 mil empregos (IAPAR, 2000).

Os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná concentram 1/3 do rebanho nacional, alojando aproximadamente 12 milhões de suínos; a maior produção encontra-se no estado de Santa Catarina, com 4 milhões em 28.000 propriedades (BELLI FILHO, 1995).

O Brasil ocupa a quarta posição no ranking mundial, produzindo 38 milhões de suínos, o que representa 10% de toda a carne suína consumida no mundo (BRASIL, 2013). A suinocultura destaca-se na sua produção, exportação e no uso de novas tecnologias no setor produtivo aumentando o consumo interno e favorecendo o mercado externo. Estes fatores corroboram para que o Brasil esteja entre os principais produtores de carne suína no mundo (MEINERZ et al., 2011).

A atividade suinícola é de suma importância na economia brasileira, embora esteja associada a um grande impacto ambiental, já que é grande o volume de dejetos produzidos pelos animais (AMORIM, 2002). A carga orgânica média poluidora de um suíno, em termos de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), é de 198,5g/animal/dia (ALVES, 1996).

A bovinocultura também é destaque no agronegócio brasileiro conforme o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, proporcionando dois segmentos lucrativos: a cadeia produtiva da carne e a do leite, que, juntos, contribuem com R\$ 67 bilhões do valor bruto da renda. No ano de 2011, a produção pecuária nacional foi de aproximadamente 212,8 milhões de cabeças (MINAS, 2013).

No que se refere à pecuária leiteira, o Brasil ocupa a sexta posição entre os maiores produtores mundiais, gerando 100 milhões de toneladas/ano de dejetos em função da produção de leite (IPEA, 2012). Segundo o IBGE (2013), o estado de Minas Gerais produz 27,6% do volume de leite, ocupando o primeiro lugar no

ranking brasileiro. Estratégias como a melhoria do rebanho leiteiro, a dieta e o confinamento, são usadas para aumentar a produtividade do animal. Entretanto, o confinamento do rebanho apresenta-se como um potencial fator de poluição, devido ao acúmulo de seus dejetos (MATOS, 2005).

Neste contexto, embora a pecuária, tanto de suínos como de bovinos, tenha favorecido o desenvolvimento socioeconômicos no Brasil, também contribuiu para a geração de graves problemas ambientais, com o abundante número de animais e o elevado volume de dejetos produzidos. Uma boa alternativa para minimizar esse agravamento pode ser a produção do biogás a partir da utilização desses dejetos (OLIVEIRA et al., 2010).

3.2 DEJETOS PRODUZIDOS PELA PECUÁRIA SUÍNA E BOVINA

3.2.1 Dejetos de Suínos

Os dejetos de suínos são caracterizados como um resíduo escuro, que varia do cinza ao marrom ou preto, de consistência líquida ou pastosa. Os dejetos são constituídos por sólidos, urina, sobras de água de bebedouros dos animais e água utilizada na limpeza dos locais de criação. Este efluente pode ser altamente poluente para o ambiente (BELLI FILHO, 1995). Os principais constituintes desses dejetos de suínos que afetam as águas superficiais são: matéria orgânica, nutrientes, enterobactérias e sedimentos (BLEY JR., 2003).

Uma alternativa para a minimização dos problemas com o manejo dos dejetos é a diminuição da geração e o tratamento destes, como por exemplo, a utilização de tanques de coleta, assim estes dejetos poderão ser usados posteriormente na adubação; entretanto, essas práticas causam evidentes impactos ambientais, como a liberação de gases voláteis, poluição do solo e a proliferação de micro-organismos patogênicos (OLIVEIRA et al., 2006). Outra forma de armazenamento e tratamentos desses resíduos é a construção de esterqueiras, que são escavadas no solo e revestidas de lona, alvenaria ou pedra, com tempo de retenção hidráulica (TRH) de 120 dias para que haja a fermentação, com posterior diminuição da carga orgânica;

após esse período, há a retirada do esterco, que poderá ser usado em diferentes plantações (KUNZ, 2005).

Uma técnica promissora para o tratamento dos dejetos é a biodigestão anaeróbia, posterior geração do biogás como uma fonte de energia renovável utilizada em diferentes sistemas (CHAE et al., 2008). Os dejetos de suínos têm ótimo rendimento para a geração do biogás (cerca de 560 m³ de biogás), com percentual de gás metano de 50%, demonstrando ser superior aos dejetos de bovinos, equinos e de aves (COLATTO et al., 2011).

3.2.2 Dejetos de bovinos

Os dejetos provenientes de bovinos são ricos em matéria orgânica e micro-organismos patogênicos e, se manejados de forma inadequada, podem ser responsáveis pela poluição do solo e de águas superficiais e subterrâneas. Esses dejetos têm grande importância sanitária e funcionam como nicho ecológico, oferecendo água, abrigo e temperatura a muitos vetores, os quais estão associados a transmissão de várias zoonoses, doenças intestinais e epidêmicas. Esses resíduos também são reservatórios de *Escherichia coli*, usada como indicador de monitoramento na redução de patógenos presentes no esterco animal tratado em biodigestores (LARSEN et al, 1994).

Os dejetos de bovinos são fonte de adubo para a agricultura, no entanto deve-se considerar a continuidade do ciclo biológico de vários patógenos, levando a um potencial risco de contaminação dos animais (AMARAL et al., 2004).

As criações bovinas geram dejetos que podem ser líquidos, sólidos ou mistos. A produção em média de urina e fezes do bovino é de 30 a 35 Kg/animal/dia, podendo chegar a 40 Kg/animal/dia de estrume e 40 Kg/animal/dia de urina (GOMES et al., 2014). Esses dejetos apresentam uma Demanda Química de Oxigênio (DQO) de 18000 mg/L, pH de 7,5; concentração de sólidos totais de 30500 mg/L e concentração de sólidos voláteis de 1200 mg/L (MENDONÇA, 2009).

Embora o uso desses dejetos como adubo em plantações agrícolas seja comum, caso esses resíduos não sejam tratados adequadamente, os mesmos podem causar sérios prejuízos ambientais, atuando como vetores de doenças por meio da contaminação do solo e da água (OLIVER et al., 2008). Desta forma, é

importante o incentivo para o tratamento adequado desses dejetos, com o objetivo de minimizar os impactos ambientais. Diversos estudos e tecnologias têm sido aplicados para agregar valor a esses resíduos, como a implantação de biodigestores para a geração de biogás e biofertilizantes (GOMES et al., 2014).

3.3 APROVEITAMENTO DA BIOMASSA COMO FONTE ALTERNATIVA DE ENERGIA RENOVÁVEL

A biomassa é descrita como a massa total de matéria orgânica presente em um ambiente vital, como as plantas, animais e seus dejetos, matérias orgânicas produzidas em indústrias de alimentos e indústrias de madeira. Em 2001, Staiss e Pereira relataram que os biocombustíveis sólidos, líquidos ou gasosos, provenientes dos elementos primários da biomassa, poderiam ser convertidos em energias térmica, mecânica e elétrica. Uma pequena fração da energia solar é armazenada na forma de biomassa, essa energia é liberada por processos biológicos termoquímicos (SOUZA et al., 2004)

Em países em desenvolvimento, a biomassa é responsável por 35% do total da energia produzida; em países pobres, a biomassa contribui com 90% das fontes de energia de forma não comercial, enquanto em países industrializados é pouco utilizada. Diversos estudos demonstram vantagens no uso da biomassa como fonte de energia, podendo competir com os combustíveis fósseis (GENOVESE et al., 2006).

O Brasil tem grande tradição no uso de fontes renováveis: a energia hidrelétrica contribui com 74% da geração de toda a energia, a energia eólica e a biomassa contribuem respectivamente com 0,4% e 4,7% da geração de energia (BALANÇO, 2011).

Ao contrário dos combustíveis fósseis, a biomassa formada durante o processo da fotossíntese não acumula dióxido de carbono na atmosfera, este será liberado e reaproveitado novamente no processo da fotossíntese para posterior formação da biomassa. (SOUZA et al., 2004).

A geração de energia utilizando a biomassa proveniente de dejetos de animais é uma alternativa tecnológica e promissora, uma vez que diminui o risco ambiental causado por esses resíduos e por ser economicamente viável. Essa

conversão de energia da biomassa é feita por meio da biodigestão anaeróbia, gerando o biogás utilizado em queimadores ou em motores geradores (YADVIKA et al., 2004).

3.4 BIODIGESTORES: UTILIZAÇÃO E TIPOS

A Índia foi o primeiro país a instalar um biodigestor para a produção de biogás, ainda em 1908. A China iniciou seu programa de implantação na década de 50 e em 1992 já contava com 7,2 milhões de unidades (ANDRADE et al.; 2002). No Brasil, os biodigestores rurais surgiram na década de 80 com grande apoio dos Ministérios da Agricultura pecuária e Abastecimento e de Minas e Energia (COELHO et al., 2006).

O biodigestor é um equipamento constituído por uma câmara fechada, que recebe o material orgânico a ser decomposto que produz biogás, o qual fica armazenado na parte superior da câmara (DEGANUTTI et al., 2002). Seu uso favorece a sustentabilidade e integra as práticas agropecuárias por utilizar os dejetos da pecuária transformando-os em energia e adubo, agregando valor e aumentando a produção agrícola (QUADROS et al., 2010). Os principais modelos de biodigestor são o indiano, o chinês e o canadense.

O tipo indiano é caracterizado por um cilindro vertical, construído com tijolos revestidos por cimento e dividido em duas câmaras, onde em uma delas é conectado o tubo de entrada da biomassa e na outra conecta-se o tubo de saída. Possui uma campânula flutuante, que funciona como gasômetro, feita de aço. Este modelo flutua diretamente sobre o lodo em digestão ou em um selo hídrico, que mantém a pressão constante do gás, podendo ser operado de forma contínua, com descarga automática, tendo como vantagem o descarte do uso do tanque de compensação (NISHIMURA, 2009).

Uma desvantagem do biodigestor indiano é o seu alto custo de implantação e manutenção da campânula flutuante, que deve ser metálica, o que favorece a corrosão e diminui a vida útil. Uma alternativa muito utilizada no Brasil é a construção da campânula de fibra de vidro, reduzindo custo final da obra e mantendo bons resultados (ANDRADE et al., 2002). Geralmente utiliza-se dejetos de bovinos e de suínos para seu abastecimento, que deve ser de forma contínua,

sendo que esses resíduos devem ter uma concentração de sólidos totais inferior a 8% (DEGANUTTI et al., 2002).

O modelo chinês é feito de tijolos e totalmente enterrado no solo, com teto em forma de abóboda e desprovido de gasômetro, o que reduz o custo da sua implantação quando comparado ao indiano (NISHIMURA, 2009). Um dos inconvenientes do biodigestor chinês é que, caso o teto abobodado não esteja bem vedado e impermeabilizado, poderá ocorrer vazamento do biogás (DEGANUTTI et al., 2002). Outra desvantagem é a ocorrência de oscilações da pressão do gás, que podem ser altas e não serem suportados pelo equipamento, havendo liberação para a atmosfera. Esse biodigestor não apresenta descarga automática, dificultando o seu manuseio, não sendo, portanto, indicado para instalações de grande porte (ANDRADE et al., 2002). Assim como no modelo indiano, sua alimentação deve ser contínua, com concentração de sólidos totais inferior a 8%, o que evita entupimento e facilita a circulação do material (DEGANUTTI et al., 2002).

O modelo canadense, também conhecido como da marinha ou modelo balão, possui uma base retangular construída de tijolos e um gasômetro feito em manta flexível de PVC que é fixado em uma cinta de concreto que circunda a base e coberto por uma geomembrana sintética de polietileno de alta densidade, revestindo todo o perímetro do biodigestor (CALZA et al., 2015). É de fácil transporte e de baixo custo para implantação podendo ser construído diretamente sobre o terreno, sendo uma vantagem para regiões com nível de lençol freático alto. Possui fácil manutenção e limpeza. Como desvantagem, apresenta uma vida útil curta (em média 5 anos) e seus reatores são mais sensíveis às variações térmicas quando comparados aos outros dois modelos relatados. Para sua implantação é necessário um sistema com lastro, com a finalidade de regular a pressão doadora de gás, e recomenda-se que este tipo de biodigestor seja implantado em locais com predomínio de temperaturas altas e constantes (ANDRADE et al., 2002).

Os biodigestores rurais são, quase sempre, reatores anaeróbios simplificados de primeira geração, e apresentam semelhantes tempos de detenção hidráulica. São projetados para atenderem ao tipo de material pelo qual será operado, com alimentação batelada (ou *batch*), contínuo ou com alimentação mista ou *semi-batch* (ANDRADE et al., 2002).

O tipo batelada é o mais simples, utilizado em casos de obtenção periódica dos resíduos. Já o de alimentação contínua é próprio para materiais de fermentação

fluidos e uniformes, com mão de obra diária e com produção de biogás uniforme e em quantidade maior em relação aos biodigestores alimentados em batelada. Para biodigestor de alimentação contínua é necessário que se acrescente água aos resíduos, para que fiquem mais fluidos, facilitando o funcionamento hidráulico e acelerando o processo de fermentação pelas bactérias metanogênicas. Quando a alimentação é mista utiliza-se mais de um material para alimentar o equipamento, como palha e dejetos de animais (ANDRADE et al., 2002).

Como vantagens da implantação de biodigestores têm-se a geração de energia por meio do uso do biogás, com redução dos gastos na compra de energia. Em comparação com outros sistemas de manejo e tratamento de dejetos, como as lagoas e esterqueiras, os biodigestores exigem menor tempo de retenção hidráulica. Paralelamente ao uso dos biodigestores, obtém-se a produção de biofertilizantes, redução do impacto ambiental e ainda a diminuição na produção de odores causados pelos dejetos; além disso, há ainda a redução da quantidade de dióxido de carbono e de gás metano, com diminuição do efeito estufa (OLIVEIRA, 2004; SALOMON, 2007).

As desvantagens são a dependência das condições climáticas de certas regiões para a produção do biogás e a sensibilidade a descargas de detergentes e desinfetantes. O modelo canadense produz gás com pressão variável, necessitando de um sistema de segurança com queimadores (OLIVEIRA, 2004; SALOMON e TIAGO FILHO, 2007).

3.5 PROCESSO DE BIODIGESTÃO ANAERÓBIA

Biodigestão anaeróbia refere-se ao tratamento da matéria orgânica em condições de anaerobiose, com produção do gás metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2). O processo da biodigestão anaeróbia é um avanço tecnológico, que resulta na produção de biogás e biofertilizante, gerando benefícios socioeconômicos ao produtor rural e contribuindo para a redução dos impactos ambientais causados pelos dejetos animais (MAGALHÃES, 1986).

A degradação da matéria orgânica é feita por micro-organismos procariotos anaeróbios facultativos ou anaeróbios obrigatórios que fazem parte do grupo das bactérias hidrolítico-fermentativas, bactérias acidogênicas, bactérias acetogênicas

responsáveis pela produção de hidrogênio e arqueas metanogênicas (ALVAREZ et al., 2006; CÔTÉ et al., 2006; ORRICO JUNIOR et al., 2010). As bactérias acidogênicas ou fermentativas são responsáveis pelo processo inicial, hidrolisando os complexos orgânicos por meio de enzimas extracelulares, o que resulta na formação de ácidos graxos de cadeia curta (ácidos acético, propiônico e butírico), H_2 e CO_2 ; estes produtos serão utilizados pelas bactérias acetogênicas na produção de H_2 , CO_2 e acetato, que serão metabolizados pelas bactérias metanogênicas para geração do biogás, CH_4 e CO_2 (COLEN, 2003).

O processo de biodigestão pode ser dividido em 4 etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

A fase hidrolítica consiste na transformação dos compostos de alto peso molecular e dos compostos insolúveis, como carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, em compostos solúveis menores, facilitando o acesso às células bacterianas (AQUINO; CHERNICHARO, 2005). As bactérias fermentativas, também conhecidas como hidrolíticas dos gêneros, envolvidas nesta fase secretam enzimas e degradam proteínas a aminoácidos, carboidratos a açúcares solúveis, e lipídeos a ácidos graxos de cadeia longa e glicerina. A velocidade da hidrólise influencia na conversão do material orgânico em biogás (MATA-ALVAREZ et al., 2000; SPEECE, 1983, VAN HAANDEL; LETTINGA, 1994)

Na fase de acidogênese, os produtos gerados na fase hidrolítica são absorvidos pelas bactérias fermentativas, a maioria anaeróbias estritas, pertencentes ao gênero *Clostridium*, *Ruminococcus* e *Bifidobacterium*, e posteriormente excretados como ácidos graxos voláteis, álcoois, ácido lático, CO_2 , H_2 , NH_3 , H_2S e outros. Nesta etapa é importante que todo material tenha sido hidrolisado na fase anterior. Na fase de acidogênese, os produtos gerados na fase hidrolítica são absorvidos pelas bactérias fermentativas, a maioria anaeróbias estritas, pertencentes ao gênero *Clostridium*, *Ruminococcus* e *Bifidobacterium*, e posteriormente excretados como ácidos graxos voláteis, álcoois, ácido lático, CO_2 , H_2 , NH_3 , H_2S e outros. Nesta etapa é importante que todo material tenha sido hidrolisado na fase anterior (VAN HAANDEL; LETTINGA, 1994).

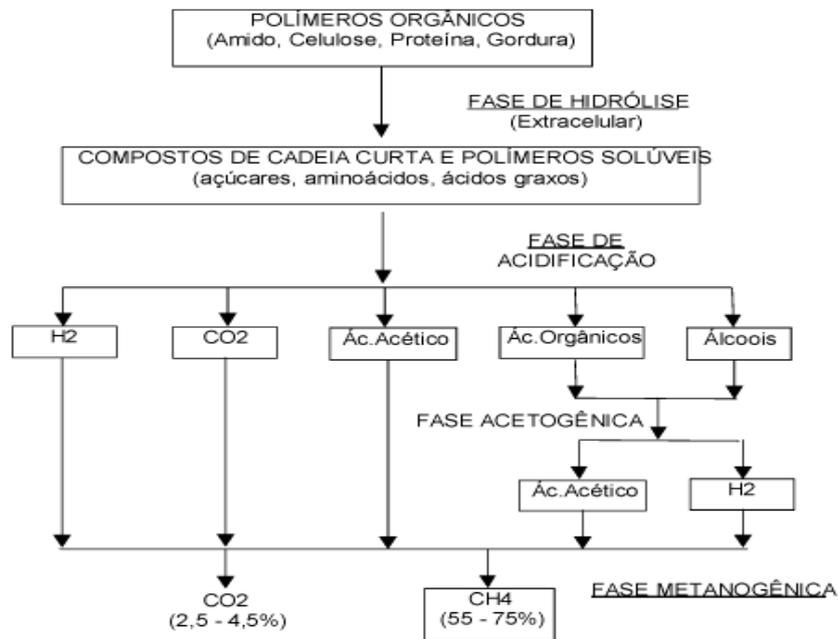
Na fase seguinte, a acetogênese, os micro-organismos sintróficos acetogênicos transformam o propionato e o butirato em acetato, hidrogênio (H_2) e CO_2 . São denominados de sintróficos por serem dependentes de micro-organismos consumidores de H_2 . Na presença de CO_2 e H_2 pode ocorrer a homoacetogênese, ou

seja, a produção de acetato a partir de CO_2 e H_2 , uma reação não muito comum já que os micro-organismos homoacetogênicos são superados pelos metanogênicos (AQUINO; CHERNICHARO, 2005). As espécies bacterianas participantes na acetogênese incluem *Acetobacterium woddii*, *Clostridium bryantii*, *Desulfovibrio* sp, *Desulfotomaculum* sp, *Syntrophomonas wolinii*, *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophusbus wellii* (ZEHNDER, 1988).

A última fase, que é a metanogênese, é caracterizada pela redução do ácido acético e formação de metano pelas arqueas metanogênicas acetróficas (ou acetoclásticas), ou a redução de CO_2 pelas arqueas metanogênicas hidrogenotróficas. A etapa metanogênica limita o processo de biodigestão, sendo as arqueas metanogênicas acetróficas responsáveis por essa limitação (STEIL, 2001; VANHAANDEL, LETTINGA, 1994).

O processo de biodigestão anaeróbia pode ser resumido pelo esquema abaixo:

Figura 1 – Esquema da digestão anaeróbia de matéria orgânica complexa



Fonte: Souza,1999.

3.5.1 Fatores que afetam a biodigestão

- a) Temperatura:** Influencia diretamente na velocidade do metabolismo bacteriano, no qual a atividade enzimática é reduzida a 10°C e nula acima dos 65°C. A faixa dos 20°C à 45°C corresponde à fase mesófila, enquanto que entre os 50°C e 65°C, temos a fase termofílica. A temperatura de trabalho resultará do compromisso entre o volume de gás a produzir, o grau de fermentação e o tempo de retenção. A temperatura do substrato influencia na velocidade do processo anaeróbio, atuando no crescimento dos micro-organismos. Biodigestores operando na faixa termofílica produzem maior quantidade de biogás e em um tempo menor se comparado à faixa mesofílica (BERTOZZO, 2013; LUCAS JÚNIOR et al., 1987).
- b) pH:** Segundo Specce (1983) o valor de pH deve estar entre 6,5 e 8,2 para que não haja inibição da metanogênese, uma vez que as bactérias metanogênicas são as mais sensíveis a variações de pH.
- c) Disponibilidade de nutrientes:** Íons inorgânicos são essenciais para a estimulação do metabolismo microbiano anaeróbio. A deficiência de ferro, cobalto e níquel influenciam negativamente no tratamento dos efluentes (SPEECE, 1983). Em estudo feito por Kelleher et al. (2002), a adição de 20 mM de FeSO_4 em biodigestores abastecidos com cama de frango, levou ao acréscimo de 42% na quantidade de metano produzido, com aumento nas taxas de degradação de ST, SV, ácidos graxos voláteis e aumento das bactérias metanogênicas.
- d) Composição do material:** A alimentação dos animais influencia a composição do resíduo gerado, sendo um fator crucial na produção do biogás. Moller et al. (2004), mostraram que animais alimentados com grande quantidade de alimentos volumosos produziram dejetos com componentes fibrosos, levando a uma menor eficiência da biodigestão e uma produção mais lenta do biogás.

- e) Concentração de ácidos graxos voláteis (AGV):** Os AGVs são produtos intermediários da biodigestão anaeróbia, cujas altas concentrações podem levar à instabilidade entre as populações microbianas anaeróbias. Segundo Bigeriego et al. (1997), grandes quantidades de ácidos reduzem o pH, levando à redução das bactérias metanogênicas.
- f) Teor de sólidos totais (ST):** Lucas Jr. et al. (1993), avaliando biodigestores modelo batelada, encontraram uma maior produção de biogás quando o teor de Sólidos Totais do substrato foi menor (8%) em relação a um teor de ST de 16%.
- g) Compostos tóxicos, resíduos de antibióticos, desinfetantes e pesticidas:** São substâncias que influenciam de forma negativa a população microbiana, uma vez que estes resíduos misturam-se aos dejetos após a lavagem das instalações (AMORIM, 2002).
- h) Inóculo a ser utilizado:** Segundo Torres Castillo et al. (1995), um melhor rendimento do biodigestor é obtido quando são utilizados dejetos suínos e bovinos.
- i) Tempo de Retenção Hidráulica:** É o tempo necessário para a amostra ser digerida e se dá quando há a máxima produção do biogás, o que influencia diretamente na melhor qualidade do biofertilizante. É determinado pela relação entre o volume do digestor e o volume diário introduzido (volume de carga = água + matéria orgânica) (MAGALHÃES, 1986).

3.6 PRODUÇÃO DO BIOGÁS

O biogás é também chamado de gás dos pântanos, foi descoberto em 1667, mas tornou-se notório em 1884, quando Louis Pasteur apresentou o trabalho de um dos seus alunos à Academia de Ciências, que discutia a fermentação da matéria como fonte de energia e aquecimento (PECORA, 2006).

Nos últimos 150 anos, o uso em excesso do petróleo pelo homem levou a um grande desperdício de energia e ainda contribuiu para alterações climáticas e ambientais (SACHS, 2007). Em virtude do crescimento populacional, do desenvolvimento e implantação de modernas práticas agrícolas e industriais, houve um aumento da demanda de energia (SEIXAS et al., 2002). Essa situação é alarmante devido à escassez dos recursos fósseis. Desta forma, tem-se buscado outras fontes de energia, como o uso dos dejetos animais para a produção do biogás, por meio do processo de biodigestão anaeróbia (OLIVA et al., 2002).

A produção do biogás é uma potencial solução para redução da emissão dos gases do efeito estufa no agronegócio, destinado ao desenvolvimento rural sustentável (MIELE et al., 2014) e ainda é muito vantajosa, principalmente ao meio ambiente, por diminuir a poluição causada pelos dejetos animais. No Brasil, as condições climáticas favorecem a produção do biogás e dos biofertilizantes (MOURA; PANNIR SELVAM, 2006).

O biogás é um gás composto por cadeias curtas de hidrocarbonetos, constituído por 60% metano, 35% CO₂ e 5% de outros gases, insolúvel em água e sua combustão é livre de resíduos, resultante da fermentação anaeróbia de dejetos animais, resíduos vegetais, lixo industrial ou residencial em condições adequadas (LIVORATTI, 2009).

Os resíduos pecuários produzidos nas propriedades rurais são uma fonte significativa para a produção de biogás, o qual contribui para o desenvolvimento sustentável nas zonas rurais e ainda proporciona aos agricultores novas oportunidades de renda (CERVI et al., 2010)

Os tratamentos químico, térmico e enzimático dos dejetos animais são uma forma de aumentar a produção do biogás, favorecendo a rentabilidade do processo de biodigestão anaeróbia. Castrilón e colaboradores (2013), mostraram que os dejetos adicionados de glicerina otimizaram a produção do biogás, e glicerina como fonte de carbono, o que favorece a eficácia do processo.

A geração de energia térmica, elétrica e/ou mecânica pode ser através do biogás, contudo sua principal utilização é na substituição dos gases de origem mineral, como Gás Liquefeito de Petróleo (GLP), usado como gás de cozinha, Gás Natural (GN), usado em equipamentos domésticos, e Gás Natural Veicular (GNV), podendo ser usado também em fogões, lampiões, motores de combustão interna, geladeiras e etc. (biogás energia limpa). Com a geração de energia pelo biogás,

pode-se obter os Certificados de Emissões Reduzidas, conhecidos como créditos de Carbono, que são certificados emitidos indicando que houve uma redução da emissão de gases do efeito estufa. Apesar da queima do metano liberar dióxido de carbono (CO₂), este processo continua valioso, pois metano tem um impacto no efeito estufa 21 vezes mais danoso que o CO₂ (RANZI; ANDRADE, 2004).

3.7 PRODUÇÃO DO BIOFERTILIZANTE E SUA UTILIZAÇÃO

Considera-se biofertilizante o efluente produzido pelo biodigestor por meio da fermentação anaeróbia da biomassa durante o processo da biodigestão. É um produto líquido enriquecido com matéria orgânica, cuja utilização é a adubação do solo; sua produção tem um baixo custo na agricultura e, em comparação com o uso de fertilizante químico, não gera problemas ao solo, como acidez e degradação do mesmo, pelo fato de ter um pH levemente alcalino (BARBOSA, LANGER, 2011). Segundo o BRASIL (2004), “biofertilizante é definido como um produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre toda ou parte da planta cultivada, elevando sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante”. O seu valor hormonal ou estimulante”. O seu reconhecimento como insumo agrícola se deu através do decreto 4.954, de 14 de janeiro de 2004.

O biofertilizante contém células vivas ou latentes de micro-organismos aeróbios, anaeróbios e fermentadores (bactérias, leveduras, algas e fungos filamentosos), metabólitos e minerais orgânicos em solução aquosa (MEDEIROS; LOPES, 2006). As proteínas, enzimas, antibióticos, vitaminas, toxinas, fenóis, ésteres e ácidos produzidos por micro-organismos constituem os metabólitos (SANTOS, 1996). À medida que ocorre a maturação dos biofertilizantes, há a redução desses metabólitos, permanecendo apenas os nutrientes minerais (MEDEIROS; LOPES, 2006).

O método de preparo, o tempo de decomposição, a população microbiana, temperatura, pH e, principalmente, o material que dá origem ao fertilizante, interferem na sua composição química (MEDEIROS e LOPES, 2006; SANTOS, 1992).

O processo de fermentação na produção de biofertilizantes é feita por micro-organismos que apresentam 4 fases de crescimento celular: fase de latência, crescimento exponencial, fase estacionária e morte celular. É um processo contínuo, onde cada micro-organismo degrada compostos para o outro micro-organismo, desenvolvendo uma relação de comensalismo que oferece benefícios para ambos (D'ANDREA e MEDEIROS, 2002).

Na geração de 365 Kg de biofertilizante obtido de esterco bovino por ano, tem-se por volta de 0,5 kg de nitrogênio, comparando-se com o esterco fresco. Uma tonelada de dejetos de suínos gera em média 7 Kg de nutrientes, principalmente nitrogênio, fósforo e potássio, dentre suas várias utilidades destaca-se a adubação da cultura de milho para alimentação animal (ANDRADE et al., 2002).

O uso dos biofertilizantes apresenta vantagens, como a capacidade de retenção de umidade pelo solo, favorecendo o crescimento das plantas no período de seca; melhoria na estrutura do solo, estimulando a oxidação da matéria orgânica pelos micro-organismos do solo; aumento da velocidade de decomposição dos micro-organismos e protozoários, facilitando a assimilação dos nutrientes pelas plantas; presença de certos minerais essenciais ao crescimento das plantas (BERTOZZO, 2013; CAEEB, 1981).

Os biofertilizantes apresentam a propriedade de controlar doenças em plantas, agindo das seguintes maneiras: antibiose (presença de antibióticos em sua composição) competição (presença da comunidade microbiana), indução de resistência (tanto microbiana como por compostos presentes), ação direta ou indireta, fornecendo nutrientes às plantas (BETTIOL; GALVÃO; TRATCH, 1998). Seu uso tem sido indicado em cultivos orgânicos, na preservação do equilíbrio nutricional de plantas, no controle de pragas e doenças (BETTIOL, 2001; SANTOS, 2001).

A utilização de resíduos orgânicos como fertilizantes é uma forma de transformar fontes de contaminação ambiental em adubos, no intuito de minimizar a insustentabilidade agrícola (FOLEY et al., 2011). A aplicação de efluentes, águas residuárias e dejetos animais em áreas de cultivo fornecem um destino apropriado para estes resíduos e ainda reduz o uso de fertilizantes químicos (BETTIOL; GALVÃO; STRATCH, 1998).

3.8 PREVALÊNCIA E PERSISTÊNCIA DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS NOS BIOFERTILIZANTES

A aplicação do biofertilizante no solo e nas plantas apresenta inúmeros benefícios, mas é de suma importância sua avaliação sanitária. Vários estudos têm verificado a presença e persistência de patógenos importantes nos efluentes gerados pelos biodigestores (WEHR, 2014).

Estudos têm demonstrado que *Clostridium* spp e *Bacillus* spp sobrevivem às etapas de biodigestão anaeróbia, podendo ser disseminados através dos efluentes gerados pelos biodigestores. Um estudo feito por Bagge et al. (2010), em uma usina de biogás, identificou a presença do *Clostridium botulinum* nos dejetos de animais que iriam alimentar os biodigestores, correlacionando a propagação desses patógenos nos efluentes.

Um trabalho feito por Cao et al. (2013), relatou a presença de fungos, actinobactérias e *Phytophthora fluorescens* na composição de esterco bovino, antes e após a biodigestão, destacando que houve redução dos fungos; contudo, populações de *Bacillus* spp e *Pseudomonas* spp permaneceram após o processo de biodigestão.

Em um trabalho realizado na Suécia, com 4 biodigestores em escala real, todos os efluentes gerados apresentaram *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp e ainda bactérias esporuladas, como *Clostridium* spp e *Bacillus* spp (BAGGE et al., 2005).

Thomson e Allen (1976) e Werres et al. (2007), destacaram a sobrevivência de patógenos de solo, pertencentes aos gêneros *Phytium* e *Phytophthora*, nos efluentes, a água se reutilizada sem o devido tratamento pode disseminar esses micro-organismos em pomares e viveiros.

Seixas (1994), analisando os afluentes e efluentes de biodigestores operados à temperatura ambiente com TRH de 50 dias abastecidos com dejetos de suínos, verificou a permanência de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, além de protozoários como *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e *Balantidium coli*.

Um estudo feito por Mateu et al. (1992), com biodigestores contínuos com TRH de 18 dias e biodigestão mesofílica, evidenciou uma redução de 99% de coliformes fecais de resíduos de suínos. Outro trabalho feito por Schoken-Iturrino et

al. (1995), constatou que houve a eliminação de *Escherichia coli* no efluente no TRH de 35 dias, não sendo observada a mesma condição com TRH de 20 dias. Outros patógenos, como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp, *Campylobacter* e *Vibrio*, também são encontrados em dejetos animais ou em efluentes gerados por biodigestores (RESENDE, 2013).

Um estudo feito por Garcia Feliz et al. na Espanha em 2007, determinou a prevalência de *Salmonella* entérica em granjas de suínos. *Salmonella* sp é predominante em efluentes, pois estão no meio ambiente e é excretada por pelo menos 0,1% da população animal (VENGLOVSKY; MARTINEZ; PLACHA, 2006). É necessário que mais estudos sejam realizados tomando como alvo de pesquisa a prevalência e persistência de patógenos nos efluentes gerados pelos biodigestores. É importante conhecer a microbiota presente nos biofertilizantes, pois isso possibilita um manejo mais adequado e seguro desses produtos, com a eliminação de micro-organismos potencialmente patogênicos (MEDEIROS; WANDERLEY; WANDERLEY, 2003).

3.9 POPULAÇÃO MICROBIANA PRESENTE NOS BIODIGESTORES

Os micro-organismos existentes nos biodigestores são organismos procariotos e estão enquadrados nos domínios *Archaea* e *Bacteria*. O Domínio *Archaea* apresenta 5 filos: *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota*, *Thaumarchaeota* e *Aigarchaeota*. (BROCHIER-ARMANET; FORTERRE; GRIBALDO, 2011). As arqueias do filo *Euryarchaeota* incluem as metanogênicas, pertencentes às classes *Methanobacteria* e *Methanomicrobia* que estão nas ordens *Methanobacteriales* e *Methanosarcinales* das famílias *Methanobacteriaceae* e *Methanosarcinaceae* (SOWERS, 1995).

As arqueas metanogênicas são de crescimento lento e extremamente dependentes de condições ótimas para crescimento. Exigem vitaminas, minerais e fontes de enxofre, entretanto não são exigentes em relação às fontes de carbono. Elas formam metano como principal produto de seu metabolismo (PAZINATO et al., 2010). Alguns autores relataram o uso de estratégias para a manutenção dessas condições ótimas, como adição de nutrientes (TAKASHIMA e SPPECE, 1990), adição de sulfato ferroso para controle do potencial redox (THIELE e ZEIKUS, 1988),

remoção de CO₂ da fase líquida para manter o pH (VOOLAPALLI e STUCKEY, 1998).

No Domínio *Bacteria* estão os filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*; das classes *Clostridia*, *Bacilli* e *Bacteroidia*; que estão nas ordens, *Clostridiales*; *Bacteroidales*; *Bacillales*. Os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* estão em ambientes anaeróbios, fermentando celulose e amido. A celulose quando degradada leva a formação de produtos menos complexos, como monômeros de açúcar, podendo ocasionar uma mudança na população microbiana (KRAUSE et al., 2008).

Na fase inicial de hidrólise participam as bactérias fermentativas e ou anaeróbias estritas, conhecidas como bactérias hidrolíticas. Estão enquadradas nos gêneros *Clostridium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides* e *Fusobacterium* (CHERNICHARO, 2007).

Na fase de fermentação acidogênica há a participação dos gêneros *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, entre outros (SANT'ANNA, 2010).

Na fase acetogênica, as bactérias estabelecem uma simbiose com as arqueas metanogênicas e com as bactérias homoacetogênicas. Simbiose é a colaboração de duas ou mais espécies de micro-organismos para favorecer uma reação química, os gêneros mais comuns que participam nessa colaboração são *Syntrophobacter* e *Syntrophomonas* (CHERNICHARO, 2007).

As bactérias homoacetogênicas são dos gêneros *Clostridium* e *Acetobacterium* (SANT'ANNA, 2010).

Na fase metanogênica as espécies incluem uma grande variedade morfológica (Cocos, bastonetes, cocos irregulares e bastonetes longos e irregulares). Nos biodigestores anaeróbios encontram-se os gêneros; *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanobrevibacter*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum* e *Methanotrix* (SANT'ANNA, 2010).

É importante conhecer a cinética da biodigestão para estimar o crescimento microbiano e a produção do efluente. Fatores nutricionais, físicos e físico-químicos interferem no processo, levando a escolha de um grupo de micro-organismos mais adaptados (CHERNICHARO, 1997).

3.10 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

Na microbiologia clássica, as bactérias são identificadas por provas bioquímicas, preparadas manualmente; no entanto essa identificação pode ser feita por métodos automatizados, que permitem analisar vários substratos disponibilizando um tempo menor quando comparado ao método manual (BECKER, EIFF, 2011).

Por meio dos métodos manuais e automatizados vários gêneros e espécies bacterianas vêm sendo descritos. A identificação baseada nas características fenotípicas torna-se cada vez mais difícil principalmente para identificação de cocos Gram-positivos. Uma alternativa seria a associação das provas bioquímicas com métodos moleculares, de modo a aumentar a eficácia da identificação bacteriana (KIM et al., 2008). O sequenciamento do gene rDNA 16S permite identificar as bactérias de forma mais confiável além de oferecer uma outra vantagem que é a identificação de bactérias intestinais não cultiváveis (TRINGE et al., 2008).

3.10.1 Métodos clássicos para identificação de micro-organismos

O isolamento e a caracterização de isolados bacterianos por métodos laboratoriais clássicos de microbiologia envolvem cultura e testes fenotípicos os quais são baseados em diferenças metabólicas existentes entre as espécies bacterianas. As culturas são técnicas de recuperação dos patógenos, no qual há a multiplicação de células viáveis em escala logarítmica, com posterior amplificação das amostras. (KUMAR et al., 2006). Apesar da maioria das espécies bacterianas não serem passíveis de cultivo, este ainda é utilizado para o diagnóstico, caracterização da sensibilidade a antimicrobianos na maioria dos laboratórios de análises clínicas, que trabalham com amostras humanas e de animais.

A identificação bacteriana por meio de provas bioquímicas tradicionais, são trabalhosas e demoradas podendo levar mais de 20 horas para a liberação do resultado ao passo que uma análise de PCR pode ser concluída em até 4 horas (ZANGENAH et al., 2013). Os testes bioquímicos são projetados para detectar a presença de enzimas produzidas pelas bactérias. Existem vários tipos de testes bioquímicos como por exemplo, os que detectam enzimas do catabolismo de

aminoácidos envolvidas no processo de descarboxilação e desidrogenação, testes de fermentação entres outros. (TORTORA et al., 2016)

Para a identificação do gênero *Enterococcus* Facklan e Collins em 1998, propôs um esquema o qual ainda é muito utilizado, com algumas variações. Este esquema identifica cocos Gram-positivos, catalase negativos, bile esculina positivos e pyrrolidonilaril amidase (PYR) positivos, juntamente com a provas de fermentação com diferentes carboidratos (arabinose, lactose, manitol, rafinose, ribose, sacarose, sorbitol, sorbose e xilose), desaminação de arginina, verificação de motilidade, detecção de pigmento amarelo, crescimento em 0,4% de telurito e crescimento em piruvat. Como o número de provas bioquímicas é bastante expressivo, alterações foram propostas para facilitar a identificação e com isso diminuir o número de provas bioquímicas (LIGOZZI et al., 2002).

O método mais utilizado para a identificação e quantificação de coliformes totais e coliformes a 45 °C (ou termotolerantes) é o método clássico de tubos múltiplos, ou “Número Mais Provável” (NMP) que não determina um número absoluto de micro-organismos mas sim um número aproximado destes em uma determinada amostra (FRANCO e LEITE, 2006). Este método convencional vem sendo substituído por técnicas mais rápidas (HUNT e RICE, 2005), com um perfil de sensibilidade e especificidade maiores que das técnicas convencionais. A incorporação de substratos com indicadores cromogênicos e/ou fluorogênicos torna a identificação mais rápida devido à eliminação da fase de subcultivos e testes para identificação de certos micro-organismos (MANAFI e KREMSMAIER, 2001).

A utilização de substratos cromogênicos determinam simultaneamente coliformes totais e termotolerantes presentes na amostra, devido a utilização msomente de um meio de cultura, proporcionando uma maior rapidez do resultado.

Os substratos fluorogênicos permitem detectar coliformes totais e *E. coli* em amostras líquidas e sólidas. A cor azul verde do caldo indica a presença de coliformes, e a fluorescência azul sob luz UV determina a presença de *E. coli* que é confirmada pelo teste do indol (MERCK, 2009).

3.10.2 Sistemas automatizados e semi-automatizados para identificação de micro-organismos

A partir da segunda metade da década de 80 surgiram no mercado novas técnicas automatizadas que facilitaram a identificação dos micro-organismos e interpretação dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos.

Galerias contendo provas bioquímicas, são utilizadas para a inoculação das bactérias que posteriormente são incubadas, os resultados são analisados e anotados em formulário próprio. Um perfil numérico é criado para cada resultado baseado na confiabilidade de cada teste, a interpretação dos resultados é computadorizada e fornecida pelos fabricantes. Hoje em dia vários laboratórios dispõem destes sistemas para identificação de bactérias Gram positivas e Gram negativas (SISTEMAS, 2002; BIOMÉRIEUX, 2005).

3.10.3 Métodos moleculares para identificação de micro-organismos

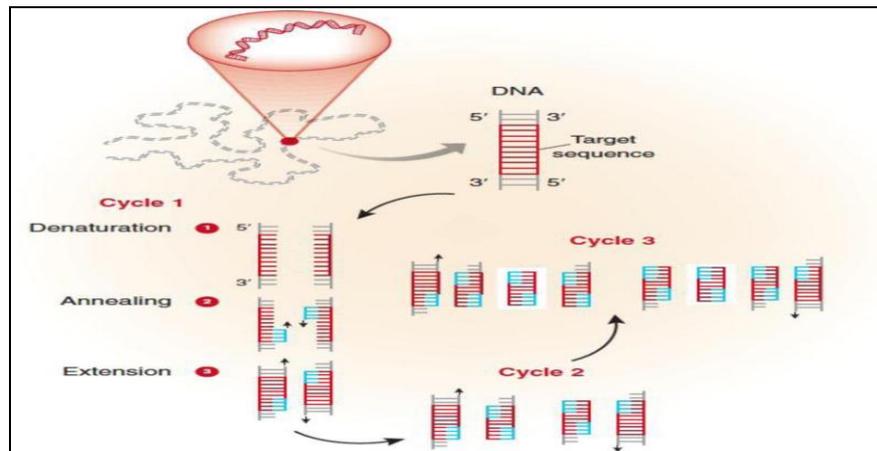
A implementação dos métodos moleculares permite a obtenção, a partir de um único fragmento de DNA ou de RNA, de milhões de cópias idênticas, garantindo suprimentos de material para sequenciamento, produção de sondas em larga escala entre outros (RUOFF et al., 1990).

A técnica da PCR promove a amplificação de um segmento de DNA específico. Os elementos necessários para a execução da PCR são matriz de DNA, oligonucleotídeos iniciadores, nucleotídeos (adenina, timina, citosina e guanina) e a enzima DNA polimerase. A função dos oligonucleotídeos iniciadores é especificar o fragmento exato de DNA a ser amplificado. Os oligonucleotídeos são pequenos fragmentos de nucleotídeos com uma sequência de DNA complementar ao fragmento alvo do gene a ser detectado e amplificado (AVASHIA; GARYBYAN, 2013).

A reação da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é levada ao termociclador, que amplifica o DNA por meio da repetição de ciclos de temperatura, onde ocorre primeiramente a desnaturação e separação das duas cadeias complementares de DNA seguida pela hidridização ou anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores que se ligam ao segmento de DNA alvo devido ao

decaimento da temperatura. Em seguida há a duplicação, com a elevação da temperatura, o que faz com que a enzima DNA polimerase estenda a cadeia formada pelos oligonucleotídeos iniciadores por meio da adição de nucleotídeos. O número de moléculas de DNA copiadas tende a se duplicar a cada repetição dessas três etapas. O esquema está evidenciado na Figura 2.

Figura 2 – Esquema do princípio da técnica da PCR



Fonte: Garibyan e Avashia (2013)

A utilização do gene RNA ribossomal tem sido padrão para a classificação taxonômica molecular. O gene 16S ribossomal está presente em todos os procariontes e é utilizado para caracterizar a composição bacteriana de vários nichos ecológicos (PACE, 1997). Este gene preserva regiões que exercem a função de iniciador de amplificação e também inclui nove regiões variáveis (V1-V9), facilitando a diferenciação entre os membros de um mesmo táxon (WOESE, 1987). Com a incorporação de novas tecnologias para o sequenciamento de DNA, a extensão dos segmentos se aperfeiçoaram, fazendo desta técnica uma excelente opção para a identificação microbiana (TRINGE; HUGENHOLTZ, 2008). Contudo, a acurácia do PCR para diferenciação de espécies dentro de alguns gêneros bacterianos, com por exemplo *Enterococcus*, pode não ser satisfatória exigindo a utilização de métodos complementares (TYRRELL et al., 1997).

3.11 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos são substâncias de baixo peso molecular capazes de eliminar (ação bactericida) ou inibir o crescimento e a reprodução das bactérias. (KONEMAM et al., 2008)

Os antimicrobianos são drogas muito utilizadas na clínica veterinária e seu uso descontrolado pode levar a um aumento da resistência bacteriana, com consequentes agravos à saúde pública (SÁ, 2012).

A resistência a antimicrobianos se refere àqueles micro-organismos que não são inibidos por concentrações de drogas antimicrobianas alcançadas no sangue ou tecidos e que, normalmente, seriam suficientes para inibir ou eliminar a maioria dos micro-organismos alvo (RODRIGUEZ et al.; 2000).

A resistência pode ser natural, por características intrínsecas, e, por isso, presentes em todas as estirpes, ou adquirida, devido à mutação ou recombinação genética, através da aquisição de genes de resistência por meio de transferência horizontal de genes (MARTINEZ e BAQUERO, 2000). Alguns micro-organismos apresentam fenótipo de baixa susceptibilidade aos antimicrobianos (BONOMO e SZABO, 2006). A resistência pode ser simples, quando o micro-organismo é resistente a apenas uma droga, ou múltipla, quando o micro-organismos resiste a várias drogas. Essa múltipla resistência em patógenos humanos é grave e pode causar infecções de difícil tratamento (AMINOV; MACKIE, 2007).

O aumento na produção em bovinocultura e em suinocultura favoreceu o surgimento de várias doenças. O uso dos antibióticos, principalmente na ração animal, veio para controlar essas enfermidades. Entretanto, seu uso indiscriminado favorece o aparecimento de linhagens bacterianas cada vez mais resistentes (FEDORKA-CRAY et al., 1999)

Em 1950, foi descoberto que antimicrobianos usados em doses menores que as doses terapêuticas favoreciam o aumento da produtividade do animal, funcionando como promotores de crescimento (WITTE, 2000). Promotores de crescimento são substâncias naturais ou sintéticas, colocadas nas rações animais, com o intuito de aumentar o peso do animal, melhorar a alimentação e a reprodução contribuindo para a redução da mortalidade (NICODEMO, 2001). Cerca de 90% dos antimicrobianos de uso veterinário são administrados por via oral a suínos, bovinos e aves, por meio da ração e da água, com finalidade de aumentar o peso do animal,

melhorar a produção da carne e reduzir o volume de dejetos. Houve um aumento de *Escherichia coli* após o uso de carbodox, como preventivo da disenteria suína e no tratamento de salmonelose. A utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento tem contribuído para aumentar a resistência de micro-organismos isolados na população humana. *Escherichia coli*, de origem animal e resistente a antimicrobianos, pode afetar humanos pela exposição ao ambiente ou ainda na cadeia alimentar (VAN DEN BOGAARD et al.; 2000).

Bahnsen et al. (1999), analisaram 2174 amostras de fezes de suínos, identificando 352 amostras de *Salmonella* sp. Estas bactérias foram submetidas ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos e apresentaram resistência a amicacina, ciprofloxacino, ceftriaxone e trimetropim/sulfametoxazol.

A multirresistência de *Salmonella*, devido a dietas ricas em antimicrobianos, representam um risco à saúde pública (LIMA, 2007).

As bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* e *Campylobacter* sp., têm sido objeto de estudo de vários trabalhos e programas de monitoramento sobre resistência a antimicrobianos (PALERMO-NETO; TITZE, 2002).

Estudos demonstram a relação entre o uso de antimicrobianos de forma abusiva em animais de produção e o aparecimento de patógenos humanos cada vez mais resistentes aos antimicrobianos, o que representa um grave problema de saúde pública, dificultando a terapia das doenças em animais e humanos (MOTA et al.; 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS ISOLADOS

As linhagens bacterianas utilizadas no presente estudo foram previamente isoladas em trabalho anterior realizado por Fernandes (2016) onde foram utilizados oito biodigestores construídos de PVC, cilíndricos e com volume médio de 60 litros, instalados ao ar livre, na sede da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora. Quatro destes biodigestores foram alimentados com dejetos de bovinos e quatro com dejetos de suínos, nos períodos inverno e verão, do ano de 2014. Os dejetos utilizados para o abastecimento foram provenientes do Departamento de Zootecnia, do Instituto Federal Sudeste de Minas, campus Rio Pomba; os dejetos foram acondicionados em tambor plástico e transportados até a sede da Embrapa Gado de Leite, para operação dos biodigestores.

As amostras compostas dos efluentes foram coletadas no período de 30, 45 e 60 dias, totalizando o tempo de retenção hidráulica de 60 dias. Posteriormente foram realizadas as análises físico-químicas para determinação da demanda bioquímica do oxigênio (DBO) e da demanda química do oxigênio (DQO), teores de sólidos voláteis, sólidos totais, pH, alcalinidade e acidez volátil. As amostras dos afluentes e efluentes foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Rúmen, na sede da Embrapa Gado de Leite, onde foram realizadas As diluições seriadas (10^{-2} a 10^{-6}) em solução salina (0,9 % NaCl), para posterior semeadura, pelo método de spread plate, nos seguintes meios seletivos aeróbios:

- a) Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB): para contagem total de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, fermentadores e não-fermentadoras de lactose
- b) Ágar Hipertônico Manitol (MAN): para contagem de cocos Gram-positivos. catalase positiva (CGP/C+)
- c) Ágar Bile Esculina (BE) suplementado com 0,01% de azida sódica: para contagem de cocos Gram-positivos, catalase negativa (CGP/C-).

Após contagem em placa, nos respectivos meios de cultura, seis unidades formadoras de colônias de cada placa foram selecionadas e novamente semeadas

nos meios seletivos para confirmação da pureza. Após incubação por 24h a 37°C, colônias isoladas foram transferidas para placas contendo meio *Brain Heart Infusion* (BHI) e, após crescimento, foram preparados os estoques em meio de congelamento com glicerol 20%. Os isolados foram mantidos em freezer a -20 °C até o momento da utilização.

No presente trabalho antes de cada experimento, as amostras previamente isoladas foram reativadas em meio BHI líquido, incubadas a 37°C, por 24 h.

4.2 AVALIAÇÃO MORFO-TINTORIAL PELA COLORAÇÃO DE GRAM

Para confirmação da morfologia, culturas em fase estacionária foram submetidas à coloração de Gram.

As amostras que não estavam puras foram reisoladas utilizando meio Triptona de Soja (TSA), sendo novamente realizada a coloração de Gram para avaliação da amostra. As amostras não purificadas foram então excluídas do experimento.

4.3 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA POR MÉTODO BIOQUÍMICO SEMI-AUTOMATIZADO

Para a identificação bioquímica foi utilizado 59 isolados os quais foram inicialmente reativados em caldo BHI e depois inoculados em placas contendo meio TSA para CGP (n=48) e Agar MacConkey para BGN (n=11), incubadas a 37°C por 24h. Após o período de incubação, as colônias de CGP foram transferidas para o Kit comercial BBL *Crystal Gram-Positive Identification System*® seguindo as recomendações do fabricante. Este sistema é composto de painéis, bases, e fluidos de inóculos. Cada painel contém 29 substratos desidratados (4 MU-β-D glicosídeo, L-valina-AMC, 4 MU-n-acetil- β-D-Glicosaminida, 4 UM-fosfato, 4 MU- β-D glicoronídeo, L-isoleucina,-AMC, trealose, lactose, metil α e β- glicosídeo, sacarose, manitol, maltotriose, arabinose, glicerol, frutose, p-n-p- β-D- glicosídeo, p-n-p-β-D-celobiosídeo, prolina, e leucina-p-nitroalínida, p-n-p-fosfato, p-n-p-α-D- maltosídeo,

ONPG e p-n-pl- α -D-galactosídeo, uréia, esculina, e arginina) e um controle de fluorescência.

Para as amostras de BGN (n=11) foi utilizado o Kit comercial BBL *Enteric/Non Fermenter Identification System*[®]. Este sistema identifica bactérias Gram negativas da família *Enterobacteriaceae*, e bactérias Gram negativas não-fermentadoras. O sistema é constituído por 30 substratos desidratados (arabinose, manose, sacarose, melibiose, ramnose, sorbitol, manitol, adonitol, galactose, inositol, p-n-p-fosfato, p-n-p- α - β -glicosídeo, p-n-p- α - β -galactosídeo, prolina nitroalínido, p-n-p bis-fosfato, p-n-p-xilosídeo, p-n-p- α -arabinosídeo, p-n-p-fosforilcolina, p-n-p-glucoronídeo, p-n-p-N-acetil-glucosaminida, γ -L-glutamil p-nitroanilido, esculina, p-nitro-DL- fenilalanina, uréia, glicina, citrato, ácido malônico, cloreto de tetrazolídeo trifenil, arginina, e lisina. (SISTEMAS, 2002).

4.4.IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA POR MÉTODO MOLECULAR

4.4.1 Extração de DNA total dos isolados bacterianos

A extração do DNA das amostras foi feita com o Kit Dneazy^(R) (Quiagen, Hildem, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Genética Molecular, na sede da Embrapa Gado de Leite. Inicialmente, os isolados foram ativados em caldo BHI e incubados a 37°C, por 24h. Culturas bacterianas em fase estacionária foram então utilizadas para extração do DNA total. Para os cocos Gram-positivos, 500 μ L de cada cultura foram transferidos para microtubos e centrifugados (5000 g, 10 minutos); o *pellet* foi ressuscitado em 180 μ L de tampão de lise enzimática e 20 μ L de lisozima (20 mg/ μ L). As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C, por 30 minutos; em seguida foram adicionados 25 μ L de proteinase K (20 mg/ μ L) e 200 μ L de tampão (Lysis buffer) AL sem etanol. As amostras foram incubadas em banho-maria a 56°C, por 30 minutos e, em seguida, foram adicionados 200 μ L de etanol 96°C; as misturas foram transferidas para as colunas DNeazy Mini Spin, as quais forma encaixadas em um tubo coletor de 2 mL. Em seguida as colunas foram centrifugadas (8000 g, 2 minutos), os efluxos foram descartados e as colunas foram transferidas para um novo tubo coletor de 2 mL, sendo adicionados 500 μ L de

tampão Buffer AW₁ (Wash buffer 1). As colunas foram novamente centrifugadas (8000 g, 1 minuto), os efluxos foram descartados, as colunas foram transferidas para novo tubo coletor de 2 mL e adicionados 500 µL de tampão Buffer AW₂ (Wash buffer 2). As colunas foram centrifugadas (20.000 g, 3 minutos), transferidas para microtubos de 1,5 mL e adicionados 110 µL do tampão AE (Elution buffer) diretamente na membrana de cada coluna. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 1 minuto e, em seguida, centrifugadas (8000 g, 1 minuto); após centrifugação, as colunas foram descartadas e os microtubos contendo as amostras foram incubados a -20°C.

Para os isolados Gram-negativos, 500 µL de cada cultura foram transferidos para microtubos e centrifugados (5000 g, 10 minutos); o *pellet* foi ressuscitado em 180 µL de tampão de lise enzimática e 20 µL de proteinase K. As amostras foram agitadas em vortex e incubadas em banho-maria a 56°C, por 1h; os microtubos foram agitados por 15 segundos e foram adicionados 200 µL de tampão AL e 200 µL de etanol 96°C. As misturas foram transferidas para as colunas DNeasy Mini Spin, as quais foram encaixadas em um tubo coletor de 2 mL. Em seguida as colunas foram centrifugadas (8000 g, 2 minutos), os efluxos foram descartados e as colunas foram transferidas para um novo tubo coletor de 2 mL, sendo adicionados 500 µL de tampão AW₁. As colunas foram novamente centrifugadas (8000 g, 1 minuto), os efluxos foram descartados, as colunas foram transferidas para novo tubo coletor de 2 mL e adicionados 500 µL de tampão AW₂. As colunas foram centrifugadas (20.000 g, 3 minutos), transferidas para microtubos de 1,5 mL e adicionados 110 µL do tampão AE diretamente na membrana de cada coluna. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 1 minuto e, em seguida, centrifugadas (8000 g, 1 minuto); após centrifugação, as colunas foram descartadas e os microtubos contendo as amostras foram incubados a -20°C.

Após extração de DNA total de todas as amostras, a quantificação do DNA (ng/µL) foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific) e as amostras foram posteriormente diluídas para 20 ng/µL para a realização das reações em cadeia da polimerase (PCR).

4.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação da PCR foi realizada para os cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos) foi amplificado utilizando os *primers* universais 27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) e 907R (CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL, utilizando-se 9,0 µL de água milli-Q, 12,5 µL de GoTaq Master Mix 2x, 0,75 µL de *primer* F (10 µM), 0,75 µL de *primer* R (10 µM) e 2,0 µL de DNA (20ng/µL). A reação da PCR foi realizada em termociclador Gene Amp⁺ PCR System 9700, utilizando as seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 58°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C por 1 minuto para a extensão dos *primers*. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 7 minutos e os tubos foram mantidos sob refrigeração à 4°C. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%), o gel foi corado com brometo de etídio (0,2 µg/mL) e fotodocumentado sob luz ultravioleta.

4.4.3 Sequenciamento do rDNA 16S

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACT Gene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *AB 3500 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP 7 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes 60ng foram marcados utilizando-se 2,5 pmol do *primer* 27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) e 0,5 µL do reagente *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standard* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *LGXP Cycler* com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95°C por 5 minutos, resfriados em gelo por 5 minutos e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram

coletados utilizando-se o programa *Data Collection2* (Applied Biosystems) com os parâmetros *DyeSet*“Z”; *MobilityFile*“KB_3500_POP7_BDTv3.mob”; *BioLIMS Project*“3500_Project1”; *Run Module 1* “FastSeq50_POP7_50cm_cfv_100”; e *Analysis Module 1* “BC-3500SR_Seq_FASTA.saz”.

4.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO

Para os isolados classificados como cocos Gram-positivos foi avaliada a sensibilidade aos seguintes antimicrobianos: oxacilina 10 µg/ml, vancomicina 30 µg/ml, levofloxacino 5 µg/ml, rifamicina 5 µg/ml, penicilina 10 µg/ml, eritromicina 15 µg/ml, ampicilina/sulbactam 20 µg/ml. Para os isolados Gram-negativos foram utilizados os antimicrobianos gentamicina 10 µg/ml, levofloxacino 5 µg/ml, ampicilina 10 µg/ml, cefepime 30 µg/ml, ampicilina/sulbactam 20 µg/ml, amicacina 30 µg/ml, piperaciclina/tazobactam 110 µg/ml, e meropenem 10 µg/ml.

Os isolados foram pré-ativados em caldo Mueller-Hinton e incubados a 37°C, por 24h. Após incubação, as amostras foram suspensas em 3 mL de solução salina (0,9 %) até obtenção de uma solução padrão na escala 0,5 de MacFarland. As suspensões foram homogeneizadas e, com auxílio de um swab estéril, inoculadas em placas contendo meio Mueller Hinton, de acordo com as recomendações do CLSI (2012). Após semeadura das amostras, os discos foram aplicados nas superfícies das placas com o auxílio de uma pinça estéril. Em seguida as placas foram incubadas a 37°C, por 18 horas, e então avaliadas quanto à uniformidade do crescimento bacteriano, presença de contaminação e formação dos halos de inibição. Os halos foram medidos com o auxílio de um paquímetro e os diâmetros foram comparados aos descritos na tabela do CLSI (2012).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise dos dados foi feita de forma descritiva, a identificação bacteriana foi feita pelo sistema BBL Crystal (SISTEMAS, 2002) e pelo *Basic Local Alignment*

Search Tool (Blast). As taxas foram calculadas pelo procedimento FREQ do SAS Windows (2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

As linhagens bacterianas utilizadas para o trabalho foram previamente isoladas por Fernandes (2016) utilizando meios de cultivo seletivos para cada grupo bacteriano. Os meios utilizados foram Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), Ágar Hipertônico Manitol (MAN) e Ágar Bile Esculina (BE).

A identificação bioquímica utilizando o kit semi-automatizado BBL Crystal (Becton, Dickison and Company, EUA) foi realizada para a análise de 59 isolados, sendo 48 CGP provenientes de dejetos suínos (n = 44) e dejetos bovinos (n= 4) e 11 enterobactérias, provenientes de dejetos suínos (Tabela1).

Tabela 1 – Isolados bacterianos, identificados pelo método bioquímico

Tipo de dejetos	Amostra	Identificação bioquímica
Suínos	SCP 017	<i>Staphylococcus equorum</i>
	SCP 023	<i>Staphylococcus equorum</i>
	SCP 054	<i>Staphylococcus equorum</i>
	SCP 179	<i>Staphylococcus equorum</i>
	SCP 005	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	SCP 010	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	SCP 014	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	SCP 041	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	SCP 049	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	SCP 050	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	SCP 056	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	SCP 004	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
	SCP 020	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
	SCP 021	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
	SCP 033	<i>Staphylococcus vitulus</i>
	SCP 055	<i>Staphylococcus cohnii ssp cohnii</i>
	SCP 175	<i>Staphylococcus aureus</i>
	SCP 043	<i>Staphylococcus simulans</i>
	SCP 178	<i>Staphylococcus simulans</i>
	SCP 008	<i>Enterococcus durans</i>
	SCP 012	<i>Enterococcus durans</i>
	SCP 007	<i>Enterococcus faecium</i>
	SCP 163	<i>Enterococcus faecium</i>
	SCP 006	<i>Enterococcus raffinosus</i>
	SCP 046	<i>Enterococcus raffinosus</i>
	SCP 180	<i>Enterococcus raffinosus</i>
	SCP 042	<i>Enterococcus faecalis</i>
	SCP 013	<i>Micrococcus luteus</i>
	SCP 183	<i>Micrococcus luteus</i>
	SCP 024	<i>Leuconostoc citreum</i>
	SCP 036	<i>Leuconostoc citreum</i>

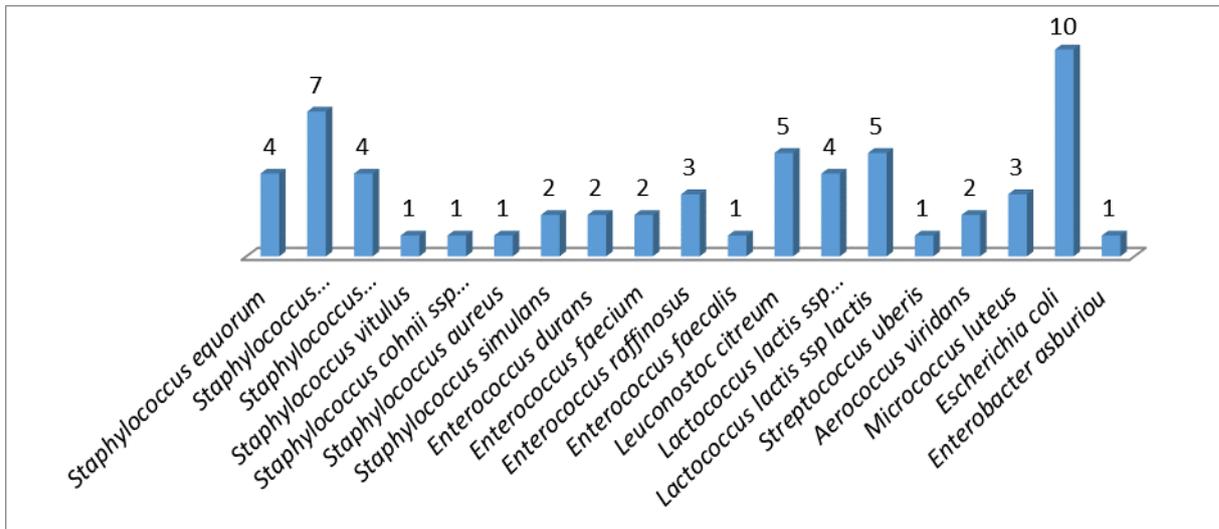
	SCP 053	<i>Leuconostoc citreum</i>
	SCP 181	<i>Leuconostoc citreum</i>
	SCP 182	<i>Leuconostoc citreum</i>
	SCP 031	<i>Lactococcus lactis ssp hordniae</i>
	SCP 032	<i>Lactococcus lactis ssp hordniae</i>
	SCP 064	<i>Lactococcus lactis ssp hordniae</i>
	SCP 185	<i>Lactococcus lactis ssp hordniae</i>
	SCP 011	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
	SCP 035	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
	SCP 059	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
	SCP 184	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
	SCP 174	<i>Streptococcus uberis</i>
	SCP 001	<i>Aerococcus viridans</i>
	SBN 015	<i>Escherichia coli</i>
	SBN 016	<i>Escherichia coli</i>
	SBN 133	<i>Escherichia coli</i>
	SBN 144	<i>Escherichia coli</i>
	SBN 150	<i>Escherichia coli</i>
	SBN 186	<i>Escherichia coli</i>
	SBN 187	<i>Escherichia coli</i>
	SBN 188	<i>Escherichia coli</i>
	SBN 189	<i>Escherichia coli</i>
	SBN 190	<i>Escherichia coli</i>
	SBN 152	<i>Enterobacter asburiau</i>
Bovinos	BCP 002	<i>Aerococcus viridans</i>
	BCP 003	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
	BCP 009	<i>Micrococcus luteus</i>
	BCP 044	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>

BCP: bacilo coco positivo; SBN: suíno bacilo negativo; SCP: suíno coco positivo
 Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Segundo os resultados do método bioquímico foram identificados CGP pertencentes a 7 gêneros e a 18 espécies diferentes, sendo mais prevalente o gênero *Staphylococcus* (n=20) e, dentre as espécies, *Staphylococcus saprophyticus* (n=7). Dentre as bactérias Gram-negativas 91% dos isolados foram identificados como *Escherichia coli* (n=10) e somente 1% dos isolados foi identificado como *Enterobacter asburiau* (Figura 3).

Dentre as 77 amostras avaliadas pelo método de sequenciamento do gene rDNA 16S, 50 amostras foram identificadas, incluindo CGP (n=43), enterobactérias (n=3) e BGP (n=4) conforme Tabela 2. As demais amostras (n=27) não puderam ser identificadas pelo método de sequenciamento utilizado.

Figura 3 – Prevalência de espécies bacterianas identificadas pelo método bioquímico



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Tabela 2 – Isolados bacterianos identificados pelo método de sequenciamento do gene rDNA 16S

Tipo de dejetos	Amostra	Identificação molecular	Identidade	Número de acesso
Suíno	SCP 001F	<i>Enterococcus hirae</i>	86%	KX752873.1
	SCP 005F	<i>Enterococcus faecium</i>	81%	KX185054.1
	SCP 006F	<i>Enterococcus faecium</i>	82%	KP261836.1
	SCP 007F	<i>Enterococcus faecium</i>	86%	KP261836.1
	SCP 008F	<i>Enterococcus faecium</i>	85%	KP261836.1
	SCP 011F	<i>Enterococcus faecium</i>	88%	KP261836.1
	SCP 012F	<i>Enterococcus faecium</i>	79%	KU324893.1
	SCP 013F	<i>Arthrobacter</i> sp	83%	KU363017.1
	SCP 021F	<i>Enterococcus faecium</i>	86%	KP261836.1
	SCP 023F	<i>Staphylococcus lentus</i>	67%	JX415369.1
	SCP 024F	<i>Enterococcus faecium</i>	82%	KP261836.1
	SCP 032F	<i>Enterococcus faecium</i>	83%	KP261836.1
	SCP 036F	<i>Enterococcus faecium</i>	86%	KP261836.1
	SCP 046F	<i>Enterococcus hirae</i>	81%	KM016947.1
	SCP 047F	<i>Enterococcus faecium</i>	82%	JX847619.1
	SCP 050F	<i>Enterococcus faecium</i>	83%	KP261836.1
	SCP 054F	<i>Enterococcus</i> sp	84%	AB682475.1
	SCP 086F	<i>Staphylococcus simulans</i>	82%	KP202162.1
	SCP 087F	<i>Staphylococcus simulans</i>	81%	KX348374.1
	SCP 090F	<i>Clostridium bifermentans</i>	77%	KT633853.1
	SCP 092F	<i>Clostridium bifermentans</i>	85%	KT598254.1
	SBN 124F	<i>Enterococcus</i> sp	82%	KF621060.1
	SBN 132F	<i>Enterococcus faecium</i>	83%	KP261836.1
	SBN 135F	<i>Enterococcus hirae</i>	76%	KT261027.1

	SBN 137F	<i>Shigella flexneri</i>	83%	LC090480.1
	SBN 140F	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	100%	KF668024.1
	SBN 150F	<i>Escherichia coli</i>	86%	KX443706.1
	SBN 152F	<i>Enterococcus faecium</i>	83%	KP261836.1
	SCP154F	<i>Enterococcus faecium</i>	83%	KT368999.1
	SCP 155F	<i>Enterococcus faecalis</i>	81%	JQ411244.1
	SCP 157F	<i>Enterococcus hirae</i>	84%	KM016947.1
	SBN 158F	<i>Enterococcus faecalis</i>	85%	JX536109.1
	SCP 163F	<i>Enterococcus faecium</i>	83%	KP261836.1
Bovino	BCP002F	<i>Aerococcus</i> sp	84%	KC978874.1
	BCP009F	<i>Staphylococcus aureus</i>	85%	JF168897.1
	BCP 018F	<i>Enterococcus faecium</i>	84%	KP261836.1
	BCP 019F	<i>Enterococcus faecium</i>	85%	KP261836.1
	BCP 027F	<i>Staphylococcus</i> sp	82%	JN411552.1
	BCP 039F	<i>Bacillus licheniformis</i>	85%	HQ911359.1
	BCP 052F	<i>Aerococcus</i> sp	89%	HQ433478.1
	BCP 071F	<i>Enterococcus pseudoavium</i>	83%	KU311979.1
	BCP 076F	<i>Escherichia</i> sp	80%	JN221546.1
	BCP 079F	<i>Enterococcus faecium</i>	84%	KP261836.1
	BCP 081F	<i>Enterococcus faecium</i>	82%	KP261836.1
	BCP 083F	<i>Enterococcus faecium</i>	85%	KP261836.1
	BCP 084F	<i>Aerococcus</i> sp	84%	HQ433478.1
	BCP 102F	<i>Clostridium bifermentans</i>	84%	KT598254.1
	BBN 142F	<i>Enterococcus faecalis</i>	85%	KC510232.1
	BBN 145F	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	73%	KC545902.1
	BBN 167F	<i>Enterococcus hirae</i>	76%	KM016947.1

BCP: bacilo coco positivo prime F; SBN: suíno bacilo negativo prime F; SCP: suíno coco positivo prime F

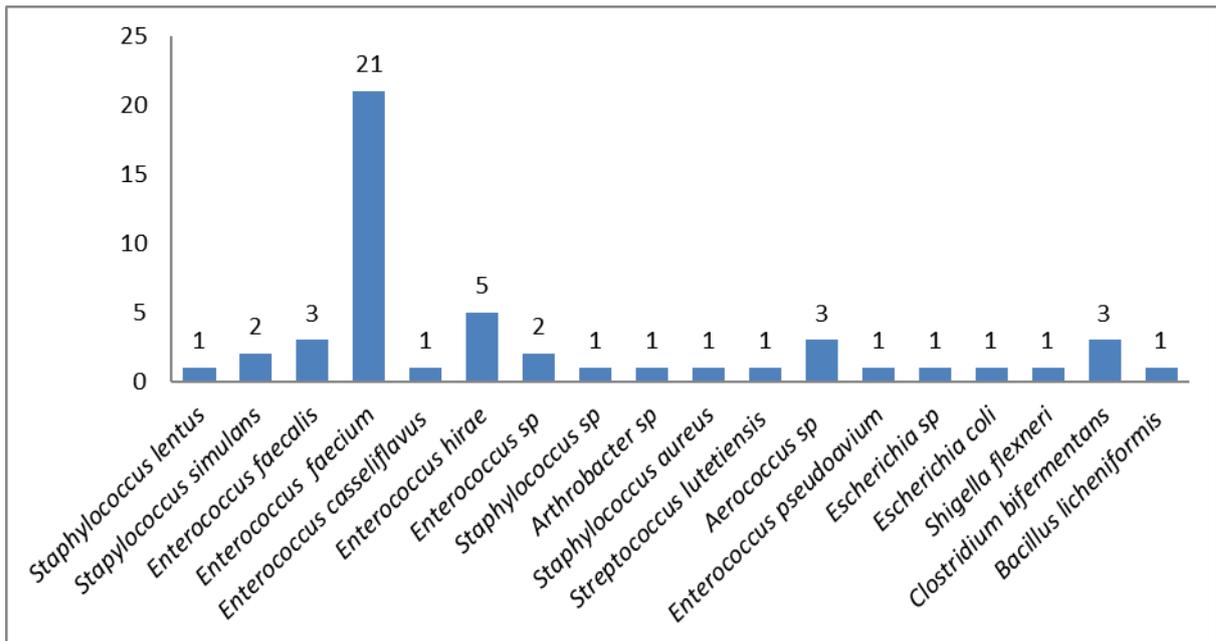
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Segundo a análise molecular foram identificados CGP pertencentes a 5 gêneros e a 13 espécies, sendo mais prevalente o gênero *Enterococcus* (n=33) e, dentre as espécies, *Enterococcus faecium* (n=21). Dentre as enterobactérias, os isolados foram identificados como *Escherichia* sp. (n=1), *Escherichia coli* (n=1) e *Shigella flexneri* (n=1) (figura 4).

A comparação dos resultados obtidos com os dois métodos de identificação utilizados foi feita usando os critérios de classificação das espécies: dos 22 isolados avaliados pelos dois métodos, apenas os isolados SCP 163 e SBN 150, SCP 007 provenientes de dejetos suínos, mostraram concordância da espécie, sendo identificados, respectivamente, como *Enterococcus faecium* e *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium*, pelos dois métodos. Outros 6 isolados (SCP 023, SCP 012,

SCP 008, SCP 046, SCP 006, BCP 002) que correspondem a (27%), foram identificados como pertencendo ao mesmo gênero, mas diferindo no que se refere à espécie, segundo a avaliação pelo método bioquímico e molecular (Tabela 3).

Figura 4 – Prevalência de espécies bacterianas identificadas pelo método de sequenciamento do gene rDNA 16S



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Tabela 3 – Espécies bacterianas, identificadas pelos métodos bioquímico e pelo método de sequenciamento do gene rDNA 16S

Amostras	Identificação bioquímica	Identificação Molecular
SCP 050	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 005	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 021	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 023	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Staphylococcus lentus</i>
SCP 054	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Enterococcus sp.</i>
SCP 047	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 012	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 008	<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 006	<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 046	<i>Enterococcus raffinosus</i>	<i>Enterococcus hirae</i>
SCP 007	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 163	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 024	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>

SCP 036	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 032	<i>Lactococcus lactis ssp hordniae</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 011	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SCP 001	<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Enterococcus hirae</i>
BCP 002	<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Aerococcus sp.</i>
BCP 009	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCP 013	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Arthrobacter sp.</i>
SBN 152	<i>Enterobacter asburii</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
SBN 150	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

BCP: bacilo coco positivo; SBN: suíno bacilo negativo; SCP: suíno coco positivo
 Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os métodos convencionais, incluindo morfologia, coloração pelo método de Gram e perfil bioquímico, foram utilizados por muitos anos (HOLT et al, 1994). Como avanço do conhecimento e devido ao fato de muitas bactérias serem de difícil identificação por exibirem características fenotípicas atípicas (DEASY et al., 2000), surgiram novas metodologias para identificação bacteriana, incluindo os métodos bioquímicos automatizados (TURNIDGE et al., 2011) e métodos moleculares, como o sequenciamento do rDNA 16S (MIZRAHI-MAN et al.; 2013)

A identificação morfológica, as provas bioquímicas convencionais e os Kits contendo substratos bioquímicos e enzimáticos, são técnicas ainda utilizadas, mas apresentam divergências nos resultados dos Kits (HUDSON et al., 2003) e mesmo identificação errônea de bactérias tem sido relatados (ZANGENAH et al., 2013). A inconsistência na identificação do mesmo isolado também foi observada no presente estudo, visto que 65 % dos isolados avaliados (n=13) não foram identificados como pertencentes à mesma espécie, ou sequer ao mesmo gênero, quando submetidos à identificação bioquímica e molecular, para comparação. Os resultados inconsistentes gerados pelas provas bioquímicas em comparação ao método molecular podem estar relacionados ao fato de que o sistema bioquímico semi-automatizado (BBL Crystal) ter sido desenvolvido para identificação de bactérias isoladas de amostras clínicas oriundas de humanos e não de amostras ambientais.

Segundo Jorgensen et al. (1983), métodos bioquímicos automatizados não apresentaram confiança na identificação de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, diferente da análise feita por PCR, que identificou de forma eficiente e rápida tais bactérias. Essa eficiência e rapidez na identificação do gênero *Enterococcus* também foram evidenciados por Dias Neto et al. (2003).

Um trabalho feito no Brasil por Frazão (2014) comparando o método bioquímico convencional e automatizado (Vitek 2) com o método molecular (rDNA 16S), para identificação de micro-organismos da microbiota de pássaros (papagaios), demonstrou que apenas 11,25% das amostras foram identificadas como pertencentes à mesma espécie nas três técnicas. Isto demonstra que os resultados obtidos de 13,6% de coincidência das duas metodologias (semi-automatizada e molecular) os resultados que foram obtidos neste trabalho são semelhantes ao mostrado por Frazão (2014).

Donato (2007), selecionou 10 amostras para serem identificadas pelos sistemas manuais (Facklam esquema Modificado 1 e esquema Modificado 2), semi-automatizados (API 20 Strep, BBL Crystal Gram-Positivo ID) e identificação molecular (PCR); comparando os resultados obtidos pelo método BBL Crystal e os resultados da PCR, o método semi-automatizado identificou 6 amostras como sendo *Enterococcus faecium*, incluindo a estirpe controle *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Já os resultados obtidos pelo método molecular foram 8 amostras *Streptococcus* spp e 1 *Enterococcus* ssp, confirmando a mesma diferença que foi encontrada neste trabalho.

Um estudo realizado por Barros e colaboradores (2009), visando a identificação de *Lactobacillus* spp isolados de amostras de Inglúvios e cecos de aves, comparou o método bioquímico semi-automatizado API 50 CHL[®] com o método molecular da PCR multiplex; das amostras identificadas pelo método bioquímico como *Lactobacillus fermentum*, nenhuma foi identificada como tal pelo PCR multiplex.

Segundo Bosshard (2004), de 67 amostras de cocos Gram-positivos catalase negativa identificadas pelo método bioquímico semi-automatizado API 20, 42 amostras (62,6%) não apresentaram a mesma identificação segundo o método de sequenciamento do rDNA 16S. Tal resultado é muito semelhante ao encontrado no presente estudo, em que 65% das amostras identificadas pelo método bioquímico (BBL Crystal) foram discrepantes, comparando-se com o método molecular (rDNA 16S).

De acordo com Herbel e colaboradores (2013), somente o sequenciamento do genoma completo ou a PCR em tempo real serão capazes de identificar, estudar e analisar rapidamente e mais eficazmente as bactérias.

5.2 PREVALÊNCIA BACTERIANA DAS AMOSTRAS ISOLADAS DOS DEJETOS SUÍNOS E DOS DEJETOS BOVINOS

Considerando o método molecular como padrão ouro para a identificação bacteriana, das 50 amostras analisadas, a espécie mais prevalente foi *Enterococcus faecium* (n=21). As populações de *Enterococcus* e *Enterobacteriaceae* compreendem bactérias amplamente distribuídas no ambiente, fazendo parte da microbiota intestinal de humanos e animais (MURRAY, 1990). Estudos anteriores mostraram que populações de *Enterococcus* e *Enterobacteriaceae* predominam em biodigestores alimentados com dejetos de bovinos (BAGGE et al.; 2005). Resultados semelhantes também foram encontrados por Resende (2013), que utilizou biodigestores alimentados com dejetos bovinos, da pecuária leiteira, na qual evidenciou a prevalência de *Enterococcus* e *Enterobacteriaceae* em amostras recuperadas de afluentes e efluentes. As populações bacterianas podem variar em virtude do tipo e manejo dos dejetos bem como as condições do ambiente (SAHLSTRÖM et al., 2004). Entretanto os resultados deste trabalho corroboram o que é encontrado na literatura, e a prevalência bacteriana é importante quando há a utilização do efluente dos biodigestores em fertirrigação, onde estes micro-organismos serão lançados no ambiente e deverão interagir com a microbiota do solo, por exemplo

5.3 ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ÀS DROGAS ANTIMICROBIANAS DE LINHAGENS BACTERIANAS ISOLADAS DOS DEJETOS SUÍNOS E DOS DEJETOS BOVINOS

O perfil de susceptibilidade às drogas bacterianas foi avaliado para os seguintes grupos bacterianos: CGP (n=45), sendo 34 isolados de dejetos suínos e 11 de dejetos bovinos (Tabela 4); ENT (n=8), sendo todos os isolados de dejetos suínos (Tabela 5).

Para os CGP foram selecionados 40 isolados provenientes de amostras coletadas durante o inverno e 5 durante o verão; para as Enterobactérias todos os isolados foram provenientes de amostras coletadas durante o período de inverno.

As Tabelas 4 e 5 mostram o perfil de susceptibilidade dos isolados avaliados diante dos antimicrobianos testados.

Tabela 4 – Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão para os CGP isolados de amostras dos dejetos suínos e dos dejetos bovinos

Isolado CGP	Identificação	Dejeto	VAN	OXA	LVX	PEN	ERI	RIF	ASB
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	BCP 003	Bovino	_	S	S	S	_	S	S
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	SCP 004	Suíno	_	S	R	R	_	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	BCP 009	Bovino	_	R	S	R	_	R	S
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	SCP 010	Suíno	_	R	S	R	_	R	S
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	SCP 014	Suíno	_	S	S	S	_	I	S
<i>Staphylococcus equorum</i>	SCP 017	Suíno	_	S	S	S	_	S	S
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	SCP 020	Suíno	_	S	S	R	_	S	S
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	SCP 021	Bovino	_	R	S	R	_	S	S
<i>Staphylococcus lentus</i>	SCP 023	Bovino	_	S	S	R	_	S	S
<i>Staphylococcus vitulus</i>	SCP 033	Suíno	_	S	S	S	_	S	S
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	SCP 041	Suíno	_	R	I	R	_	S	S
<i>Staphylococcus simulans</i>	SCP 043	Suíno	_	R	R	R	_	S	S
<i>Staphylococcus cohnii ssp cohnii</i>	SCP 055	Suíno	_	R	S	R	_	S	S
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	SCP 056	Suíno	_	R	S	R	_	S	S
<i>Staphylococcus simulans</i>	SCP 086	Suíno	_	R	S	R	_	R	S
<i>Staphylococcus simulans</i>	SCP 087	Suíno	_	S	R	R	_	S	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	SCP 175	Suíno	_	R	S	R	_	R	S
<i>Staphylococcus simulans</i>	SCP 178	Suíno	_	R	S	R	_	R	S
<i>Staphylococcus equorum</i>	SCP 179	Suíno	_	R	S	R	_	R	S
<i>Enterococcus hirae</i>	SCP 001	Suíno	R	_	S	R	R	R	_
<i>Enterococcus faecium</i>	SCP 005	Suíno	S	_	I	S	S	R	_
<i>Enterococcus faecium</i>	SCP 006	Suíno	S	_	S	S	S	S	_
<i>Enterococcus faecium</i>	SCP 007	Suíno	S	_	S	S	S	S	_
<i>Enterococcus faecium</i>	SCP 008	Suíno	S	_	S	S	S	S	_
<i>Enterococcus faecium</i>	SCP 011	Suíno	S	_	S	S	R	S	_
<i>Enterococcus faecium</i>	SCP 012	Suíno	S	_	S	S	R	I	_
<i>Enterococcus faecium</i>	BCP 019	Bovino	S	_	S	S	S	I	_
<i>Enterococcus faecium</i>	SCP 024	Suíno	S	_	S	S	S	R	_
<i>Enterococcus faecium</i>	SCP 032	Suíno	S	_	S	S	I	S	_
<i>Enterococcus faecium</i>	SCP 036	Suíno	S	_	I	S	I	R	_
<i>Enterococcus faecalis</i>	SCP 042	Suíno	S	_	S	S	R	I	_
<i>Enterococcus hirae</i>	SCP 046	Suíno	R	_	R	R	R	R	_
<i>Enterococcus faecium</i>	SCP 047	Suíno	S	_	S	S	S	S	_
<i>Enterococcus faecium</i>	SCP 050	Suíno	S	_	S	S	S	S	_
<i>Enterococcus sp</i>	SCP 054	Suíno	S	_	S	S	I	R	_
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	BCP 071	Bovino	S	_	S	S	R	S	_
<i>Enterococcus faecium</i>	BCP 079	Bovino	S	_	S	S	S	I	_
<i>Enterococcus faecium</i>	BCP 081	Bovino	R	_	S	R	R	R	_
<i>Enterococcus faecium</i>	BCP 083	Bovino	S	_	S	S	I	S	_

<i>Enterococcus faecium</i>	SCP 154	Suíno	S	–	S	S	I	R	–
<i>Enterococcus faecalis</i>	SCP 155	Suíno	R	–	S	S	I	R	–
<i>Enterococcus hirae</i>	SCP 157	Suíno	R	–	S	R	R	R	–
<i>Enterococcus faecium</i>	SCP 163	Bovino	S	–	S	S	S	S	–
<i>Enterococcus faecium</i>	BCP 187	Bovino	S	–	S	S	S	R	–
<i>Streptococcus uberis</i>	SCP 174	Suíno	R	–	R	R	R	–	–

VAN: Vancomicina; OXA: Oxacilina; LVX: Levofloxacino; PEN: Penicilina; ERI: Eritromicina; RIF: Rifamicina; ASB: Ampicilina/Sulbactam. BCP: bacilo coco positivo; SCP: suíno coco positivo—: antibiótico não testado.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Dos 19 isolados do gênero *Staphylococcus* avaliados, 15 linhagens (78,9%) foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Dentre os antimicrobianos avaliados, a penicilina foi a que apresentou o maior índice de resistência (78,9%), sendo 12 isolados resistentes provenientes de dejetos suínos e 3 de bovinos, seguida da oxacilina (57,9%), que não apresentou atividade contra 9 linhagens isoladas de dejetos suínos e 2 de dejetos bovinos. No caso da rifamicina, 31,5% dos isolados apresentaram resistência (5 isolados de dejetos suínos e 1 dejetos bovino). Os antimicrobianos ampicilina-sulbactam e levofloxacino foram os mais eficazes, sendo observados os maiores índices de sensibilidade: 94,7 % (14 isolados de dejetos suínos e 4 de bovinos) e 78,9 % (11 isolados de dejetos suínos e 4 de bovino), respectivamente.

Dos 25 isolados do gênero *Enterococcus* avaliados, 15 linhagens (60%) foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. As drogas para as quais foram observados os maiores índices de resistência foram a rifamicina (44%), sendo 9 isolados resistentes provenientes de dejetos suínos e 2 de bovinos, seguida pela eritromicina (32%), para a qual foram observados 6 isolados resistentes provenientes de dejetos suínos e 2 de bovinos. Foram observadas altas taxas de sensibilidade aos antimicrobianos levofloxacino (88% dos isolados foram sensíveis, sendo 15 isolados de dejetos suínos e 7 de bovinos) e vancomicina 80% (14 isolados de dejetos suínos e 6 de bovinos).

Streptococcus uberis, a única espécie representante do gênero *Streptococcus* avaliada e isolada de dejetos suínos, apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados (vancomicina, levofloxacino, penicilina e eritromicina).

Tabela 5 – Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão para os BGN (ENT) isolados de amostras de dejetos suínos

Isolado BGN	Identificação	Dejeto	GEN	LVX	AMP	CPM	AMI	PPT	ASB	MER
<i>Escherichia coli</i>	SBN 015	Suíno	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	SBN 016	Suíno	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	SBN 133	Suíno	S	S	R	S	S	S	S	S
<i>Shigella flexineri</i>	SBN 137	Suíno	I	S	R	S	S	S	R	S
<i>Escherichia coli</i>	SBN 150	Suíno	I	S	S	S	R	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	SBN 187	Suíno	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	SBN 189	Suíno	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	SBN 190	Suíno	S	I	R	S	S	S	S	S

GEN: Gentamicina; LVX: Levofloxacino; AMP: Ampicilina; CPM: Cefepime; AMI: Amicacina; PPT: Piperaciclina/Tazobactam; ASB: Ampicilina/Subactam; MER: Meropenem; SBN: suíno bacilo negativo.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Para as Enterobactérias, das 7 linhagens identificadas como *E. coli*, 4 (57,1%) foram sensíveis aos oito antimicrobianos testados, uma linhagem apresentou resistência a amicacina (14,2%) e duas foram resistentes a ampicilina (28,5%). Para o único isolado da espécie *Shigella flexineri* avaliado foi observada resistência à ampicilina e também à combinação de ampicilina/sulbactam, sendo que resistência intermediária foi observada contra gentamicina.

Um trabalho feito por Filippesen et al. (2005) com amostras de fezes diarréicas de leitões, evidenciou um grande número de linhagens de *E. coli* sensíveis à gentamicina, conforme apresentado no presente trabalho. Também segundo Silva et al. (2008), todas as linhagens de *E. coli* provenientes do armazenamento de dejetos suínos foram sensíveis ao antibiótico gentamicina.

As linhagens de *E. coli* avaliadas apresentaram uma alta sensibilidade à amicacina (85,7%), semelhante ao encontrado por Franco et al. (2010), ao analisarem linhagens de *E. coli* provenientes de carne e dejetos suínos, (76,5% dos isolados foram sensíveis à amicacina).

Por outro lado, as linhagens de *E. coli* avaliadas apresentaram maior resistência ao antibiótico ampicilina (28,5%). Schroeder et al. (2002) analisaram linhagens de *E. coli* isoladas de suínos e verificaram que 24% foram resistentes à ampicilina. Corroborando com tais resultados Bacarro et al. (2008) ao definir o perfil de resistência de linhagens de *E. coli* isoladas de fezes diarréicas de leitões lactentes relataram elevada resistência à ampicilina (87%).

Em relação ao gênero *Enterococcus*, 60% das linhagens foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Isto se deve à resistência intrínseca desses micro-organismos a antimicrobianos e também a capacidade de aquisição de fatores de resistência a diferentes antimicrobianos o que resulta na diminuição da efetividade de drogas para tratamento de infecções causadas por *Enterococcus*. A resistência natural ou intrínseca a antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos é devido à baixa capacidade do antimicrobiano de penetrar pela parede da bactéria, a resistência aos β -lactâmicos é proveniente da presença de proteínas de ligação às penicilinas com baixa afinidade de ligação a este grupo de antimicrobianos (TEIXEIRA et al., 2003). A resistência adquirida ocorre através da plasmídeos e transposons carreadores de genes de resistência e mutações (CETINKAYA et al., 2000).

Resende e colaboradores (2014) analisaram o perfil de sensibilidade de linhagens bacterianas isoladas de biodigestores alimentados com dejetos bovinos, e para os antibióticos testados para CGP catalase positiva foi observada resistência à penicilina em 74,15% dos isolados corroborando com o resultado encontrado neste estudo (78,9%).

Um trabalho feito por Esiobu et al. (2002) com linhagens bacterianas isoladas de solo de jardim adubado com esterco bovino mostrou elevada resistência a vários antimicrobianos, incluindo a penicilina (70%). Segundo os autores a elevada resistência poderia ser explicada pela resistência intrínseca dos organismos do solo, ou por inoculação de linhagens bacterianas resistentes presentes no esterco animal. A inoculação direta de micro-organismos resistentes advindos dos dejetos animais tratados com antibióticos, sugere ser um fator importante e relevante para a resistência bacteriana (THIELE BRUHN, 2003).

Segundo Schimitt et al (2006), a seleção de populações bacterianas resistentes a antibióticos deve-se ao fato da aplicação do esterco animal contaminado com baixas concentrações de resíduos de antibióticos. De acordo com os resultados obtidos fica evidente a presença de bactérias resistentes nos dejetos animais, tanto suínos como bovinos, mesmo após a biodigestão anaeróbia. Dessa forma, o uso desses dejetos no processo de adubação deve ser feito com restrições. A utilização de dejetos suínos e bovinos como biofertilizantes deve atender aos princípios da legislação, que compreendem o tripé: obrigatoriedade de tratamento dos dejetos, para redução do número de patógenos (como, por exemplo, a digestão

anaeróbia); comprovação deste tratamento; garantia da qualidade microbiológica dos dejetos (VENGLOVSKY et al., 2006).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação microbiológica do processo de biodigestão anaeróbia destacou a prevalência dos grupos microbianos Bacilos Gram Negativos (BGN) e dos *Enterococcus*, oriundos dos dejetos de suínos e dos dejetos de bovinos presentes no efluente final.

A identificação bacteriana foi realizada com técnicas clássicas e com biologia molecular. Fica evidente que o padrão ouro para a identificação é a utilização de ferramentas moleculares, a identificação tradicional não oferece resposta confiável pois os kits disponíveis no mercado são caracteristicamente validados para amostras de originadas de patologias humanas e animais, o que torna sua utilização em amostras ambientais pouco segura ou confiável.

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

Neste trabalho também foi realizado o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos pelo teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA), este teste mesmo sendo de uso rotineiro em microbiologia clínica foi útil e conseguiu demonstrar o perfil de resistência dos isolados. Os resultados encontrados neste trabalho levantam a hipótese de que o efluente utilizado como biofertilizante pode lançar no ambiente micro-organismos resistentes, alterando os micro-organismos do solo, fator considerado relevante quanto a biossegurança da utilização da biofertilização com dejetos suínos e bovinos.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, R.; VILLCA, S.; LIDÉN, G. Biogas production from llama and cow manure at high altitude. **Biomass and Bioenergy**, Aberdeen, v. 30, n. 3, p. 66-75, 2006.
- ALVES, W. L. **Compostagem e vermicompostagem no tratamento de lixo urbano**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 53 p.
- AMARAL, C. M. C.; AMARAL, L. A.; LUCAS JUNIOR, J.; NASCIMENTO, A. A.; FERREIRA, D. S.; MACHADO, M. R. F. Biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros submetidos a diferentes tempos de retenção hidráulica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1897-1902, 2004.
- AMINOV, R. I.; MACKIE, R. I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. **FEMS MicrobiolLett**, v. 271, p. 147-161, 2007.
- AMORIM, A. C. **Caracterização dos dejetos de caprinos: reciclagem energética e de nutrientes**. 2002. 108 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- _____. **Avaliação do potencial de impacto ambiental e do uso da compostagem e biodigestão anaeróbia na produção de caprinos**. 2005. 129 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, SP.
- ANDRADE, M. A. N.; RANZI, T. J. D.; MUNIZ, R. N.; SILVA, L. G. S.; ELIAS, M. J. Biodigestores rurais no contexto da atual crise de energia elétrica brasileira e na perspectiva da sustentabilidade ambiental. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 4., 2002, Campinas - Agrener 2002. [Anais...] Disponível em: <<http://www.feagri.unicamp.br/energia/agrener2002/jdownloads/pdf/0107.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2017.
- ANGONESE, A. R.; CAMPOS A. T.; PALACIO, S. M.; SZYMANSKI, N. Avaliação da eficiência de um biodigestor tubular na redução da carga orgânica e produção de biogás a partir de dejetos de suínos. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 6., 2006, Campinas - Agrener 2006. [Anais...] Disponível em: <<http://www.feagri.unicamp.br/energia/agrener2006/jdownloads/pdf/56.pdf>>. Acesso em: 25 jan 2017.
- AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas estratégicas de controle. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 151-161, 2005.
- BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; CORRÊA, A.; FERREIRA, A. J. P.; CALDERARO, F. F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arq. Inst. Biol.**, v. 69, p. 15-18, 2002.

BAGGE, E.; SAHLSTROM, L.; ALBINH, A. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. **Water research**, v. 39, n. 20, p. 4879-4886, 2005.

BAGGE, E.; PERSSON, M.; JOHANSSON, K. E. Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1549-1565, 2010.

BAHNSON, P. B.; CRAY, F. P. J. The association of antimicrobial resistance patterns and reported usage of antimicrobial in commercial growing pig production. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 3., 1999, Washington D. C. **Proceedings...** Disponível em: <<http://lib.dr.iastate.edu/safepork/1999/allpapers/60/>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

BALANÇO energético nacional 2011: ano base 2010. Rio de Janeiro: Empresa de Pesquisa Energética, 2011. Disponível em: <https://ben.epe.gov.br/downloads/Relatorio_final_BEN_2011.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2017.

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

BARROS, M. R.; ANDREATTI FILHO, R. L.; OLIVEIRA, D. E. T.; LIMA, E. T.; CROCCI, A. J. Comparação entre método bioquímico e reação em cadeia de polimerase para identificação de *Lactobacillus* spp., isolados de aves. **Arq.Bras. Med. Vet. Zootec.**,v. 61, n. 2, p. 319-325, 2009.

BECKER, K.; VON EIFF, C. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci. In: In VERSALOVIC, J.; CARROLL, K.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J.; LANDRY, M.; WARNOCK, D. W. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 10. ed. Washington: ASM Press, 2011. cap. 19, p. 308-330.

BELLI FILHO, P. **Stockage e odeurs des dejections animales, cas du lisier de porc**. 1995. 181 f. Thèse (Doctorat) Université de Rennes, France.

BERTOZZO, F. **Co-digestão anaeróbia de dejetos glicerina bruta**. 2013. 92 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

BETTIOL, W. Resultados de pesquisa com métodos alternativos para o controle de doenças de plantas. In: ENCONTRO DE PROCESSOS DE PROTEÇÃO DE PLANTAS: CONTROLE ECOLÓGICO DE PRAGAS E DOENÇAS, 2001, Botucatu. **Resumos...** Botucatu: Agroecológica, 2001. p. 125-135.

BETTIOL, W.; TRATCH, R.; GALVAO, J. A. H. Controle de doenças de plantas com biofertilizantes. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. 22 p. (Embrapa-CNPMA. Circular Técnica, 2).

BIGERIEGO, M.; DELGADO, M.; CARBONELL, V. **Aplicacion de lãs tecnologias de fermentacion anaeróbia y otros processos complementarios em la depuracion de efluentes de origen ganadero**. Madrid: INIA, 1997. 89 p.

BIOMÉRIEUX, A. S. **API 20 Strep**: Instruções de uso. France, 2005. 23 p.

BLEY JR., C. **A suinocultura e o meio ambiente**. Suino.com, 14 fev. 2003. Disponível em: < <http://www.suino.com.br/MeioAmbiente/default-469935>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

BONOMO, R. A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and Pseudomonas aeruginosa. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, Suppl. 2, p. S49-S56, 2006.

BOSSHARD, P. P.; ABELS, S.; ALTWEGG, M.; BÖTTGER, E. C.; ZBINDER, R. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative gram-positive cocci in the clinical laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 5, p. 2065-2073, 2004.

BROCHIER-ARMANET, C.; FORTERRE, P.; GRIBALDO, S. Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 14, n. 3, p. 274-81, 2011.

CAEEB. Companhia Auxiliar de Empresas Elétricas Brasileiras. **O biogás e sua tecnologia**. Rio de Janeiro, 1981. 41 p. (Série Estudos e Pesquisas, 2).

CALZA, L. F.; LIMA, C. B.; NOGUEIRA, C. E. C.; SIQUEIRA, J. A. C.; SANTOS, R. F. Avaliação dos custos de implantação de biodigestores e da energia produzida pelo biogás. **Eng. Agríc.**, v. 35, n. 6, p. 990-997, 2015.

CAO, Y.; CHANG, Z.; WANG, J.; MA, Y.; FU, G..The fate of antagonistic microorganisms and antimicrobial substances during anaerobic digestion of pig and dairy manure. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 664-671, May 2013.

CASTRILLÓN, L.; FERNÁNDEZ-NAVA, Y.; ORMAECHEA, P.; MARAÑÓN, E. Methane production from cattle manure supplemented with crude glycerin from the biodiesel industry in CSTR and IBR. **Bioresource Technology**, Essex, v. 127, p. 312–317, 2013.

CERVI, R. G.; ESPERANCINI, M. S. T.; BUENO, O. C. Viabilidade econômica da utilização do biogás produzido em granja suinícola para geração de energia elétrica. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 30, n. 5, p. 831-844, set./out.201

CETINKAYA, Y.F.P.; MAYHALL, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clin. Microbiol. Rev.** 13:686-707, 2000.

CHAE, K. J., JANG, A., YIM, S. K., KIM, I. S. The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic of swine manure. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1-6, 2008

CHERNICHARO, C. A. L. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. Belo Horizonte: Segrac, 1997. 246 p. v. 5 - Reatores Anaeróbios.

_____. **Reatores anaeróbios**. 2. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, 2007. 380 p.

CLSI-Clinical and laboratory standards Institute. 2012. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22nd information supplement**. Document M 100-S22. CLSI, Wayne, PA.

COELHO, S. T.; VELÁSQUEZ, S. M. S. G.; SILVA, O. C.; PECORA, V.; ABREU, F. C. Geração de energia elétrica a partir do biogás proveniente do tratamento de esgoto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENERGIA 11., 2006, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: PIPGE, 2006. 5 p.

COLATTO, L.; LANGER, M. Biodigestor: resíduo sólido pecuário para produção de energia. **Unoesc & Ciência – ACET**, Joaçaba, v. 2, n. 2, p. 119-128, jul./dez. 2011.

COLEN, F. **Potencial energético de cana de açúcar como substrato em reator UASB**. 2003. 85 f. Tese (Doutorado em Energia na Agricultura) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, SP.

CÔTE, C.; MASSE, D. I.; QUESSY, S. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 1, p. 686-691, 2006.

D'ANDREA, P. A.; MEDEIROS, M. B. Biofertilizantes biodinâmicos na nutrição e proteção de hortaliças. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGRICULTURA ORGÂNICA, NATURAL, ECOLÓGICA E BIODINÂMICA, 1., 2002, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Agroecológica, 2002.

DEASY, B. M.; REA, M. C.; FITZGERALD, G. F.; COGAN, T. M.; BERESFORD, T. P. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p. 510-522, 2000.

DEGANUTTI, A.; PALHACI, M. C. J. P.; ROSSI, M.; TAVARES, R.; SANTOS, B. C. Biodigestores rurais: modelo indiano, chinês e batelada. In: ENCONTRO DE ENERGIA DO MEIO RURAL, 4.; 2002, Bauru. **Anais...** Bauru, 2002. p. 1-5.

DIAS NETO, J. A.; MARTINS, A. C. P.; TIRABOSCHI, R. B.; DOMINGOS, A. L. A.; COLOGNA, A. J.; PASCHOALIN, E. L.; TUCCI JR, S. Prevalence and bacterial susceptibility of hospital acquired urinary tract infection. **Acta Cir Bras**, v. 18, suppl. 5, p. 36-38, 2003.

DONATO, S. T. **Comparação de métodos convencionais e semi-automatizados para identificação de *Enterococcus* spp. frente à biologia molecular em identificações discrepantes**. 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

ESIOBU, N.; ARMENTS, L.; IKE, J. Antibiotic resistance in soil and water environments. **Inter. J. Environ. Health Res.**, v. 12, p. 133-144, 2002.

FEDORKA-CRAY, P. J.; PETERSEN, K. E.; DARGATZ, A.; TOLLEFSON, L.; WINELAND, N. E.; HEADRICK, M.; HOLLINGER, K.; FERRIS, K. National antimicrobial Resistance Monitoring System: Results for Swine. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 3., 1999, Washington. **Proceedings...** Washington, 1999. p 248-249. Disponível em: <<http://lib.dr.iastate.edu/safepork/1999/allpapers/63/>>. Acesso em: 25 jan 2017.

FERNANDES, A. J. **Variáveis microbiológicas e físico-químicas em biodigestores anaeróbios escala piloto alimentados com dejetos de bovinos leiteiros e suínos.** Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados). Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016.

FILIPPSSEN, L. F.; RIBEIRO, J.; LEITE, D. M. G. Perfil de resistência e sensibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarreia criados ao ar livre na região sudoeste do Paraná, Brasil. **Veterinária Notícias**, v. 11, p. 53-58, 2005.

FOLEY, J. A. N.; RAMANKUTTY, K. A.; BRAUMAN, E. S.; CASSIDY, J. S.; GERBER, M.; JOHNSTON, N. D.; MUELLER, C.; O'CONNELL, D. K.; RAY, P. C.; WEST, C.; BALZER, E. M.; BENNETT, S. R.; CARPENTER, J.; HILL, C.; MONFREDA, S.; POLASKY, J.; ROCKSTROM, J.; SHEEHAN, S.; SIEBERT, D. T.; ZAKS, D. P. M. Solutions for a cultivated planet. **Nature**, v. 478, n. 7369, p. 337-342, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

FRANCO, R. M.; MANTILLA, S. P. S.; GOUVÊA, R.; OLIVEIRA, L. A. T. Resistência Antimicrobiana de *Escherichia Coli* isoladas de Carne e Dejetos Suínos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2010.

FRAZÃO, L. A. **Estudo comparativo de métodos bioquímicos, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e método molecular para a caracterização fenotípica e genotípica de bactérias ácido-láticas isoladas da microbiota fecal de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) no Brasil.** 2014. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Zootecnia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

GARCÍA-FELIZ, C; COLLAZOS, J. A.; CARVAJAL, A.; VIDAL, A. B.; ALADUEÑA, A.; RAMIRO, R.; DE LA FUENTE, M.; ECHEITA, M. A; RUBIO, P. Salmonella enterica infections in Spanish swine fattening units. **Zoonoses Public Health.**, v. 54, n. 8, p. 294-300, 2007.

GARYBYAN, L.; AVASHIA, N. Polymerase chain reaction. **J. Invest. Dermatol.**, v. 133, n. 3, e6, Mar. 2013.

GENOVESE, A. L.; UDAETA, L. C. R. G.; GALVÃO, L. C. R.. Aspectos energéticos da biomassa como recurso no Brasil e no mundo. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 6., 2006, Campinas - Agrener 2006. [**Anais...**] Campinas, 2006.

GOMES, A. C. A; ROCHA, M. M.; GALVÃO, A. S.; ALBINO, P. M. B. Incentivos para a viabilização do biogás a partir dos resíduos da pecuária leiteira no Estado de Minas Gerais. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 30, p. 149-160, jul. 2014.

GUJER, W.; ZEHNDER, A. J. B. Conversion processes in anaerobic digestion. **Wat. Sci. Tech.**, n. 15, p. 127, 1983.

HERBEL, S. R.; VAHJEN, W.; WIELER, L. H.; GUENTHER, S. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. **Gut Pathogens**, London, v. 5, n. 1, 2013.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

HUDSON, C. R.; FEDORKA-CRAY, P. J.; JACKSON-HALL, M. C.; HROTT, L. M. Anomalies in species identification of enterococci from veterinary sources using a commercial biochemical identification system. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 36, n. 4, p. 245-250, 2003.

HUNT, H. E.; RICE, E. W. Microbiological examinations. In: EATON, A. D. (Ed.). **Standard methods for the examination of water & wastewater**. 21. ed. Washington: APHA, 2005. Part 9000, p. 9-1 – 9-169, 2005.

IAPAR. **Agronegócio do Paraná**: Perfil e características das demandas das cadeias produtivas. Londrina, 2000. 277 p. (IAPAR. Documento, 24).

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

JORGENSEN, J. H.; CRAWFORD, S. A.; ALEXANDER, G. A. Rapid identification of group D Streptococci of group D streptococci with the API 20S system. **J. Clin. Microbiol.**, v. 17, p. 1096-1098, 1983.

KELLEHER, B. P.; LEAHY, J. J.; HENIHAN, A. M.; O'DWYER, T. F.; SUTTON, D.; LEAHY, M. J. Advances in poultry litter disposal technology – a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 27-36, 2002.

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

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W.M.; SCHERECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C.; PROCOP, G. L. 2008. **Diagnóstico Microbiológico**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

KRAUSE, L.; DIAZ, N. N.; EDWARDS, R. A.; GARTEMANN, K. H.; KROMEKE, H.; NEUWEGER, H.; PUHLER, A.; RUNTE, K. J.; SCHULUTER, A.; STOYE, J.; SZCZEPANOWSKI, R.; TAUCH, A.; GOESMANN, A. Taxonomic composition and gene content of a methane-production microbial community isolated from biogas reactor. **Journal of biotechnology**, v. 136, n. 1-2, p. 91-101, 2008.

KUMAR, A.; ROBERTS, D.; WOOD, K.E.; LIGTH, B.; PARRILHO, J.E.; SHARMA, S. Duration of hypotension before initiation of effective therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. **Crit Care Med.** 34(6): 1589-96, 2006.

KUNZ, A.; SCHIOCHETTA, O.; MIELE, M.; GIROTTO, A. F.; SANGOI, V. **Comparativo de custos de implantação de diferentes tecnologias de armazenagem** / Tratamento e distribuição de dejetos suínos. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. 16 p. (Embrapa Suínos e Aves. Circular técnica, 42)

LARSEN, E. H. et al. Use of indicators for monitoring the reduction of pathogens animal waste treated in biogas Plants. **Zentralblattfür Hygieneund Umweltmedizin**, v. 195, n. 5-6, p. 544-555, 1994.

LEITE, A. M. O.; FRANCO, R. M. Coliformes totais e *Escherichia coli* em coxas de frango comercializados no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 2, p. 80-83, 2006.

LIGOZZI, M.; BERNINI, C.; BONORA, M. G.; FATIMA, M. de; ZULIANI, J.; FONTANA, R. Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 5, p. 1681-1686, 2002.

LIMA, G. J. M. M. Nutrição de suínos: ferramenta para reduzir a poluição causada pelos dejetos e aumentar a lucratividade do negócio. In: SEGANFREDO, M. A. (Ed.). **Gestão Ambiental na Suinocultura**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. p. 63-101.

LIVORATTI, P. A. **Utilização do biogás proveniente da suinocultura como fonte de energia– estudo de caso**. 2009. Trabalho de conclusão de curso–Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, SP.

LUCAS JÚNIOR, J.; GALBIATTI, J. A.; ORTOLANI, A. F. Produção de biogás a partir de estrume de ruminantes e monogástricos com e sem inóculo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 16., 1987, Jundiaí. **Resumos...** Jundiaí: DEA/IA/SBEA, 1987. p. 65.

LUCAS JUNIOR, J.; ORTOLANI, A. F.; BENINCASA, M.; IMADA, R. Y. Avaliação do Uso de inóculo no desempenho de biodigestores abastecidos com estrume de frangos de corte com cama de maravalha. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 22., 1993, Ilhéus. **Anais...** Ilhéus: SBEA/CEPLAC, 1993. v. 2, p. 915-30.

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

MANAFI, M.; KREMSMAIER, B. Comparative evaluation of different Chromogenic fluorogenic media for detecting Escherichia coli O157:H7 in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 257-262, 2001.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Bovinos e Bubalinos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 08.Abr.2013.

_____. Decreto nº 4.954/2004 (DECRETO DO EXECUTIVO) de 14 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 jan. 2004.

MARTINEZ, J. L.; BAQUERO, F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. **Antimicrob. Agents Ch.**, v. 44, p. 1771-1777, 2000.

MATA-ALVAREZ, J.; MACÉ, S.; LLABRÉS, P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 3-16, 2000.

MATEU, A.; MATA-ALVAREZ, J.; PARÉS, R. Enterobacterial and viral decay experimental models for anaerobic digestion of piggery waste. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 38, p. 291-296, 1992.

MATOS, A.T. **Tratamento de resíduos agroindustriais**. Fundação Estadual do Meio Ambiente. Curso sobre Tratamento de Resíduos Agroindustriais. Maio de 2005.

MEDEIROS, M. B.; LOPES, J. S. **Biofertilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola**. Bahia Agríc., v. 7, n. 3, p. 24-26, nov. 2006.

MEDEIROS, M. B.; WANDERLEY, P. A.; WANDERLEY, M. J. A. Biofertilizantes líquidos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 31, p. 38-44, 2003.

MEINERZ, C. C.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C.; ASSI, L.; HACK, E. C.; SATURINO, P. M. Geração de resíduo provenientes da suinocultura na região Oeste do Paraná: Um caso de insustentabilidade. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA E SUSTENTABILIDADE AMBIENTAL - COLASSA, 1., 2011, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2011.

MENDONÇA, E. F. **Tratamento anaeróbio dos efluentes oriundos da bovinocultura de leite em biodigestor tubular**. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR.

MERCK. **Chromocult® Coliform Agar now Approved for Processed Food**. 2009. Disponível em: <<http://www.rapidmicrobiology.com/news/1054h30.php>>. Acesso em 25 jan. 2017.

MERKEL, J. A. **Managing livestock wastes**. Connecticut: AVI Publishing, 1981. 419 p.

MIELE, M. et al. Tratamento dos efluentes de usinas de biogás. **Revista de Política Agrícola**, v. 24, n. 1, p. 31-46, 2014.

MIELLE, M. **Contratos, especialização, escala de produção e potencial poluidor na suinocultura de Santa Catarina**. 2006. 286 f. Tese (Doutorado em Agronegócios) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

MINAS GERAIS (estado). Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. **Legislação Ambiental**. [2017]. Disponível em: <<http://www.siam.mg.gov.br/sla/action/Consulta.do>>. Acesso em: 26 jan 2017.

MIZRAHI-MAN, O.; DAVENPORT, E. R.; GILAD, Y. Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: evaluation of Effective Study Designs. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53608, 2013.

MOLLER, H. B.; SOMMER, S. G.; AHRING, B. K. Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. **Biomass Bioenergy**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 485-495, 2004.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MOURA, J. P.; PANNIR SELVAM, P. V. P. Sistema integrado de energia usando fundamentos de engenharia ambiental. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 6., 2006, Campinas - Agrener 2006. [**Anais...**] Campinas, 2006.

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

NICODEMO, M. L. F. **Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 54 p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 106).

NISHIMURA, R. **Análise de balanço energético de sistema de produção de biogás em granja de suínos: implementação de aplicativo computacional**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

OLIVA, C. A.; SOUZA, J.; SOUZA, S. N. M.; SORDI, A. Potencial de conservação de energia nos processos de produção em uma propriedade rural. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 4., 2002, Campinas. **Proceedings online...** Disponível em: <http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC000000022002000200041&lng=en&nrm=abn>. Acesso em: 26 Jan. 2017

OLIVEIRA, R. A.; CAMPELO, P. L. G.; MATOS, A. T.; MARTINEZ, M. A.; CECON, P. R. Influência da aplicação de águas residuárias de suinocultura na capacidade de infiltração de um solo podzólico vermelho-amarelo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 2, p. 263-267, 2000.

OLIVEIRA, P. A. V. Produção e aproveitamento do biogás. In: _____ (Coord.). **Tecnologias para o manejo de resíduos na produção de suínos**: manual de boas práticas. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2004. 109 p.

OLIVEIRA, R. M. S.; TAVARES, C. R. G.; COSSIC, E. S. Processo integrado para tratamento de resíduos gerados na suinocultura. In: FORUM AMBIENTAL DA ALTA PAULISTA, 2., 2006, Tupã, SP. **Anais...** Tupã, SP, 2006.

OLIVEIRA, L. A.; MARQUES, F. S.; HOEPERS, A. **Dimensionamento do potencial de geração distribuída pela biomassa animal residual na bacia do Paraná 3**. Foz do Iguaçu: ADEOP – Agência de Desenvolvimento Regional do Extremo Oeste do Paraná, 2010.

OLIVER, A. P. M. et al. **Manual de treinamento em biodigestão**. 2. ed. Salvador: Winrock Internacional, 2008. 16 p.

ORRICO JÚNIOR, M. A. P.; ORRICO, A. C. A.; LUCAS JÚNIOR, J. de. Influência da relação volumoso: concentrado e do tempo de retenção hidráulica sob a biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 386-394, maio/jun. 2010.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, p. 734-740, 1997.

PALERMO-NETO, J.; TITZE, R. A. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2002. p. 558-573.

PAZINATO, J. M.; PAULO, E. N.; MENDES, L. W.; VAZOLLER, R. F.; TSAI, S. M. Molecular characterization of the archaeal community in an Amazonian wetland soil and culture-dependent isolation of methanogenic Archaea. **Diversity**, n. 2, p. 1026-1047, 2010.

PECORA, V. **Implantação de uma unidade demonstrativa de geração de energia elétrica a partir do biogás de tratamento do esgoto residencial da USP – estudo de caso**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Instituto de Eletrotécnica e Energia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

QUADROS, D. G.; OLIVER, A. P. M.; REGIS, U.; VALLADARES, R.; SOUZA, P. H. F.; FERREIRA, E. J. Biodigestão anaeróbia de dejetos de caprinos e ovinos em reator contínuo de PVC flexível. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, v. 14, n. 3, p. 326-332, 2010.

RANZI, T. J. D.; ANDRADE, M. A. N. Estudo de viabilidade de transformação de esterqueiras e bioesterqueiras para dejetos de suínos em biodigestores rurais visando o aproveitamento do biofertilizante e do biogás. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL E GERAÇÃO DISTRIBUÍDA, 5., 2004, Campinas. **Anais...** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2004.

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

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

RODRIGUEZ, J. A. G. et al. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. In: PROCEDIMIENTOS em microbiología clínica. Procedimiento 11, 2000. Disponível em: < http://coesant-seimc.org/documents/MétodosBásicos_SensibilidadAntibióticos.pdf >. Acesso em: 26 jan 2017.

RUOFF, K. L.; De La MAZA, L.; MURTAGH, M. J.; SPARGO, J. D.; FERRARO, M. J. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, n. 3, p. 435-437, 1990.

SÁ, M. F. **Dinâmica da população de coliformes após a aplicação de dejetos de suínos no solo e durante a sua compostagem automatizada.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

SACHS, I. A revolução energética do século XXI. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 21, n. 59, p. 21-38, 2007.

SAHLSTRÖM, L.; ASPAN, A.; BAGGE, E.; DANIELSSON-THAM, M-L.; ALBIHN, A. Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. **Water Research**, v. 38, p. 1989-1994, 2004.

SALOMON, R. K.; TIAGO FILHO, G. L. **Biomassa.** Itajubá, MG: FAPEPE, 2007. 36 p. (Série Energias Renováveis).

SANT`ANNA JR., G. L. **Tratamento biológico de efluentes:** fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Interciência, 2010. 418 p.

SANTOS, A. C.; AKIBA, F. **Biofertilizantes líquidos:** uso correto na agricultura alternativa. Seropédica: Imprensa Universitária/UFRRJ, 1996. 35 p.

SANTOS, A. C. V. **Biofertilizantes líquidos:** o defensivo agrícola da natureza. 2. ed. Niterói: EMATER – RIO, 1992. 162 p.

_____. A ação múltipla do biofertilizante líquido como fertitoprotetor em lavouras comerciais. In: ENCONTRO DE PROCESSOS DE PROTEÇÃO DE PLANTAS: Controle ecológico de pragas e doenças, 1., 2001, Botucatu. **Resumos...** Botucatu: Agroecológica, 2001. p. 91-96.

SCHOKEN-ITURRINO, R. P.; BENINCASA, M.; LUCAS JUNIOR, J.; FELIS, S. D. Biodigestores contínuos: isolamento de bactérias patogênicas no efluente. **Engenharia Agrícola**, v. 15, p. 105-108, 1995.

SCHROEDER, C. M.; ZHAO, C.; DEBROY, C.; TORCOLINI, J.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; WAGNER, D. D.; MCDERMOTT, P. F. R.; WALKER, D.; MENG, J. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. **Appl. Environ. Microb.**, v. 68, p. 576-581, 2002.

SCHMITT, H.; STOOB, K.; HAMSCHER, G.; SMIT, E.; SEINEN, W. Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils: microcosm and field studies. **Microbiol. Ecol.**, v. 51, p. 267-276, 2006.

SEIXAS, A. S. S. **Qualidade sanitária de efluentes de biodigestores contínuos alimentados com dejetos de suínos e empregados como biofertilizantes**. 1994. 95 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.

SEIXAS, F. J. M.; PASCHOARELI JUNIOR., D.; FARIA JUNIOR., M. J. A. Impacto da utilização de inversores em sistemas de geração distribuída sobre equipamentos rurais. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 4., 2002, Campinas. **Anais...** Campinas: Unicamp, 2002.

SILVA, F. F. P.; SANTOS, M. A. A.; SCHMIDT, V. Resistência a antimicrobianos de *Escherichia coli* isolada de dejetos suínos em esterqueiras. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 60, p. 762-765, 2008.

SISTEMAS de identificação BBL Crystal: Kit Gram Positivo ID: instruções de uso. SÃO PAULO: BECTON DICKISON AND COMPANY, 2002. 17 p.

SOUZA, S. N. M.; PEREIRA, W. C.; NOGUEIRA, C. E. C.; PAVAN, A. A.; SORDI, A. Custo da eletricidade gerada em conjunto motor gerador utilizando biogás da suinocultura. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 26, p. 127-133, 2004.

SOWERS, K. R. Methanogenic Archaea: an overview. In: SOWERS, K. R.; SCHREIER, H. J. (Ed.). **Archaea – a laboratory manual**. Methanogens. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. p. 3-13.

SPEECE, R. E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. **Environmental Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 416A- 27A, 1983.

_____. **Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters**. Tennessee: Vanderbilt University, 1996. 394 p.

- STEIL, L. **Avaliação do uso de inóculos na biodigestão anaeróbia de resíduos de aves de postura, frangos de corte e suínos**. 2001. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.
- TAKASHIMA, M.; SPEECE, R. E. Mineral requirement for methane fermentation. **Critical Reviews in Environmental Control**, vol. 19, p. 465-479, 1990.
- TEIXEIRA, L.M.; FACKLAM, R.R Special phenotypic methods for detecting antibacterial Resistance, In: MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 8. Ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 1178-81. 2003.
- THIELE, J. H.; ZEIKUS, J. G. The anionexchange substrate shuttle process: a new approach to two-stage biomethanation of organic and toxic wastes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 521-535, 1988.
- THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. **J. Plant. Nutr. Soil Sci.**, v. 166, p. 145-167, 2003.
- THOMSON, S. V.; ALLEN, R. M. Mechanisms of survival of zoospores of *Phytophthora parasitica* in irrigation water [Foot rot of citrus, fungal diseases]. **Phytopathology**, n. 66, p. 1198-1202, 1976.
- TORRES CASTILLO, R.; LA BRESLUENGO, P.; MATA ALVAREZ, J. Temperature effect on anaerobic digestion of bedding straw in a one-phase system at different inoculums concentration. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 54, n. 1, p. 55-66, 1995.
- TORTORA, J.G.; FUNKE, R.B.; CASE, L.C.; 2016 **Microbiologia** 12^a Ed. Porto Alegre: Artmed
- TRINGE, S. G.; HUGENHOLTZ, P.A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 11, n. 5, p. 442-446, 2008.
- TURNIDGE, J. D.; FERRARO, M. J.; JORGENSEN, J. H. Susceptibility test methods: general considerations. In: **Manual of Clinical Microbiology**. 10. ed. Washington: ASM Press, 2011.cap. 67, p. 1115-1121.
- TYRRELL, J.G.; BETHUNE, N.R.; WILLEY, B.; LOW, E. D. Species identification of Enterococci via intergenic ribosomal PCR. **Journal of Clinical Microbioloy**, v.35, n.1, p. 1054-1060, 1997.
- VAN DEN BOGAARD, A. E.; BRUISMA, N.; STOBBERINGH, E. E. The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 146-148, 2000.
- VAN HAANDEL, A. C.; LETTINGA, G. **Tratamento anaeróbio de esgotos**: manual para regiões de clima quente. Campina Grande: Epgraf, 1994. 210 p.

- VENGLOVSKY, J.; MARTINEZ, J.; PLACHA, I. Hygienic and ecological risks connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture. **Livestock Science**, v. 102, n. 3, p. 197-203, 2006.
- VOERMANS, J. A. M.; VERDOES, N.; HARTOG, L. A. Environmental impacts of pig farming. **Pig News and Information**, Farnham Royal, v. 15, n. 2, p. 51n-54n, 1994.
- VOOLAPALLI, R. K.; STUCKEY, D. C. Stability enhancement of anaerobic digestion through membrane gas extraction under organic shock loads. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, vol. 73, p. 153-161, 1998.
- YADVIKA, S.; SREEKRISHNAN, T. R.; KOHLI, S.; RANA, V. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques - a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 95, n. 1, p. 1-10, 2004.
- WEHR, P. P. **Biofertilizantes, a base de esterco bovino, no controle de Phytophthora nicotianae em citros**. 2014. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- WERRES, S.; WAGNER, S.; BRAND, T.; KAMINSKI, K.; SEIPP, D. Survival of Phytophthoramorumin recirculating irrigation water and subsequent infection of Rhododendron and Viburnum. **Plant Dis.**, v. 91, p.1034-1044, 2007.
- WITTE, W. Selective pressure by antibiotic use in livestock. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 16, n. 15, p. 19-24, 2000.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.
- ZANGENAH, S.; GÜLERYUZ, G.; BORÄNG, S.; ULLBERG, M.; BERGMAN, P.; OZENCI, V. Identification of clinical Pasteurella isolates by MALDI-TOF -- a comparison with VITEK 2 and conventional microbiological methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 2, p. 96-88, 2013.
- ZEHNDER, A. J. B. **Biology of anaerobic microorganisms**. New York: John Wiley, 1988. 872 p.