

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias/Genética e Biotecnologia

**Juliana Alves Resende**

**Avaliação da diversidade microbiana e do risco clínico-  
microbiológico de sistemas de biorreatores para produção de  
biogás e biofertilizante a partir de dejetos da pecuária leiteira**

**Juiz de Fora**

**2013**

**Juliana Alves Resende**

**Avaliação da diversidade microbiana e do risco clínico-  
microbiológico de sistemas de biorreatores para produção de  
biogás e biofertilizante a partir de dejetos da pecuária leiteira**

Tese de doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de concentração Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

**Orientadores:**

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz  
Dr. Jean-Jacques Godon (Orientador Associado)

**Co-orientadores:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Lúcia da Silva  
Prof. Dr. Marcelo Henrique Otenio

Juiz de Fora

2013

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

Alves Resende , Juliana.

Avaliação da diversidade microbiana e do risco clínico-microbiológico de sistemas de biorreatores para produção de biogás e biofertilizante a partir de dejetos da pecuária leiteira / Juliana Alves Resende . -- 2013.

143 f.

Orientador: Cláudio Galuppo Diniz

Coorientador: Marcelo Henrique Otenio

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2013.

1. Digestão anaeróbia. 2. Diversidade filogenética. 3. Genes de resistência. 4. Resistência aos antimicrobianos. 5. Variação sazonal. I. Galuppo Diniz , Cláudio , orient. II. Henrique Otenio , Marcelo , coorient. III. Título.

**Juliana Alves Resende**

**Avaliação da diversidade microbiana e do risco clínico-microbiológico de sistemas de biorreatores para produção de biogás e biofertilizante a partir de dejetos da pecuária leiteira**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dionéia Evangelista César  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Dias Paiva  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Dr. Jailton Costa Carneiro  
Embrapa Gado de Leite

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Fonseca Martins  
Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG

2013

*Aos meus pais, Gislene e Roberto, ao meu irmão Ronaldo, e ao meu marido Vitor,  
por todas as palavras de carinho, amizade e compreensão durante todos os momentos de  
ausência e saudades. Dedico.*

## Agradecimentos

*Voilà c'est fini !!!* Esses anos de tese não foram só uma grande aventura científica ou profissional, foi repleto de encontros felizes, momentos de alegria e dificuldades e que me ajudaram a construir grandes sonhos!

É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram a realização deste trabalho possível.

A esta Universidade, que há nem sei quantos anos me acolheu. Sinto imenso orgulho em ser parte deste Campus. Obrigado a todos os funcionários que tão gentilmente me receberam e auxiliaram neste período. Foram anos inesquecíveis, que muito colaboraram para a pessoa que sou hoje!

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e no exterior.

A FAPEMIG, CNPq, EMBRAPA e o programa LABEX, pelo apoio financeiro para execução do trabalho.

Ao meu orientador, Cláudio Galuppo Diniz, e minha co-orientadora Vânia Lúcia da Silva pelo estímulo, apoio, orientação e amizade meu sincero agradecimento será por toda minha vida!

Ao meu co-orientador, Marcelo Henrique Otenio, pelo apoio e orientação durante as etapas de toda pesquisa, sempre vibrando junto comigo pelos bons resultados obtidos!

Ao grande amigo, Pedro Braga Arcuri, pela grande oportunidade de realizar uma parte deste trabalho no INRA/Narbonne. Obrigada por confiar no meu trabalho e pela amizade!

*Merci à Jean-Jacques Godon, pour toutes les connaissances que vous m'avez apporté durant ces moments passées au Laboratoire des Biotechnologies de l'Environnement de Narbonne. Un grand merci à Anais Bonnafous, une grande amie, pour votre bonne humeur permanente et pour avoir su me guider à travers les méandres du LBE!! Le stage d'un année passé à vos côtés a été extraordinaire!*

*Merci aux amis du LBE... et il y avait beaucoup!! Carlos, Micol, Amandine, Enrica (Matteo), Antonella, Mohana, Alessandro (Virginia), Prawit ... Cette aventure fut belle et vous avez plus que contribué à sa réussite!*

*Merci à tous mes amis de Narbonne... cette ville me manque vraiment!!*

À Claudinha, Carol, Michele e Thiago, por terem sempre uma palavra de incentivo, pelos conselhos e pela grande amizade! Vocês foram fundamentais para o êxito deste trabalho.

Aos IC, Tamara, Samuel, Camila, Pauline e Cristina, que estiveram diretamente envolvidos no desenvolvimento desse projeto, meu eterno agradecimento, por todos os momentos de apoio, trabalho e dedicação.

Aos professores da Microbiologia UFJF: Luzia, Betânia, Márcio, Rosangela e Aline, pelos momentos de trabalho, companheirismo e diversão!

Aos amigos e colegas do laboratório de microbiologia do Rúmen: Jailton, Junior e Marlice por terem me recebido de braços abertos! Obrigada pelos momentos de trabalho e companheirismo!

À Embrapa Gado de Leite, por ceder o local para a realização desta pesquisa e aos funcionários, sempre dispostos a me auxiliar nas coletas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e a Laura, pelo auxílio e apoio na execução do mestrado e doutorado.

A todos os membros da banca examinadora, pela disponibilidade e preciosas colaborações.

Agradeço ainda a todas da família Alves e Resende, obrigada aos familiares que sempre torceram por mim!

Aos meus amigos de Cataguases e da Farmácia, que mesmo distantes sempre mantiveram minha atenção e carinho!

Finalmente, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para execução deste trabalho. Muito Obrigada!

## **DESENVOLVIMENTO**

Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana  
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

Laboratório de Microbiologia do Rúmen  
Embrapa Gado de Leite

*Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement*  
INRA - *Institut National de la Recherche Agronomique* – Narbonne, França

## **COLABORAÇÃO**

Dr. Jailton da Costa Carneiro  
Embrapa Gado de Leite

Dr. Pedro Braga Arcuri  
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Jorge de Lucas Junior  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal

## **APOIO FINANCEIRO**

EMBRAPA

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

CNPq

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPEMIG

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CAPES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior



## RESUMO

Digestão anaeróbia é uma alternativa sustentável para utilização de dejetos animais como insumo energético. Neste contexto, a dinâmica da comunidade microbiana, inativação de patógenos ou mesmo disseminação de genes de resistência durante o processo de biodigestão se torna relevante. Este trabalho avaliou a diversidade taxonômica (domínios *Bacteria* e *Archaea*) e a persistência de grupos bacterianos de relevância e resistência a drogas antimicrobianas, em dois biodigestores contínuos de escala piloto operados a temperatura ambiente em duas estações, verão e inverno. O substrato era composto de fezes bovinas frescas diluídas com água de lavagem dos pisos (sólidos totais de 2 a 3%). Amostras do biogás foram coletadas para determinação dos teores de metano. Para análises físico-químicas dos afluentes (carregamento inicial) e efluentes, alíquotas foram coletadas ao longo de 60 dias de fermentação para análises de sólidos totais, voláteis e pH. Análises das comunidades microbianas foram realizadas por PCR quantitativo (qPCR), PCR-*single strand conformation polymorphism* (SSCP) e análise metagenômica. A densidade de diferentes grupos bacterianos foi realizada por contagem direta. Linhagens bacterianas foram identificadas bioquimicamente utilizando kits comerciais. A susceptibilidade a drogas foi determinada por diluição em ágar. Quantificação de genes que codificam resistência aos macrolídeos (*ermB*), aminoglicosídeos (*aphA2*) e beta-lactâmicos (*bla<sub>TEM-1</sub>*) foram observadas por qPCR. A taxonomia de bactérias clinicamente relevantes foi ainda avaliada, por similaridade, a partir de um banco de dados criado com 30 sequências de DNA codificadoras para o 16S rRNA de bactérias potencialmente patogênicas. Independente da estação, o processo de biodigestão apresentou desempenho semelhante, com taxas de rendimento médio e teores de metano, 59,2% no verão e 53,7% no inverno. A dinâmica e os valores médios do número de cópias do gene V3 *Bacteria* e *Archaea* também foram semelhantes. Ocorreram alterações na composição (filó e famílias) das comunidades microbianas entre as estações e estas mudanças não influenciaram na produção de metano. Provavelmente, ocorreu uma redundância de grupos capazes de realizar funções similares. Foram verificadas reduções significativas de grupos bacterianos de relevância clínico-microbiológica viáveis em ambas as estações. Apesar disso, bactérias multirresistentes foram detectadas tanto nos afluentes como nos efluentes. Cocos Gram-positivos (CGP), o grupo mais prevalente, foi resistente à penicilina e levofloxacino, enquanto resistência à ampicilina, ampicilina-sulbactam e cloranfenicol foi observado com maior frequência entre os bacilos Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* (ENT) e não fermentadores (BGN NF). *Enterococcus spp.* foram os CGP isolados com maior frequência e entre os BGN, *Escherichia coli* foi o mais abundante. Houve redução no número de cópias de todos os genes de resistência (*ermB*, *aphA2* e *bla<sub>TEM-1</sub>*) durante o processo de biodigestão, porém mantidos níveis preocupantes nos efluentes. Taxonomia bacteriana avaliada por similaridade das sequências mostrou *Clostridium spp.*, *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas* como as bactérias mais identificadas. Apesar dos dados apresentados nesse estudo endossarem a digestão anaeróbia como solução importante para reciclagem e produção de energia, levanta preocupações sobre riscos de caráter sanitários durante o processo. Além disso, discussões a respeito do uso de antimicrobianos na pecuária leiteira são necessárias.

**Palavras-Chave:** Digestão anaeróbia; diversidade filogenética; genes de resistência; resistência aos antimicrobianos; variação sazonal.

## ABSTRACT

Anaerobic digestion is a sustainable alternative to using animal waste as an energy source. In this context, the dynamics of the microbial community, inactivation of pathogens or even spread of resistance genes during the process of digestion becomes relevant. This study evaluated the taxonomic diversity (*Bacteria* and *Archaea* domains) and the persistence of bacterial groups of relevance and resistance to antimicrobial drugs, analyzing two continuous pilot scale digesters operated at ambient temperature in two seasons, summer and winter. The substrate was composed fresh cow dung diluted with water for washing floors (total solids 2 to 3%). Biogas samples were collected to determine the levels of methane. For physico-chemical analysis of influent (initial load) and effluent, aliquots were collected during 60 days of fermentation for analyzes of total volatile solids and pH. Analyzes of microbial communities were performed by quantitative PCR (qPCR), PCR-single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and metagenomics. The density of different bacterial groups was performed by direct counting. Bacterial strains were identified biochemically using commercial kits. The drug susceptibility was determined by the agar dilution method. Quantification of genes encoding resistance to macrolides (*ermB*), aminoglycosides (*aphA2*) and beta-lactams (*bla<sub>TEM-1</sub>*) were observed by qPCR. The taxonomy of clinically relevant bacteria was further evaluated by similarity from a database created with 30 DNA sequences coding for 16S rRNA of potentially pathogenic bacteria. Independent of season, the process of digestion showed similar performance, with rates average yield and percent methane, 59.2% in summer and 53.7% in winter. The dynamics and the average values of the number of copies of the gene V3 *Bacteria* and *Archaea* were also similar. Changes occurred in the composition (phylum and families) of the microbial communities between seasons and these changes did not influence the production of methane. Probably occurred a redundancy group able to perform similar functions. Significant reductions of bacterial groups of clinical and microbiological relevance viable in both seasons were observed. Despite this, multiresistant bacteria were detected in both the affluents and effluents. Gram-positive cocci (GPC), the most prevalent group was resistant to penicillin and levofloxacin, while ampicillin, ampicillin-sulbactam, chloramphenicol was observed more frequently among Gram-negative rods of the *Enterobacteriaceae* family (ENT) and not fermenters (NF GNR). *Enterococcus* spp. were most frequently GPC isolated and among the GNR, *Escherichia coli* was the most abundant. There was reduction in the number of copies of all the resistance genes (*ermB*, *aphA2* and *bla<sub>TEM-1</sub>*) during the process of digestion, however, the effluent still showing concerning levels. Bacterial taxonomy evaluated by similarity of the sequences showed *Clostridium* spp., *Acinetobacter* and *Streptotrophomonas* were the bacteria more identified. In spite the data presented in this study showed anaerobic digestion as an important solution to recycling and energy production, raises concerns about health risks of character during the process. In addition, discussions regarding the use of antimicrobials in dairy farming are needed.

**Key words:** Anaerobic digestion; phylogenetic diversity; resistance genes, resistance to antimicrobials; seasonal variation

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Preparação do substrato, mistura de fezes bovinas frescas juntamente com água de lavagem dos pisos do *free stall*, coletadas no campo experimental da Embrapa Gado de Leite..... 31
- Figura 2.** Representação esquemática de um dos biodigestores (A) de escala laboratorial e do gasômetro (B) usados para avaliação do processo de digestão anaeróbia, operados a temperatura ambiente..... 32
- Figura 3.** Esquema referente aos dias de coleta das amostras dos afluentes, efluentes e biogás e as análises físico-químicas realizadas subsequentemente. Amostras coletadas nos meses de verão e de inverno foram denotadas com as letras S e W, respectivamente. Os números (0 a 60) referindo-se as datas de amostragem e as letras (a e b) correspondem a cada um dos dois biodigestores em que foi realizada a fermentação..... 34
- Figura 4.** Esquema referente aos dias de coleta das amostras dos afluentes, efluentes e biogás e as análises da dinâmica e sucessão ecológica realizadas subsequentes. Amostras coletadas nos meses de verão e de inverno foram denotadas com as letras S e W, respectivamente. Os números (0 a 60) referem-se aos dias de amostragem e as letras (a e b) correspondem a cada um dos dois biodigestores em que foi realizada a fermentação..... 34
- Figura 5.** Produção de metano (A) e rendimento de metano (B) a partir da digestão anaeróbia de dejetos bovinos em função de padrões sazonais (verão e inverno) e temporais (período de 60 dias de fermentação). Os dados são expressos como a média dos dois biodigestores operados em cada estação.... 43
- Figura 6.** Abundância absoluta dos microrganismos dos domínios *Bacteria* e *Archaea* por qPCR em função dos padrões sazonais (verão e inverno) e temporais (período de 60 dias de fermentação). Todos os dados são expressos como  $\log_{10}$  cópias dos genes 16S rRNA de bactérias ou arqueas por grama de amostras dos afluentes ou efluentes. Os valores indicam a média (n = 10) e o eixo x representa o tempo (dias) de coleta das amostras..... 44
- Figura 7.** Representação da relação *Archaea/Bacteria* em função da produção de metano durante o processo de digestão anaeróbia operado nos meses de verão (A) e inverno (B)..... 45
- Figura 8.** Análise de componentes principais dos perfis CE-SSCP entre os dados das comunidades bacterianas das amostras finais de verão, S60a e S60b, e inverno, W60a e W60b. Amostras iniciais do processo operados no verão (S0 a S11) e no inverno (W0 a W8) estão evidenciadas..... 46
- Figura 9.** Representação da estrutura de padrões dos perfis CE-SSCP. Os diferentes perfis de CE-SSCP foram alinhados com base em um padrão interno ROX e as áreas foram normalizados. Cada pico de migração do perfil CE-SSCP é proporcional à quantidade de DNA detectado, ou seja, a abundância relativa de cada espécie..... 47
- Figura 10.** Análise de componentes principais dos perfis CE-SSCP entre os dados das comunidades arqueas das amostras dos afluentes e efluentes

obtidas durante o processo de digestão anaeróbia verão (A) e no inverno (B)...	48
<b>Figura 11.</b> Similaridade taxonômica das sequências bacterianas e arqueas recuperada das amostras finais, S60a e S60b, obtidas após 60 dias de fermentação em biodigestores operados no verão e nas amostras, W60a e W60b obtidas nas mesmas condições no inverno.....	50
<b>Figura 12.</b> Esquema referente às datas de coleta das amostras dos afluentes e efluentes e as análises microbiológicas realizadas. Amostras coletadas nos meses de verão e de inverno foram denotadas com as letras S e W, respectivamente. Os números (0 a 60) referem-se as datas de amostragem e as letras (a e b) correspondem a cada um dos dois biodigestores em que foi realizada a fermentação.....	70
<b>Figura 13.</b> Valor médio das contagens bacterianas viáveis (log UFC/mL) das amostras dos afluentes (carregamento inicial) e dos efluentes (dias 15, 30 e 60) obtidas de biodigestores alimentados com dejetos bovinos operados a temperatura ambiente durante verão e inverno. ENT: Bacilos Gram-negativos da família Enterobacteriaceae; BGN NF: Bacilos Gram-negativos não fermentadores; CGP/C+: Cocos Gram-positivos/catalase positivo; CGP/C-: Cocos Gram-positivos/catalase-negativo. Letras diferentes, incluindo minúsculas ou maiúsculas e " * " indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).....	79
<b>Figura 14.</b> Abundância absoluta do gene <i>ermB</i> durante a digestão anaeróbia nos meses de verão (A) e de inverno (B). Todos os dados são expressos como $\log_{10}$ cópias de <i>ermB</i> por grama de amostras dos afluentes ou efluentes. Barra de erros indicam valores máximos e mínimos ( $n = 10$ ); Limite superior da caixa indica o percentil de 75% dos dados e o inferior indica o percentil de 25%, e as linhas horizontais dentro das caixas indicam os valores medianos. Letras diferentes mostram diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Símbolos (●) indicam valores médios da quantificação de <i>ermB</i> e (x) significa valores médios da quantificação de bactérias totais (16S rRNA).....	90
<b>Figura 15.</b> Abundância absoluta do gene <i>aphA2</i> durante a digestão anaeróbia nos meses de verão (A) e de inverno (B). Todos os dados são expressos como $\log_{10}$ cópias de <i>aphA2</i> por grama de amostras dos afluentes ou efluentes. Barra de erros indicam valores máximos e mínimos ( $n = 10$ ); Limite superior da caixa indica o percentil de 75% dos dados e o inferior indica o percentil de 25%, e as linhas horizontais dentro das caixas indicam os valores medianos. Letras diferentes mostram diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Símbolos (●) indicam valores médios da quantificação de <i>aphA2</i> e (x) significa valores médios da quantificação de bactérias totais (16S rRNA).....	91
<b>Figura 16.</b> Abundância absoluta do gene <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> durante a digestão anaeróbia nos meses de verão (A) e de inverno (B). Todos os dados são expressos como $\log_{10}$ cópias de <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> por grama de amostras dos afluentes ou efluentes. Barra de erros indicam valores máximos e mínimos ( $n = 10$ ); Limite superior da caixa indica o percentil de 75% dos dados e o inferior indica o percentil de 25%, e as linhas horizontais dentro das caixas indicam os valores medianos. Letras diferentes mostram diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Símbolos (●) indicam valores médios da quantificação de <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> e (x) significa valores médios da quantificação de bactérias totais (16S rRNA).....	92

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Sequência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas técnicas de CE-SSCP, qPCR e análise metagenômica aplicadas na avaliação da dinâmica, abundância e estrutura das comunidades microbianas durante o processo de digestão anaeróbia.....	38
<b>Tabela 2.</b> Números e estimativas da diversidade de sequências dos domínios <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> nas amostras finais, S60a e S60b, obtidas após 60 dias de fermentação em biodigestores operados no verão e nas amostras, W60a e W60b obtidas nas mesmas condições no inverno.....	50
<b>Tabela 3.</b> Abundância relativa de sequências 16S rRNA do domínio <i>Bacteria</i> nas amostras finais, S60a e S60b, obtidas após 60 dias de fermentação em biodigestores operados no verão, e nas amostras W60a e W60b, obtidas nas mesmas condições no inverno.....	53
<b>Tabela 4.</b> Abundância relativa de sequências 16S rRNA do domínio <i>Archaea</i> nas amostras finais, S60a e S60b, obtidas após 60 dias de fermentação em biodigestores operados no verão e nas amostras, W60a e W60b obtidas nas mesmas condições no inverno.....	54
<b>Tabela 5.</b> Sequência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas técnicas de qPCR aplicadas na avaliação da dinâmica e abundância de genes de resistências.....	75
<b>Tabela 6.</b> Sequências do gene 16S rRNA de bactérias clinicamente relevantes inseridas no banco de dados <i>in-house</i> criado para classificações taxonômicas das OTUs definidas neste estudo.....	77
<b>Tabela 7.</b> Espécies bacterianas recuperadas de amostras dos afluentes obtidas de biodigestores alimentados com dejetos bovinos operados a temperatura ambiente durante duas estações (verão e inverno).....	81
<b>Tabela 8.</b> Espécies bacterianas recuperadas de amostras dos efluentes obtidas de biodigestores alimentados com dejetos bovinos operados a temperatura ambiente durante duas estações (verão e inverno).....	82
<b>Tabela 9.</b> Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de linhagens bacterianas recuperadas das amostras dos afluentes obtidas de biodigestores alimentados com dejetos bovinos operados a temperatura ambiente durante duas estações (verão e inverno).....	84
<b>Tabela 10.</b> Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de linhagens bacterianas recuperadas das amostras dos efluentes de biodigestores alimentados com dejetos bovinos operados a temperatura ambiente durante duas estações (verão e inverno).....	85
<b>Tabela 11.</b> Frequência de bactérias multirresistentes a antimicrobianos e índice de múltipla resistência (MAR) entre os grupos de microrganismos isolados de amostras do afluente e efluente de biodigestores alimentados com dejetos bovinos operados a temperatura ambiente durante duas estações (verão e inverno).....	86

<b>Tabela 12.</b> Coeficiente de correlação de Pearson entre a abundância relativa dos diferentes genes de resistência (Abundância absoluta dos genes de resistência/abundância absoluta dos gene 16S rRNA) em todas as amostras de digestão anaeróbia avaliados.....	93
<b>Tabela 13.</b> Porcentagem de sequências similares a sequência 16S rRNA de bactérias clinicamente relevantes nos efluentes finais da digestão anaeróbia amostrados durante os meses de verão e de inverno.....	95

## Lista de abreviaturas e siglas

<b>ACP</b>	Análise do componente principal
<b>AHM</b>	Ágar Hipertônico Manitol
<b>AMH</b>	Ágar Mueller Hinton
<b>AMI</b>	Amicacina
<b>AMP</b>	Ampicilina
<b>AMS</b>	Ampicilina/sulbactam
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>AS</b>	Ágar sangue
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i> - Coleção de Cultura Tipo Americana
<b>AZI</b>	Azitromicina
<b>BE</b>	Bile esculina
<b>BGN</b>	Bastonetes Gram-negativos
<b>BGN NF</b>	Bastonetes Gram-negativos não fermentadores
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> – Ferramenta básica de busca e alinhamentos locais
<b>CE-SSCP</b>	<i>Capillary Electrophoresis - Single Strand Conformation Polymorphism</i> – Eletroforese capilar - Polimorfismo de conformação de filamento único
<b>CGP</b>	Cocos Gram-positivos
<b>CGP/C+</b>	Cocos Gram-positivos/Catalase positiva
<b>CGP/C-</b>	Cocos Gram-positivos/Catalase negativa
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CLO</b>	Cloranfenicol
<b>CLSI</b>	<i>“Clinical Laboratory Standards Institute”</i> - Instituto de Padronização para Laboratórios Clínicos
<b>CPM</b>	Cefepime
<b>CT</b>	<i>Threshold cycle</i> - limiar de detecção
<b>CTZ</b>	Ceftazidima
<b>DNA</b>	<i>“Desoxyribonucleic acid”</i> - Ácido Desoxirribonucleico
<b>EMB</b>	Ágar Eosina Azul de Metileno
<b>EMBRAPA</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<b>ENT</b>	Bastonetes Gram-negativos família <i>Enterobacteriaceae</i>
<b>ERI</b>	Eritromicina
<b>GEN</b>	Gentamicina
<b>ICB/UFJF</b>	Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora

<b>Índice MAR</b>	Índice de múltipla resistência a antibióticos
<b>Índice H'</b>	Índice de diversidade Shannon-Weaver
<b>Índice D</b>	Índice de diversidade Simpson
<b>INRA</b>	<i>Institut National de la Recherche Agronomique</i>
<b>LEV</b>	Levofloxacino
<b>MER</b>	Meropenen
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> – Reação da cadeia da polimerase quantitativo
<b>PEN</b>	Penicilina
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PTZ</b>	Piperacilina/tazobactam
<b>PVC</b>	Policloreto de vinil
<b>RIF</b>	Rifamicina
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> - Ácido ribonucleico
<b>OTU</b>	<i>Operational Taxonomy Units</i> - Unidades taxonômicas operacionais
<b>OXA</b>	Oxacilina
<b>Sm</b>	Similaridade
<b>STX</b>	Sulfametoxazol/trimetroprim
<b>SV</b>	Sólidos voláteis
<b>TET</b>	Tetraciclina
<b>TRH</b>	Tempo de retenção hidráulica
<b>TSA</b>	Ágar tripcaseína de soja
<b>TSB</b>	Caldo tripcaseína de soja
<b>TSI</b>	<i>Triple Sugar Iron agar</i> – <i>Agar Tríplice Açúcar Ferro</i>
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>UFJF</b>	Universidade Federal de Juiz de Fora
<b>VAN</b>	Vancomicina



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b>	19
<b>CAPÍTULO I. ESTUDO DA COMUNIDADE MICROBIANA DURANTE A DIGESTÃO ANAERÓBIA A PARTIR DE DEJETOS DA PECUÁRIA LEITEIRA</b>	21
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b>	22
1.1 PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE DEJETOS DE BOVINOS LEITEIROS	22
1.2 PROCESSOS DE CONVERSÃO BIOQUÍMICA DA MATÉRIA ORGÂNICA DURANTE A DIGESTÃO ANAERÓBIA	23
1.3 DOMÍNIOS <i>BACTERIA</i> E <i>ARCHEAE</i> NOS BIODIGESTORES ANAERÓBIOS	25
1.4 FATORES QUE AFETAM O PROCESSO DE BIODIGESTÃO ANAERÓBIA	28
<b>2 OBJETIVOS</b>	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	31
3.1 ENSAIO DE BIODIGESTÃO ANAERÓBIA	31
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS BIODIGESTORES UTILIZADOS	31
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICA E PARA AS ANÁLISES DA DINÂMICA E SUCESSÃO MICROBIANA DOS AFLUENTES E EFLUENTES	33
3.4 TEORES DE SÓLIDOS TOTAIS (ST) E TEORES DE SÓLIDOS VOLÁTEIS (SV)	34
3.5 DETERMINAÇÃO DO VOLUME, PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE BIOGÁS	35
3.6 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DO AFLUENTE E EFLUENTE	36
3.7 PCR QUANTITATIVO (qPCR)	37
3.8 CE-SSCP ( <i>CAPILLARY ELECTROPHORESIS - SINGLE-STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM</i> )	39
3.9 ANÁLISE METAGENÔMICA	40
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	42
4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS BIODIGESTORES	42

	OPERADOS A TEMPERATURA AMBIENTE	
4.2	VISÃO GERAL DA COMUNIDADE MICROBIANA	44
4.2.1	Abundância e estrutura dos domínios <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> durante o processo de digestão anaeróbia	44
4.2.2	Estrutura das comunidade microbiana: filo e família	49
4.2.3	Estrutura das comunidades microbianas: OTU	52
	<b>CAPÍTULO II. ANÁLISE DO RISCO CLÍNICO-MICROBIOLÓGICO DURANTE A DIGESTÃO ANAERÓBIA: BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS</b>	58
<b>1</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	59
1.1	DEJETOS BOVINOS COMO FONTE DE MICRORGANISMOS POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS E GENES DE RESISTÊNCIA	59
1.2	ANTIMICROBIANOS NAS FAZENDAS DE PRODUÇÃO DE GADO LEITEIROS	60
1.3	USO DE EFLUENTES DE BIODIGESTORES COMO BIOFERTILIZANTES	63
1.4	FATORES RESPONSÁVEIS PELA ELIMINAÇÃO OU INATIVAÇÃO DE BACTÉRIAS CLINICAMENTE RELEVANTES NO PROCESSO DE DIGESTÃO	65
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	68
2.1	OBJETIVO GERAL	68
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	68
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	69
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DOS AFLUENTES E EFLUENTES	69
3.2	ANÁLISE QUANTITATIVA	70
3.3	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS	71
3.3.1	Isolamento e identificação de espécies de cocos Gram-positivos	71
3.3.2	Isolamento e identificação de espécies de bastonetes Gram-negativos	72
3.4	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A DROGAS ANTIMICROBIANAS	73
3.4.1.	Perfil de múltipla resistência aos antimicrobianos	74
3.5	EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DO AFLUENTE E EFLUENTE	74
3.6	PCR QUANTITATIVO (qPCR)	74
3.7	IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DNA CODIFICADORES PARA A REGIÃO 16S rRNA DE ESPÉCIES BACTERIANAS POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS	76
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	78

<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	79
4.1	PREVALÊNCIA BACTERIANA E SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DURANTE O PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA	79
4.2	DINÂMICA DE GENES DE RESISTÊNCIA DURANTE O PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA	89
4.3	PREVALÊNCIA DE SEQUÊNCIAS DE BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS	95
	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	98
	<b>CONCLUSÕES</b>	100
	<b>REFERENCIAS</b>	102
	<b>APÊNDICES</b>	115

## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A cadeia produtiva do leite está se tornando cada vez mais significativa economicamente. A ampliação e intensificação desta atividade resultam em novas necessidades para o descarte seguro de grandes quantidades do esterco bovino produzido. Estudos recentes destacam a digestão anaeróbia como forma alternativa de utilização dos dejetos bovinos como insumo energético, o que resulta em geração de biogás e biofertilizantes. Alternativas estas promissoras para a geração descentralizada de energia elétrica, contribuição para sustentabilidade da cadeia produtiva e redução da disseminação de bactérias em terras agrícolas.

As preocupações ambientais relacionadas ao manejo destes dejetos são devido a frequente descarga no solo e em ecossistemas aquáticos, o que favorece a propagação de bactérias potencialmente patogênicas, como *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Mycobacteria*, *Clostridia* e *Yersinia*. Além disso, a pecuária é frequentemente citada como reservatório de bactérias resistentes e de genes de resistência a antibióticos, o que pode ser decorrente da aplicação de grandes quantidades de antimicrobianos na produção animal, com finalidades terapêuticas, profiláticas, ou ainda, como promotores de crescimento.

Em diferentes localidades do mundo, estudos têm demonstrado que os agentes antimicrobianos, como beta-lactâmicos, espectinomicina, florfenicol e tetraciclina, são os mais amplamente utilizados em rebanhos de bovinos leiteiros. Além disso, a presença de agentes zoonóticos nos ambientes e a seleção não intencional de bactérias resistentes aos antibióticos podem ter importantes consequências para a saúde humana e animal.

No intuito de se evitar o descarte direto destes dejetos nos ecossistemas associados (aquático e solo), a tecnologia da digestão anaeróbia é apontada como alternativa. Esta tecnologia tem sido amplamente usada em diversos países e resulta na produção de biogás, além de resíduos ricos em nutrientes que podem ser utilizados como fertilizantes. Entretanto, sem qualquer avaliação de risco, de acordo com a literatura, estes fertilizantes podem estar associados à contaminação do solo com bactérias clinicamente relevantes. Neste sentido, a otimização dos processos de digestão anaeróbia requer controle eficaz da operação e possível correlação com a redução de patógenos.

A digestão anaeróbia tem sido considerada um método atraente para produzir energia a partir de fontes renováveis, como a biomassa originária da produção pecuária (esterco animal). A utilização desse processo de tratamento dos dejetos oriundos do manejo de animais a temperatura ambiente seria uma oportunidade de significativo sucesso, com efeitos diretos na sustentabilidade ambiental e ganho econômico para o produtor. As condições climáticas do Brasil permitem este tipo de processo, no entanto, a variação de temperatura entre as estações do ano pode afetar a estabilidade da comunidade microbiana e, conseqüentemente, a produção de biogás.

A análise da diversidade e dinâmica bacteriana, a identificação de bactérias clinicamente relevantes e a persistência de resistência aos antimicrobianos são úteis para avaliar o risco clínico microbiológico dos efluentes de digestão anaeróbia, o que pode minimizar a disseminação de genes de resistência no solo no qual o efluente é aplicado como adubo.

O presente trabalho será apresentado em dois capítulos para melhor discussão dos resultados. O primeiro foi conduzido no intuito de avaliar a influência sazonal na variação da comunidade microbiana e produção de metano durante o processo de digestão anaeróbia. Desta forma, a dinâmica, a estrutura e a filogenia dos microrganismos presentes nos domínios *Bacteria* e *Archaea* foram analisados em dois biodigestores contínuos de escala piloto. No segundo capítulo, a persistência de bactérias resistentes potencialmente patogênicas, como enterobactérias (ENT), não-fermentadores bacilos Gram-negativos (BGN NF) e cocos Gram-positivos (CGP) foram avaliadas, além de seus padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos e quantificação dos genes de resistência a macrolídeos, aminoglicosídeos e beta-lactâmicos por PCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativo.

**CAPÍTULO I. ESTUDO DA COMUNIDADE MICROBIANA DURANTE A  
DIGESTÃO ANAERÓBIA A PARTIR DE DEJETOS DA PECUÁRIA  
LEITEIRA**

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE DEJETOS DE BOVINOS LEITEIROS

Para o desenvolvimento sustentável, tanto de países desenvolvidos como os emergentes e subdesenvolvidos é necessário a busca, ampliação e incentivo de tecnologias que utilizem fontes renováveis de energia. Neste contexto, destaca-se a biomassa, que o ponto de vista da geração de energia, é definida como toda matéria orgânica de origem animal e vegetal, que é decomposta por efeito biológico. Desta forma, ao contrário da energia obtida por combustíveis fósseis, a biomassa é uma fonte rapidamente repostada e disponível, além de pouco contribuir para o acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera terrestre (CHYNOWETHA, OWENSA e LEGRAND, 2001; SOUZA et al., 2004).

A pecuária de leite representa uma das maiores cadeias produtivas do Brasil ocupando a sexta posição entre os maiores produtores mundiais. O maior rebanho é encontrado na região Sudeste, o que gera no total mais de 100 milhões de toneladas/ano de dejetos, avaliada em função da produção de leite, a partir da estimativa do tamanho do rebanho (IPEA, 2012). Desta forma, com os aumentos na produção nacional de leite, grandes quantidades de dejetos são produzidas, o que justifica a necessidade de estudos com objetivo de melhorar as possibilidades de manejo e de destino destes resíduos minimizando os seus impactos (AMARAL et al., 2004). Estes resíduos são constituídos por esterco e outros produtos resultantes da atividade biológica do gado bovino. Devido a alta proporção de biomassa, este tipo de resíduo é importante matéria-prima para a produção de biogás pelo processo de biodigestão anaeróbia. Portanto, seu uso coerente é importante tanto para aspectos econômicos como ambientais (AL-MASRI, 2001).

Um dos processos de conversão energética da biomassa é a biodigestão anaeróbia para produção de biogás, composto por metano ( $\text{CH}_4$ ) na concentração que pode variar entre 50 - 80%, dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) entre 20 e 40% e de 1 - 5% de outros gases (hidrogênio, nitrogênio, dentre outros) (GUNASEELAN, 1997). A utilização do biogás como recurso energético se deve principalmente ao metano, que é um gás altamente combustível e inflamável. Desta forma, a qualidade do biogás depende da quantidade de metano na mistura, de modo que, quanto maior a

concentração de metano maior seu potencial energético (HOLM-NIELSEN et al., 2009).

De acordo com diferentes padrões de interações (simbióticas, sinérgicas ou antagônicas), as bactérias e arqueas utilizam a matéria orgânica de forma assimilativa para o crescimento da população atuante no processo. Existem diferentes grupos bacterianos envolvidos nos processos, e essa diversidade é influenciada, principalmente, pelo tipo de matéria orgânica utilizada como substrato (KAMPMANN et al., 2012; WIRTH et al., 2012).

## 1.2 PROCESSOS DE CONVERSÃO BIOQUÍMICA DA MATÉRIA ORGÂNICA DURANTE A DIGESTÃO ANAERÓBIA

O desempenho de um sistema de digestão anaeróbia é relacionado, principalmente, com a estrutura da comunidade microbiana presente no biodigestor (DEMIREL e SCHERER, 2008). Nos dejetos de animais há uma enorme variedade de compostos orgânicos biodegradáveis, o que resulta na existência de uma comunidade microbiana muito diversificada, responsável pelo início do processo de fermentação e degradação dos diferentes compostos. Por se tratar de um material constituído de proteínas, carboidratos e lipídeos, vários são os caminhos metabólicos possíveis durante a conversão dos compostos a metano, realizados principalmente por microrganismos heterotróficos (AHRING, IBRAHIM e MLADENOVSKA, 2001).

Portanto, trata-se de um processo bioquímico complexo, composto de quatro fases simultâneas de transformação dos compostos dos substratos, hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, cada uma com determinadas populações microbianas pertencentes aos domínios *Bacteria* e *Archaea* (AMON et al., 2007; DEMIREL e SCHERER 2008). Vale destacar que no caso deste estudo, biodigestão de esterco de ruminantes, o processo geralmente ocorre de maneira mais ágil e eficaz devido a maior presença de microrganismos ruminais e desta forma, que apresentam maior atuação na digestão anaeróbia (MIRANDA, AMARAL e LUCAS JUNIOR, 2006).

A fase de hidrólise é a primeira etapa na degradação anaeróbia e envolve a transformação dos compostos insolúveis e dos compostos com alto peso molecular,



como carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos em compostos solúveis mais simples, como os monossacarídeos, os aminoácidos e os ácidos graxos. Neste contexto, a hidrólise do material particulado, bem como de material solúvel de maior tamanho, é uma etapa essencial para aumentar a biodisponibilidade, ou seja, o acesso do substrato às células microbianas. Em certas situações, a alta complexidade do material orgânico pode resultar em uma baixa velocidade de hidrólise, e se tornar etapa limitante de todo o processo de digestão (AQUINO e CHERNICHARO, 2005).

A conversão dos materiais orgânicos em compostos dissolvidos é mediada por enzimas extracelulares (lipases, proteases, amilases e celulasas) excretadas por bactérias fermentativas facultativas e/ou anaeróbias estritas, também denominadas hidrolíticas. Dentre os gêneros de bactérias que participam desta etapa estão *Clostridium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*. Nota-se, por outro lado, que a composição e abundância relativa destes microrganismos estão relacionadas ao tipo de matéria orgânica inoculado no biodigestor (LIU, CHAN e FANG, 2002).

Na fase de acidogênese, as bactérias fermentativas acidogênicas transformam os produtos resultantes da fase anterior em ácido acético, hidrogênio, dióxido de carbono e outros ácidos orgânicos, como o propiônico e o butírico que devem ser convertidos em ácido acético. Os produtos metabólicos gerados pela atividade das bactérias acidogênicas são importantes substratos para as bactérias acetogênicas e para as arqueas metanogênicas (KUMAR et al., 2013).

Uma complexa comunidade de microrganismos participa nesta fase acidogênica, a maioria são bactérias anaeróbias obrigatórias pertencentes ao gênero *Clostridium*, *Ruminococcus*, ao grupo *Bacteroidetes* e ao grupo *Bifidobacteria*. Entretanto, algumas espécies são facultativas (*Streptococcus* spp. e espécies da família das *Enterobacteriaceae*) e utilizam o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) como aceptor de elétrons, removendo resíduos de oxigênio dissolvido e, dessa forma, elimina qualquer efeito tóxico aos microrganismos estritamente anaeróbios, dentre eles, as arqueas metanogênicas (AQUINO e CHERNICHARO, 2005).

Simultaneamente, dá-se início à terceira fase, acetogênese, cuja principal função das bactérias acetogênicas na digestão anaeróbia é a produção de acetato, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, substratos que são metabolizados pelas arqueas metanogênicas. Dois grupos distintos de acetogênicas podem ser distinguidos, baseados em seu

metabolismo. O primeiro grupo é de bactérias acetogênicas produtoras obrigatórias de hidrogênio, que produzem ácido acético,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  a partir de uma grande variedade de substratos e o segundo grupo de bactérias acetogênicas é composto pelas bactérias homoacetogênicas, que são estritamente anaeróbias, que catalisam a formação de acetato a partir de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  (KUMAR et al., 2013).

Na fase metanogênica, o ácido acético, o hidrogênio e o dióxido de carbono são convertidos em metano pelas arqueas metanogênicas por duas vias metabólicas principais, hidrogenotrófica e acetotrófica (ou acetoclástica). As arqueas hidrogenotróficas são autotróficas, elas reduzem  $\text{CO}_2$  a metano e usam  $\text{H}_2$  como doador de elétrons, liberando  $\text{H}_2\text{O}$ . As arqueas acetoclásticas são heterotróficas, produzindo o metano e  $\text{CO}_2$  a partir da redução do acetato (fermentação) (DEMIREL e SCHERER, 2008). Dinâmicas populacionais das metanogênicas têm sido extensivamente estudadas em vários sistemas anaeróbios, entretanto os fatores ambientais e/ou operacionais que promovem o domínio de um determinado grupo (hidrogenotrófica e acetotrófica) ainda são complexos e não estão muito bem compreendidos (DEMIREL e SCHERER, 2008; BAREITHER et al., 2013).

### 1.3 DOMÍNIOS *BACTERIA* E *ARCHAEA* NOS BIODIGESTORES ANAERÓBIOS

Inúmeras espécies bacterianas do domínio *Bacteria* participam do processo de fermentação da matéria orgânica, desde as etapas da hidrólise até a oxidação dos intermediários. Por fim, a formação de metano é obtida principalmente a partir de acetato e  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  por arqueas metanogênicas. Assim, o equilíbrio da interação entre os microrganismos dessa cadeia de degradação é fundamental para a transformação contínua dos intermediários formados e eficiente produção de biogás (SUNDBERG et al., 2013).

Os microrganismos classificados no Domínio *Archaea* são evolutivamente distintos dos organismos alocados no Domínio *Bacteria*. Uma grande variedade de arqueas apresenta metabolismo anaeróbio obrigatório, enquanto outras espécies são encontradas em ambientes extremos. Para classificação taxonômica do domínio *Archaea*, a maioria dos microrganismos estão agrupados nos filós, *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota* (WOESE, KANDLER e WHEELIS, 1990). Entretanto, outros filós adicionais tem sido recentemente propostos, *Korarchaeota*, *Nanoarchaeota* e

*Thaumarchaeota* (BARNES et al., 1996; HUBER et al., 2002; BROCHIER-ARMANET et al., 2008).

O filo *Euryarchaeota* é considerado o mais importante para os ambientes de biodigestão, pois compreende uma grande diversidade de organismos, incluindo as espécies metanogênicas, classificadas em cinco ordens diferentes: *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales*, *Methanosarcinales* e *Methanopyrales*. Dentro destes cinco grupos as metanogênicas podem ter forma de bastão (*Methanobacterium*, *Methanobacillus*) ou cocos (*Methanococcus*, *Methanosarcina*). Além disso, as metanogênicas crescem muito lentamente, de modo que o metabolismo destes microrganismos geralmente é a taxa limitante da eficiência de digestores anaeróbios (WOESE, KANDLER e WHEELIS, 1990; CARDOSO et al., 2003).

O filo *Crenarchaeota* compreende o grupo de arqueas redutoras de enxofre hipertermófilas, observados principalmente em amostras de solos e águas geotermais contendo enxofre elementar e sulfetos (WOESE, KANDLER e WHEELIS, 1990). Apesar de serem habitualmente encontrados em ambientes extremos, clones filogeneticamente mais próximos ao filo *Crenarchaeota* têm sido detectados em diversos sistemas de biodigestores anaeróbios, tais como digestor de resíduos da destilação de vinho (vinhaça) (GODON et al., 1997), resíduos de animais (ZHANG et al., 2011), palha de milho (QIAO et al., 2013) e aterro sanitário (CARDINALI-REZENDE et al., 2012). Entretanto o papel destes microrganismos no processo de digestão anaeróbia ainda permanece incerto.

Análise das sequências 16S rRNA de arqueas incultiváveis oriundas de uma fonte termal, em 1996, mostraram ramificações diferentes dos filios *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*. Assim, a partir de tais sequências foi proposto um novo filo, o *Korarchaeota*, que engloba organismos hipertermófilos pouco conhecidos, ainda não cultivados em laboratório (BARNES et al., 1996).

Em 2002, outro filo também foi descrito, o *Nanoarchaeota*, que é um filo criado especialmente para a espécie *Nanoarchaeum equitans*, que apresenta características peculiares e cuja relação de parentesco com outras arqueas ainda são incertas (HUBER et al., 2002).

Recentemente outro filo foi proposto, o *Thaumarchaeota*, que representa organismos mesófilos que anteriormente eram englobados no filo dos

*Crenarchaeota* hipertermófilos. Trata-se de microrganismos que possuem genes envolvidos no ciclo do nitrogênio, na etapa de oxidação da amônia (BROCHIER-ARMANET et al., 2008).

Diversos trabalhos têm analisado por sequenciamento a comunidade microbiana presentes nos biodigestores anaeróbios para o tratamento de vários tipos de resíduos como: sólidos municipais (BAREITHER et al., 2013), bovinos leiteiros (ST-PIERRE e WRIGHT, 2013), suínos (SNELL-CASTRO et al., 2005; WIRTH et al., 2012), esgoto municipal (CHEN et al., 2012; YE e ZHANG, 2013), além dos provenientes da destilação de vinho (GODON et al., 1997). Estes trabalhos mostraram que os membros do domínio *Bacteria* são os predominantes, com os filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* como os mais abundantes no sistema de biodigestão que utilizam dejetos de animais como substratos. Enquanto no domínio *Archaea*, o *Euryarchaeota* é o mais identificado (WIRTH et al., 2012; BAREITHER et al., 2013; SUNDBERG et al., 2013). Em relação à proporção *Archaea/Bacteria* na comunidade total de microrganismos existentes nos biodigestores, a literatura permitiu concluir que esta proporção pode variar de 1% (MOLETTA-DENAT et al., 2010) a 19% (BRAUN et al., 2011) sob condições metanogênicas utilizando diferentes substratos.

Os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* são comuns em ambientes anaeróbios (por exemplo, digestor anaeróbio e rúmen), onde fermentam polissacarídeos complexos, tais como celulose e amido. Já os membros do filo *Proteobacteria* são fisiologicamente muito diversificados e muitos podem fermentar polissacarídeos simples ou monossacarídeos. Mudanças nas comunidades dominantes do domínio *Bacteria* pode ocorrer devido a esgotamento de polissacarídeos complexos, como, por exemplo, celulose. A degradação da celulose pode levar então à transição da população devido a maior presença de produtos de degradação de menor complexidade, tais como monômeros de açúcar (KRAUSE et al., 2008). Além de nutrientes, outros fatores podem estar relacionados à variação da comunidade microbiana, como pH, temperatura e presença de inibidores. Ainda segundo alguns autores, apesar da comunidade de bactérias ser mais diversa, ela está sujeita a maiores variações populacionais do que a de arqueas diante aos diferentes fatores (LECLERC, DELGÈNES e GODON, 2004; HORI et al., 2006).

#### 1.4 FATORES QUE AFETAM O PROCESSO DE BIODIGESTÃO ANAERÓBIA

Para um processo eficiente, a biodigestão anaeróbia depende do equilíbrio entre as comunidades microbianas para produção final do gás metano e de condições de fermentação específicas. Fatores relativos ao substrato (nutrientes, pH, capacidade de tamponamento e composto inibitórios) e as condições de funcionamento do biodigestor (temperatura e tempo de retenção) influenciam diretamente o desempenho dos microrganismos (KUMAR et al., 2013).

A temperatura é um importante fator que pode afetar o desempenho da digestão anaeróbia, visto que está diretamente relacionado ao desenvolvimento e metabolismo bacteriano (KUMAR et al., 2013). A produção de metano já foi documentada sob uma ampla gama de temperatura, variando entre 0 e 97°C (BITTON, 2005). A escolha da melhor temperatura irá variar de acordo com as condições ambientais ou mesmo econômicas de cada região. O processo de biodigestão, pode então ocorrer, entre as faixas de temperaturas mais baixas, psicrófila, abaixo de 20°C (CÔTÉ, MASSÉ e QUESSY, 2006), mesófila, entre 20°C e 40°C (CHAE et al., 2008; SURYAWANSHI, CHAUDHARI e KOTHARI, 2010) e em faixas mais elevadas, termofílicas, entre 50 – 70°C (LEE et al., 2012).

O aumento da temperatura nos processos de biodigestão pode apresentar vantagens como, melhora da solubilidade de compostos orgânicos, aumento das taxas de reações químicas e biológicas, além de diminuição da presença de bactérias potencialmente patogênicas. Entretanto, observa-se como desvantagem um aumento da fração de amônia livre, que é um inibidor de crescimento para alguns tipos de microrganismos. Desta forma, os microrganismos são muito sensíveis às mudanças de temperatura, sendo preciso assegurar certa estabilidade da temperatura no meio em que procede a tecnologia de digestão anaeróbia (KUMAR et al., 2013)

Alterações no pH do meio pode afetar sensivelmente a integridade das bactérias envolvidas na digestão anaeróbia, fazendo com que elas alterem suas estruturas e, portanto, percam suas características originais. Muitos grupos de microrganismos têm o mesmo intervalo de pH ótimo, enquanto outros grupos tem uma região de pH específico para um crescimento ótimo e degradação anaeróbia. Sendo assim, deve-se buscar uma faixa de pH apropriada que proporcione o desenvolvimento da maior parte dos microrganismos relacionados ao processo.

Arqueas metanogênicas se desenvolvem em uma faixa de pH de 5,5 a 8,5, bactérias fermentativas podem crescer em uma gama mais larga de pH, entre 4 e 8,5. Durante o processo de fermentação a faixa de pH ideal é entre 6,6 – 7,8. O conhecimento dos fatores que podem alterar o pH é essencial para controlar e garantir uma fermentação bem sucedida num biodigestor (BOE et al., 2010; KUMAR et al., 2013).

O tempo de retenção hidráulica (TRH) também é outro fator importante para a produção de biogás. O TRH é o tempo necessário para a mistura ser digerida no digestor, o que ocorre quando a produção de gás é máxima, definindo o ponto de melhor qualidade do biogás no processo de biodigestão anaeróbia (SOUZA et al., 2008). O TRH depende das características dos afluentes e das condições ambientais, além disso, deve ser suficientemente longo para permitir o metabolismo dos microrganismos anaeróbios nos biodigestores (BITTON, 2005). O TRH varia de acordo com o tipo de biodigestor utilizado e a região; em países tropicais, por exemplo, a TRH varia de 30 a 50 dias, enquanto em países mais frios pode chegar a 100 dias (KUMAR et al., 2013).

A presença de algumas substâncias orgânicas, químicas e/ou físicas pode comprometer o metabolismo das bactérias responsáveis pela produção do metano. Entre estas substâncias estão detergentes, antibióticos, desinfetantes e pesticidas (BITTON, 2005). Por outro lado, a disponibilidade de certos nutrientes é essencial para o crescimento e metabolismo microbiano, carbono, nitrogênio, fósforo e ferro são essenciais para todos os processos biológicos (KUMAR et al., 2013).

Diante do exposto, a digestão anaeróbia de dejetos bovinos a temperatura ambiente pode suportar uma ampla gama de microrganismos dos diferentes domínios (*Bacteria* e *Archaea*). Assim, este potencial de variabilidade torna a identificação dos fatores que determinam a estrutura populacional um vasto campo a ser analisado. Para uma melhor compreensão da biomassa utilizada por meio da tecnologia de digestão anaeróbia, o conhecimento da estrutura, abundância e dinâmica das comunidades microbianas presentes são extremamente importantes para o aumento do conhecimento e da previsão dos processos de tratamento de dejetos de animais, permitindo aumentar assim o seu desempenho. A partir deste conhecimento é possível avaliar as possíveis interações cooperativas entre os diversos grupos de microrganismos responsáveis pelas distintas partes do processo de digestão anaeróbia e as possíveis mudanças durante a fermentação devido à variação das temperaturas ambientais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar a diversidade das comunidades bacterianas e de arqueas e aspectos da sua dinâmica e sucessão ecológica, durante o processo de digestão anaeróbia em biorreatores de escala piloto operados a temperatura ambiente.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção e a qualidade (teor de metano) do biogás, bem como a redução dos teores de sólidos voláteis (SV);
- Avaliar a dinâmica, abundância, estrutura e sucessão ecológica das comunidades bacteriana e das arqueas durante o processo de digestão anaeróbia pelas técnicas de PCR quantitativo e CE-SSCP (Eletroforese capilar - Polimorfismo de conformação de filamento único);
- Correlacionar a produção de metano com a relação *Archaea/Bacteria* durante o processo de digestão anaeróbia;
- Avaliar o perfil taxonômico das comunidades bacterianas e de arqueas a partir da análise de metagenômica das amostras finais do processo de digestão anaeróbia.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ENSAIO DE BIODIGESTÃO ANAERÓBIA

Foram realizados dois ensaios de biodigestão anaeróbia em dois biodigestores contínuos de escala laboratorial (bancada). Estes biorreatores tinham capacidade útil de 60 litros de substrato em fermentação, e foram instalados na sede da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG, mantidos em condições naturais de temperatura e ambiente. Os ensaios foram realizados em dois períodos do ano, verão e outono/inverno, ambos operados com TRH de 60 dias.

Os dejetos utilizados tanto no carregamento inicial (afluente) dos biodigestores quanto dos abastecimentos diários (2 L), foram coletados no sistema de produção de leite do Campo Experimental José Henrique Brusqui, em Coronel Pacheco – MG, na Embrapa Gado de Leite (localização geográfica: latitude 21° 35' 58" S e longitude 43° 17' 34" W e altitude média de 432 m).

Os dejetos foram transportados a temperatura ambiente até a sede da Embrapa Gado de Leite Juiz de Fora, onde foram homogeneizados manualmente e preparados os substratos. Os substratos foram realizados a partir da diluição de fezes bovinas frescas com água de lavagem dos pisos (água de reúso) do *free stall*, até teor de sólidos totais de 2 a 3%. As coletas de dejetos foram realizadas semanalmente e armazenadas à - 20°C para realização das cargas diárias (Figura 1). As cargas diárias foram realizadas a partir do 15º dia. Volume diário abastecido em cada biodigestor foi de dois litros do substrato e, após cada abastecimento, procedia-se à saída do efluente na mesma quantidade da carga diária (2 L).

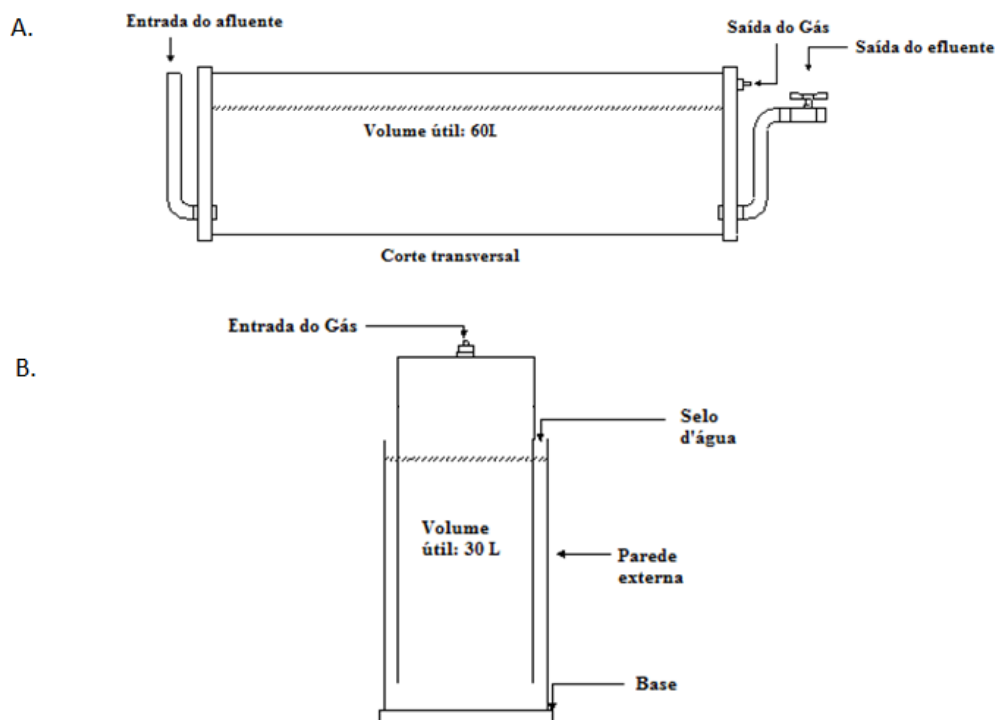


**Figura 1.** Preparação do substrato, mistura de fezes bovinas frescas juntamente com água de lavagem dos pisos do *free stall*, coletadas no campo experimental da Embrapa Gado de Leite.



### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS BIODIGESTORES UTILIZADOS

Os biodigestores utilizados foram do tipo tubular horizontal de escala laboratorial e de alimentação contínua. Os biodigestores contínuos são constituídos por duas partes distintas, sendo que uma delas é utilizada para o armazenamento do material em fermentação e a outra para o gás. Ambos os recipientes foram confeccionados em PVC. Pela Figura 2A podem ser observados os detalhes dos biodigestores. Em uma das extremidades foi acoplado um cano de entrada do afluente, no qual é feito o abastecimento, e na extremidade oposta havia dois canos, um com registro para o descarte do efluente (biofertilizante) e outro para a saída do gás. O recipiente destinado à fermentação era composto por um cilindro reto de PVC com diâmetro de 30 cm e com 116 cm de comprimento, com as extremidades fixadas com duas placas de PVC.



**Figura 2.** Representação esquemática de um dos biodigestores (A) de escala laboratorial e do gasômetro (B) usados para avaliação do processo de digestão anaeróbia, operados a temperatura ambiente.

Os gases produzidos foram armazenados nos gasômetros, que são constituídos por dois cilindros de 25 e 30 cm de diâmetro e se encontram inseridos, um no interior do outro, de forma que o espaço existente entre a parede externa do cilindro interior e a parede interna do cilindro exterior comporta um volume de água

(selo d'água), atingindo profundidade de 60 cm. O cilindro de 30 cm de diâmetro é fixado sobre uma placa de PVC, recebendo o cilindro de 25 cm de diâmetro no seu interior. O cilindro de 25 cm diâmetro tem uma das extremidades vedadas com um *cap* para receber o gás produzido, a outra extremidade emborcada no selo de água para armazenar o gás. Os detalhes do gasômetro podem ser vistos na Figura 2B.

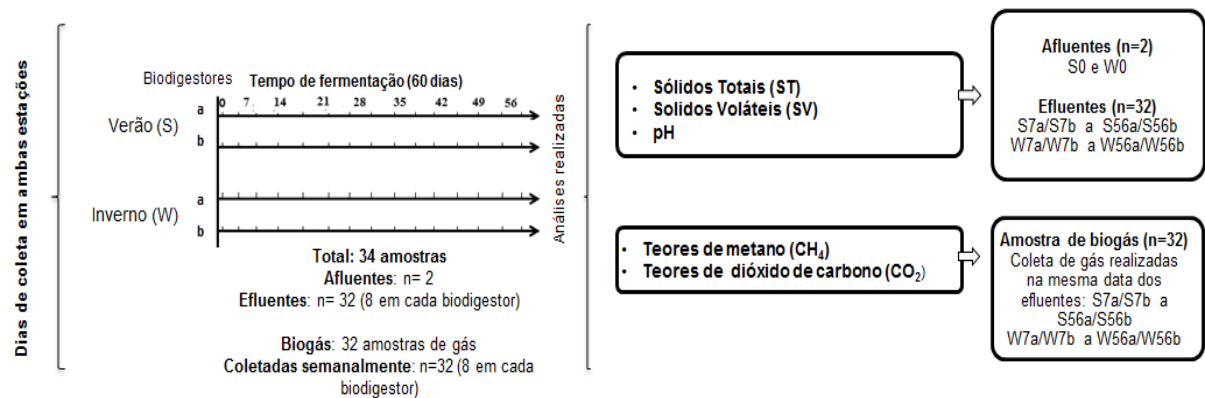
### 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICA E PARA AS ANÁLISES DA DINÂMICA E SUCESSÃO MICROBIANA DOS AFLUENTES E EFLUENTES

Os ensaios foram realizados em dois períodos do ano. O primeiro no verão (18 de janeiro de 2012 a 19 de março de 2012) e o outro durante outono/inverno (11 de abril de 2012 a 10 junho de 2012), ambos operados com TRH de 60 dias. A temperatura ambiente foi registrada diariamente com o auxílio de um termômetro digital portátil.

Para a caracterização dos afluentes e efluentes, semanalmente, alíquotas de 35 a 40 mL das amostras do afluente (carregamento inicial) e dos efluentes (biofertilizante) e 0,08 cm<sup>3</sup> de biogás foram coletadas para análises (Figura 3).

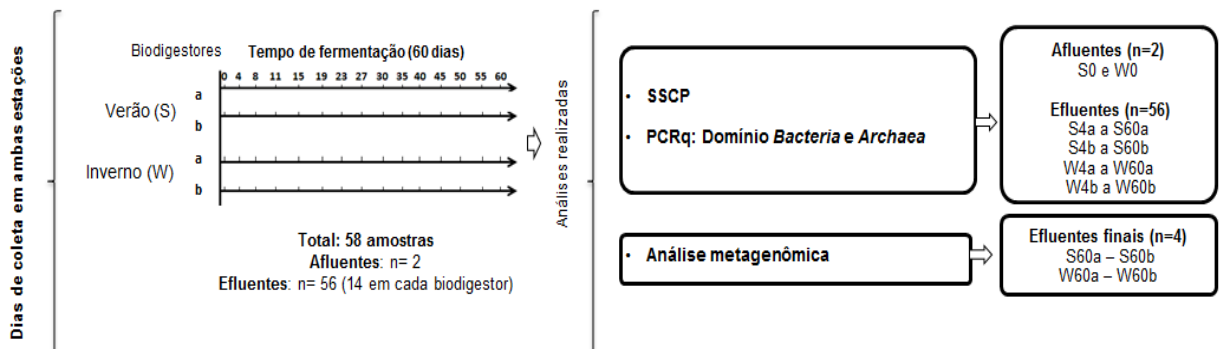
As amostras foram identificadas de acordo com a estação, dia de coleta e origem (entre os dois biodigestores): amostras coletadas nos meses de verão e de inverno foram denotadas com as letras S (*Summer*) e W (*Winter*), respectivamente; os números (0 a 60) foram adicionados de acordo com os dias de amostragem durante a digestão anaeróbia, as letras (a e b) correspondem a cada um dos biodigestores em que foi realizada a fermentação.

Para as análises físico-químicas foram coletadas 34 amostras, duas do afluente, uma referente ao carregamento inicial de ambos os biodigestores no verão (denominada S0), e outra do carregamento inicial no ensaio realizado no inverno (denominada W0). As demais amostras (n = 32) foram coletadas, conforme o esquema da Figura 3 para análises de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV) e pH.



**Figura 3.** Esquema referente aos dias de coleta das amostras dos afluentes, efluentes e biogás e as análises físico-químicas realizadas subsequentemente. Amostras coletadas nos meses de verão e de inverno foram denotadas com as letras S e W, respectivamente. Os números (0 a 60) referindo-se as datas de amostragem e as letras (a e b) correspondem a cada um dos dois biodigestores em que foi realizada a fermentação.

Para análise da dinâmica e sucessão microbiana dos afluentes e efluentes foram coletadas 58 amostras, duas do afluente, uma referente ao carregamento inicial de ambos os biodigestores no verão (denominada S0) e outra do carregamento inicial no ensaio realizado no inverno (denominada W0). As demais amostras (n = 56) foram coletadas, conforme o esquema da Figura 4.



**Figura 4.** Esquema referente aos dias de coleta das amostras dos afluentes, efluentes e biogás e as análises da dinâmica e sucessão ecológica realizadas subsequentes. Amostras coletadas nos meses de verão e de inverno foram denotadas com as letras S e W, respectivamente. Os números (0 a 60) referem-se aos dias de amostragem e as letras (a e b) correspondem a cada um dos dois biodigestores em que foi realizada a fermentação.

### 3.4 TEORES DE SÓLIDOS TOTAIS (ST) E TEORES DE SÓLIDOS VOLÁTEIS (SV)

Para determinação dos teores de sólidos totais, as amostras dos afluentes e efluentes foram acondicionadas em triplicata em recipientes, previamente tarados, pesados para obtenção do peso úmido (PU) do material. Após a pesagem as

amostras foram incubadas em estufa (105°C) até atingirem peso constante. Em seguida, as amostras foram resfriadas em dessecador e novamente pesadas para obtenção do peso seco (PS). O teor de sólidos totais foi determinado para todas as amostras segundo metodologia descrita por APHA (2005).

$$ST = 100 - U$$

$$U = (PU - PS) / PU \times 100$$

No qual:

ST = teor de ST (%)

U = teor de umidade (%)

PU = peso úmido da amostra (g)

PS = peso seco da amostra (g)

Para a determinação dos teores de sólidos voláteis, as mesmas amostras foram preparadas segundo metodologia descrita por APHA (2005). As amostras resultantes da determinação dos sólidos totais, foram incubadas a mufla (575°C), em cadinhos previamente tarados, e mantidos por um período de 2 horas e 30 minutos. Após o término da queima, os cadinhos foram retirados da mufla e levados ao resfriamento em dessecadores. Em seguida, o material resultante das amostras foi pesado em balança analítica, obtendo-se o peso das cinzas ou matéria mineral.

No qual:

SV = teor de SV (%)

PU = peso úmido da amostra (g)

Pm = peso obtido após queima (mufla) (g)

$$SV = ST - \text{cinzas}$$

$$\text{Cinzas} = \{1 - [(PU - Pm) / PU]\} \times 100$$

### 3.5 DETERMINAÇÃO DO VOLUME, PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DE BIOGÁS

Para a quantificação do volume de biogás produzido, uma escala graduada afixada na parte externa dos gasômetros foi utilizada. Assim, o deslocamento vertical do gasômetro foi medido diariamente e multiplicado pela área da seção transversal interna do gasômetro, ou seja, 0,04909 m<sup>2</sup>.

A temperatura do biogás dentro do gasômetro foi aferida com auxílio de termômetro digital de haste longa. Após cada leitura os gasômetros foram zerados, utilizando-se o registro de descarga do biogás. A correção do volume de biogás para condições de 1 atm. e 20°C foi efetuada com base no trabalho de Caetano (1985).

Para a correção do volume de biogás, foi utilizado a expressão resultante da combinação das leis de Boyle e Gay-Lussac, sendo que:

$$\frac{V_o P_o}{T_o} = \frac{V_1 P_1}{T_1}$$

$V_o$  = volume de biogás corrigido ( $m^3$ );  
 $P_o$  = pressão corrigida do biogás, para 1 atm. (10332,27 mm de  $H_2O$ );  
 $T_o$  = temperatura corrigida do biogás (293,15 $^{\circ}K$ );  
 $V_1$  = volume do gás no gasômetro;  
 $P_1$  = pressão do biogás na leitura (9621,9239 mm de  $H_2O$ );  
 $T_1$  = temperatura do biogás ( $^{\circ}K$ ) no instante da leitura.

Os dados de produção de metano e as quantidades de sólidos voláteis adicionados (S.V adicionados) foram utilizados para os cálculos de rendimento de metano. Os valores foram expressos em litros de metano por grama de sólidos voláteis adicionados ( $L CH_4/g S.V_{adicionado}$ ).

As análises de qualidade do biogás produzido foram realizadas semanalmente para determinação dos teores de metano ( $CH_4$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ), amostras do biogás ( $0,08 cm^3$ ) foram coletadas, com auxílio de seringas e posteriormente, analisadas em cromatógrafo de fase gasosa (*Agilent Technologies*, 7820A) no Laboratório de cromatografia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora - MG.

### 3.6 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DO AFLUENTE E EFLUENTE

As amostras (10 mL) do afluente ( $n = 2$ ) e efluente ( $n = 56$ ) foram coletadas manualmente, identificados e imediatamente transportados, sob refrigeração, para o Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do ICB/UFJF, para extração do DNA total.

Inicialmente as amostras foram sonicadas em gelo com auxílio do Vibra Cell VCX130PB (*Sonics & Materials*, EUA), três vezes por 60 segundos, com o comprimento de onda de 110,7 nm, para desprender os microrganismos das partículas. Em seguida, 4 mL das amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos até a formação de um pelete de 180 a 220 mg no criotubo.

O DNA foi extraído com auxílio do QIAamp™ DNA Stool Mini kit (*Qiagen*, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria com emprego do NanoDrop 2000c. A concentração do DNA foi avaliada a 260 nm e a relação de leituras a 260 nm e a 280 nm para estimar a pureza do DNA, estabelecendo-se o valor de 1,75 como referência mínima. A integridade do DNA genômico foi avaliada por eletroforese (80 volts) em gel de agarose a 1,2% com adição de tampão TBE (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) à cuba de eletroforese.

O DNA extraído (50 µl) foi armazenado à -80 °C e subsequentemente submetido à liofilização e enviado a temperatura ambiente ao *Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement* (INRA/FR) para ser utilizado nos procedimentos subsequentes.

### 3.7 PCR QUANTITATIVO (qPCR)

Reações de PCR quantitativo (qPCR) foram utilizadas para quantificar a abundância de microrganismos dos domínios *Bacteria* e *Archaea* em amostras de DNA extraídos dos afluentes e efluentes dos biodigestores. Todos os iniciadores usados no qPCR estão listados na Tabela 1.

As reações de amplificação para os domínios *Bacteria* e *Archaea* foram realizadas em um volume total de 25 µL. Assim, todas as misturas de reação continham 12,5 µL de *Express qPCR Supermix with premixed ROX* (Invitrogen, França), 10 nM iniciadores, 8 nM sonda TaqMan, 5 µl de DNA (concentração final de 1 e 0,1 ng/µL), e água suficiente para obtenção do volume final.

Em seguida, a placa contendo o mix e as amostras de DNA foi submetida ao equipamento *Mastercycler ep gradient S* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), com seguinte programa: incubação inicial de 20 s a 95°C e 40 ciclos de desnaturação (95°C, 15 s, 60°C, 1 min.).

Determinou-se o *threshold*, ou limiar de detecção, de cada amostra testada. O *threshold* corresponde a um ponto de referência em que todas as amostras possuem a mesma intensidade de fluorescência. Uma vez determinado o *threshold*, foi estabelecido o número de CT (*threshold cycle*) de cada amostra. O número de CT é utilizado para comparação entre as amostras, pois se refere ao número de ciclo no qual a curva de amplificação de cada amostra atinge o *threshold* estabelecido. A eficiência de amplificação (E) de cada um dos pares de iniciadores foi determinada

por meio de uma curva padrão composta de cinco pontos e que foi gerada a partir de reações em triplicata nas quais foram utilizadas diluições seriadas de clones DF10 (*Methanobrevibacter smithii* nº 55233) e LC103 (*E. coli* clone PK3), como padrões para os domínios *Archaea* e *Bacteria*, respectivamente (BRAUN et al., 2005). O número total de bactérias ou arqueas foi expresso como o número de cópias por grama de afluente ou efluente.

**Tabela 1.** Sequência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas técnicas de CE-SSCP, qPCR e análise metagenômica aplicadas na avaliação da dinâmica, abundância e estrutura das comunidades microbianas durante o processo de digestão anaeróbia.

Método	Gene alvo	Iniciadores	Sequência 5'-3'	Temp. de anelamento (°C)	Referência
SSCP	F330	W49	ACGGTCCAGACTCCTACGGG	61	PEU et al., 2006
SSCP	R533	W104	FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC	61	
SSCP	F340	W274	CCCTACGGGGCGCAGCAG	65	BRAUN et al., 2011
SSCP	R519	W275	FAM-TTACCGCGGCGGCTG	65	
		W208	F: ACTCCTACGGGAGGCAG		
qPCR	16S rRNA - <i>Bacteria</i>	W209	R: GACTACCAGGGTATCTAATCC	60	YU et al., 2005
		W210	TaqMan: Yakima Yellow-TGCCAGCAGCCGCGGTAATAC-Tamra		
		W211	F:ATTAGATACCCSBGTAGTCC		
qPCR	16S rRNA - <i>Archaea</i>	W212	R:GCCATGCACCWCCTCT	60	YU et al., 2005
		W213	TaqMan: FAM-AGGAATTGGCGGGGAGCAC-Tamra		
PCR (análise metagenômica)	16S rRNA – <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i>	515F	F: GTG CCA GCM GCC GCG GTAA	-	WANG e QIAN, 2009
		928R	R: CCC CGY CAA TTC MTT TRA GT		

### 3.8 CE-SSCP (*CAPILLARY ELECTROPHORESIS - SINGLE-STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM*)

A dinâmica das populações microbianas nas amostras do afluente e efluente oriundas dos biodigestores foi analisada pela a técnica de eletroforese capilar por polimorfismo de conformação de fita simples (CE-SSCP). A análise CE-SSCP é uma técnica adequada para realizar o monitoramento das populações, servindo como base para identificar as fases durante a sucessão microbiana que sejam mais discrepantes com relação à diversidade de espécies. Análises por CE-SSCP permitem que fragmentos de DNA com tamanhos semelhantes sejam separados de acordo com a sua estrutura secundária. A diversidade microbiana de uma determinada amostra é representada por picos, que corresponde a uma sequência separada. A área de cada pico permite estimar a abundância de diferentes microrganismos na amostra (LECLERC et al., 2001; CHACHKHIANI et al., 2004).

Para analisar a dinâmica das comunidades bacterianas e das arqueas, a região V3 do gene 16S rRNA foi amplificada. Os iniciadores específicos W49F e W104R foram utilizados para o domínio *Bacteria*, e W274F e W275R para o domínio *Archaea* (Tabela 1). Os iniciadores reversos W104 e W275 foram marcados com FAM (6-carboxyfluoresceína) na porção 5'. As amplificações por PCR foram realizadas utilizando-se Mastercycler termociclador (*Eppendorf*, Alemanha).

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 50 µl: 5 µL de tampão 10x Pfu Turbo, 4 µL de dNTPs (2,5 mM), 1 µL de cada iniciador (100 ng/µL), 0,5 µL Pfu Turbo DNA polimerase (2,5 U/µL) (*Stratagene*, CA), 1 µL de DNA extraído (10 ng/µL) e água ultrapura até volume final de 50 µL. O controle negativo consistia de todos os reagentes necessários exceto DNA. As condições das reações de PCR foram desnaturação inicial de 2 min a 94°C; 25 ciclos de três estágios: 30 s a 94°C, 30 s a 61°C para bactérias (w49 - w104) e 65°C para arqueas (w274 - w275) e 30 s a 72°C, e a extensão final por 10 min a 72°C e por fim, resfriamento a 4°C. Os produtos de PCR-SSCP obtidos foram visualizados no Agilent 2100 Bionalyzer (*Agilent Technologies*, CA) para observação dos produtos de amplificação.

Uma mistura com 1 µL de cada produto de PCR diluído, 18,925 µL de formamida (*Applied Biosystem*, EUA) e 0,075 µL de padrão de peso molecular interno Gene Scan HD 400 Rox (*Applied Biosystems*, EUA) foi desnaturada durante 5 min a 95°C e resfriadas imediatamente em gelo por 10 min. Em seguida, esta



mistura foi submetida à eletroforese capilar no aparelho ABI3130 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, EUA).

### 3.9 ANÁLISE METAGENÔMICA

Após 60 dias de fermentação em ambas as estações, as amostras finais (S60a, S60b, W60a e W60b) foram submetidas à análise metagenômica pela plataforma 454 GS-FLX *Titanium* (Roche, USA) no *Molecular Research Laboratory* (Shallowater, TX, EUA). Esta técnica foi utilizada no intuito de identificar os grupos de bactérias e arqueas presentes nas amostras por meio do sequenciamento de regiões específicas do gene codificador para o 16S rRNA.

Uma mistura de produtos de amplificação foi gerada a partir dos iniciadores F515 e R928 (Tabela 1) e inicialmente foi feita uma triagem para remoção de todas as sequências não lidas ou de baixa qualidade.

O software *Mothur* (SCHLOSS et al., 2009) foi usado para remover a redundância das sequências de *tags* e selecionar as sequências de *tags* únicas (portanto, cada *tag* único representava diferentes quantidades de sequências *tag*). Resumidamente, sequências de qualidade controlada foram alinhadas com a base de referência SILVA (PRUESSE et al., 2007). As sequências finais foram classificadas considerando a taxonomia SILVA distribuído com *Mothur*. O número de sequências obtidas foi de 17.962 a partir de todas as amostras.

A abundância relativa de grupos bacterianos e de arqueas nos diferentes biorreatores anaeróbios foi analisada e, em seguida, as Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foram definidas como grupos de sequências com um  $p$ -distância de 0,03 (ou 97% de similaridade). OTUs foram taxonomicamente classificadas usando BLASTn contra a base de referência SILVA. Os índices de diversidade Shannon-Weaver ( $H'$ ) e Simpson (D) foram utilizados na avaliação da diversidade presente nas amostras, com intervalos de confiança de 95%.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar o desempenho médio dos processos de digestão anaeróbia em ambas as estações, os dois biodigestores avaliados e amostrados foram tratados como repetições. As médias e desvios padrão de todos os dados foram

determinados. Todas as amostras foram tratadas como independentes devido à alimentação diária dos biodigestores.

Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para analisar diferenças entre as taxas de produção e rendimento de metano, abundância de genes dos domínios *Bacteria* e *Archaea* e diferenças na relação *Archaea/Bacteria* entre os diferentes pontos de coleta durante o período de fermentação em ambas as estações (Verão e inverno).

Com auxílio dos dados de abundância absoluta obtidas por PCR quantitativo foi realizado o cálculo da relação *Archaea/Bacteria*. Em seguida, correlação de Pearson foi feita entre os dados de produção de metano e a relação *Archaea/Bacteria*, a fim de observar a prevalência das metanogênicas em fases de maior produção de metano.

Para calcular a diferença entre os dados obtidos por CE-SSCP realizou-se uma Análise de Componentes Principais (ACP), pelo emprego do software R 2.10.1. Estas análises foram realizadas a fim de investigar se as comunidades dos domínios *Bacteria* e *Archaea* foram diferentes durante o tempo de fermentação e entre as diferentes estações analisadas (verão e inverno),

Inicialmente os perfis CE-SSCP foram alinhados com o padrão interno, ROX, para corrigir qualquer alteração na mobilidade eletroforética entre as execuções. As áreas dos picos foram normalizadas antes da análise estatística. As áreas dos picos foram determinadas e o índice de diversidade de Simpson (D) foi calculado para cada perfil. As diferenças entre os perfis de diversidade foram estimados e comparados com auxílio do teste ANOVA.

O ACP foi utilizado, pois é um método útil de visualizar as relações, de semelhança ou desigualdade, entre as comunidades microbianas, reduzindo assim a dimensionalidade dos dados, buscando um número mínimo de fatores necessários para explicar a parte máxima da variância representada no conjunto original de variáveis (ZEMB et al., 2007). Desta forma, permite uma caracterização da variabilidade entre as amostras, no caso deste estudo, entre as réplicas e as estações analisadas (verão e inverno).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

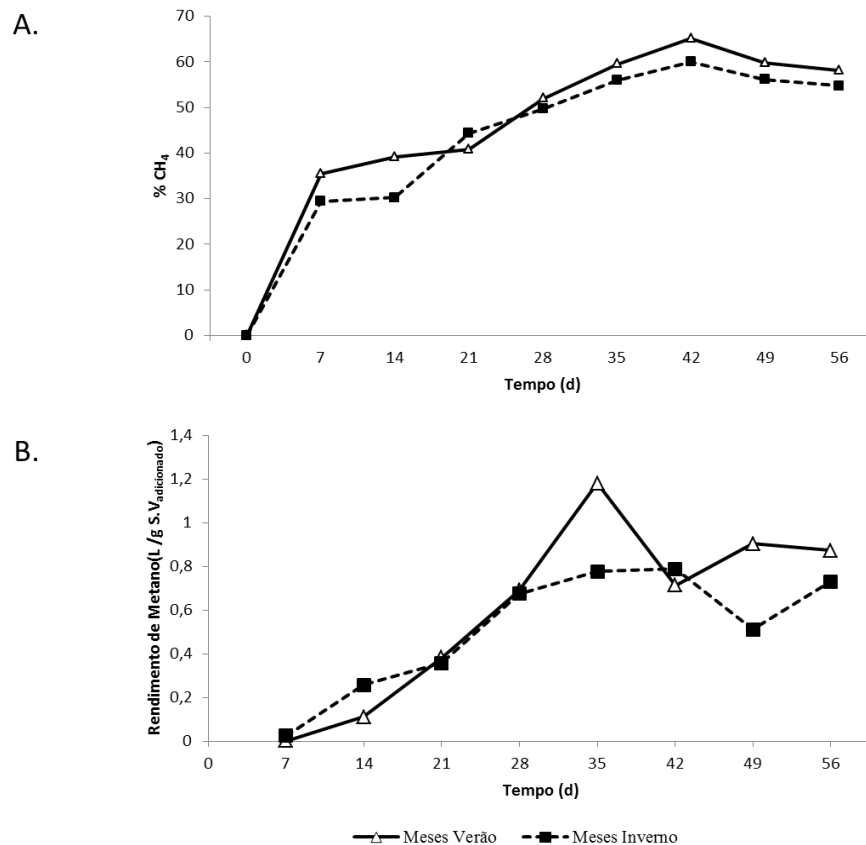
### 4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS BIODIGESTORES OPERADOS A TEMPERATURA AMBIENTE

Ao longo dos 60 dias de tempo de retenção hidráulica, dois biodigestores em escala-piloto operados a temperatura ambiente foram amostrados para avaliação da variação sazonal quanto à produção de biogás. De acordo com os resultados obtidos, não houve efeito da temperatura na produção de biogás, segundo a análise estatística realizada.

Durante os dois períodos as temperaturas estavam na faixa mesofílica, entre 14 e 25°C (média de 19,5°C) no inverno e entre 24 e 35°C no verão (média de 29,5°C). O afluente (esterco bovino e água de reúso) apresentou variação de pH constante durante as duas estações, entre 6,55 e 6,86, e nos efluentes o pH variou de 6,95 a 7,41 durante todo o estudo.

As taxas de carregamento foram em torno de 13,3 g/mL de SV no verão e 12,4 g/mL de SV nos meses de inverno. Em todos os biodigestores, a redução percentual de ST durante a fermentação foi de cerca de 65% e de SV foi de 68%.

A média diária de biogás produzido nos meses de verão e no inverno foi de 18,7 e 16 L/dia, respectivamente. Não houve diferença significativa no teor de metano do biogás produzido nos processos de biodigestão realizados nos meses de verão (59,2%) ou nos meses de inverno (53,7%) ( $p = 0,73$ ) (Figura 5A). Não houve diferença significativa no rendimento médio de metano entre os reatores operados nos meses de verão e de inverno (Figura 5B) ( $p = 0,60$ ).



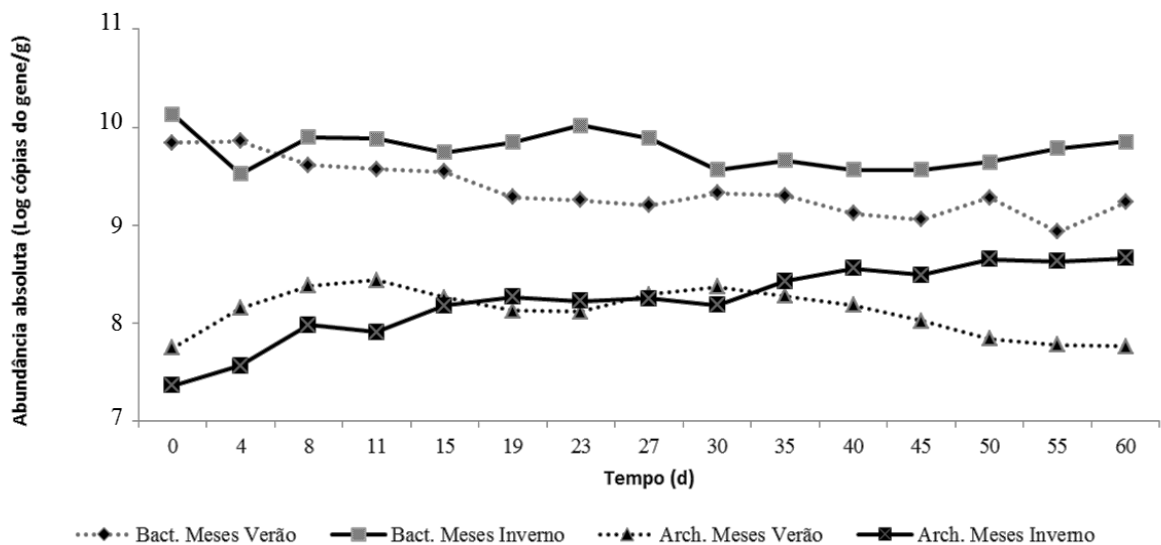
**Figura 5.** Produção de metano (A) e rendimento de metano (B) a partir da digestão anaeróbia de dejetos bovinos em função de padrões sazonais (verão e inverno) e temporais (período de 60 dias de fermentação). Os dados são expressos como a média dos dois biodigestores operados em cada estação.

A partir desses resultados foi possível observar que, independente da estação do ano, os processos de biodigestão apresentaram semelhança em relação ao desempenho, ou seja, houve resultados similares de redução de sólidos voláteis e produção de metano. Todos os dados em conjunto, mostram uma digestão anaeróbia estável nos meses de verão e no inverno. Raros trabalhos foram encontrados avaliando a variação da produção de biogás em biodigestores operados a temperatura ambiente. No entanto, Alvarez et al. (2006), mostraram que a produção de metano a partir de dejetos animais segue o mesmo padrão, tanto em temperaturas constantes mesófilas (35°C) e ambientais (16,8 - 29,5°C). Assim, baseado nesta comparação, o valor de rendimento de metano obtido neste trabalho foi semelhante a outros estudos que avaliaram a produção de biogás a partir de dejetos de animais e operados a temperaturas constantes mesófilas (HILL, TAYLOR e GRIFT, 2001; RICO et al., 2007; CHAE et al., 2008).

## 4.2 VISÃO GERAL DA COMUNIDADE MICROBIANA

### 4.2.1 Abundância e estrutura dos domínios *Bacteria* e *Archaea* durante o processo de digestão anaeróbia

A influência dos padrões sazonais (verão e inverno) e padrões temporais (60 dias de fermentação) sobre o número de representantes do domínio *Bacteria* e *Archaea* foi determinada por qPCR em todas as amostras dos afluentes e efluentes ( $n = 58$ ). Os resultados foram semelhantes entre as réplicas, em ambos os digestores operados no verão ( $p = 0,999$ ) ou no inverno ( $p = 0,809$ ). Para cada um dos tempos amostrados, durante o processo anaeróbio, o número de cópias do gene V3 *Bacteria* e *Archaea* por grama de afluente e efluente foi realizada a partir da média das duas réplicas operadas durante cada estação (Figura 6).



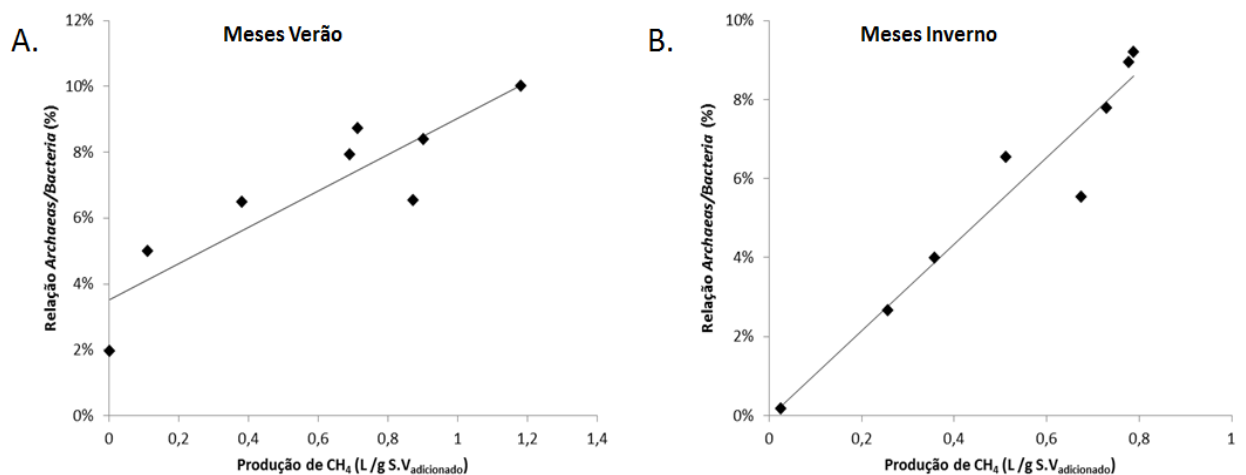
**Figura 6.** Abundância absoluta dos microrganismos dos domínios *Bacteria* e *Archaea* por qPCR em função dos padrões sazonais (verão e inverno) e temporais (período de 60 dias de fermentação). Todos os dados são expressos como  $\log_{10}$  cópias dos genes 16S rRNA de bactérias ou arqueas por grama de amostras dos afluentes ou efluentes. Os valores indicam a média ( $n = 10$ ) e o eixo x representa o tempo (dias) de coleta das amostras

Os valores médios da abundância dos microrganismos do domínio *Bacteria* foram  $2,8 \times 10^9$  e  $6,4 \times 10^9$  cópias do gene 16S rRNA no verão e inverno, respectivamente. Enquanto os microrganismos do domínio *Archaea* foram encontrados valores médios de  $1,4 \times 10^8$  e  $2,2 \times 10^8$  cópias do gene 16S rRNA

também nos processos realizados no verão e inverno, respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas na abundância das comunidades bacterianas ( $p = 0.700$ ) e nem nas do domínio *Archaea* ( $p = 0.959$ ) durante os períodos avaliados, sugerindo que ambas as comunidades, independentes da estação, obtiveram uma dinâmica e abundância similar durante os 60 dias de fermentação.

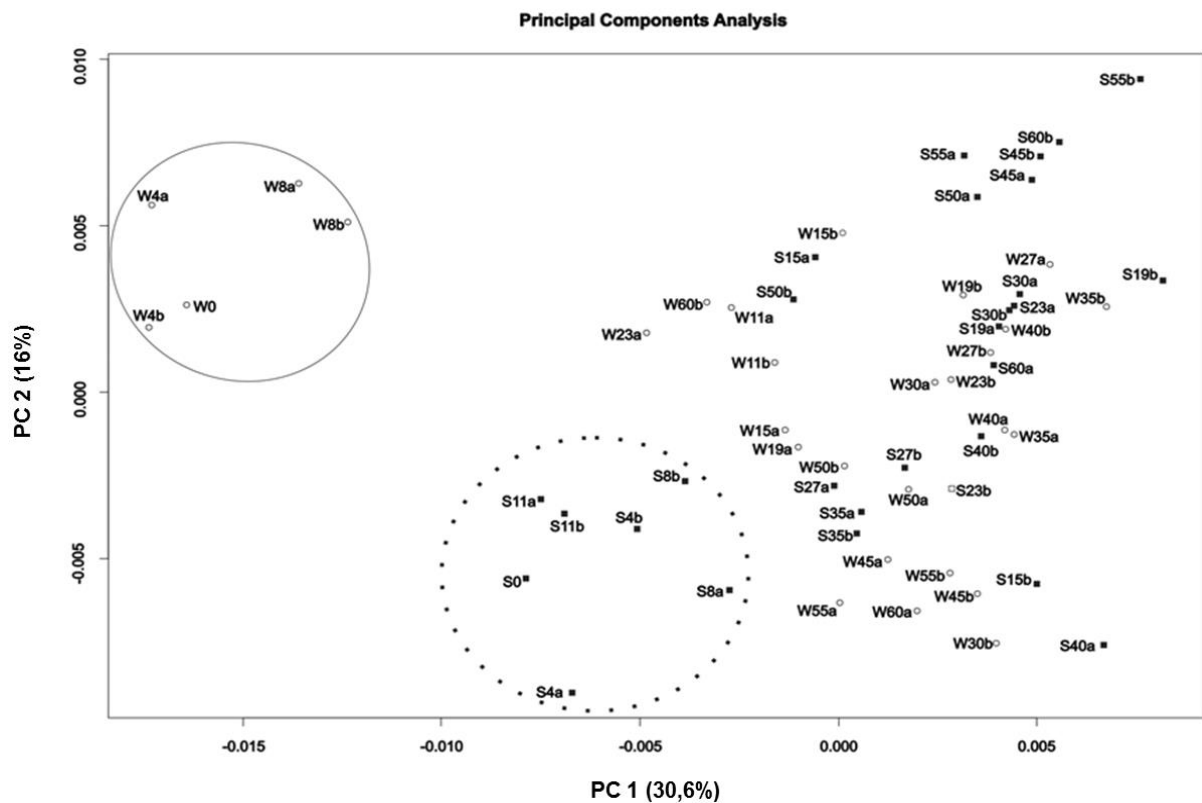
A relação entre os domínios *Archaea/Bacteria* também foi estudada com auxílio dos dados de qPCR. A proporção variou entre 1 - 11% (média de 6%), nas amostras de verão e 1 - 9% (média de 4,5%) nas amostras coletadas no período de inverno. O teste estatístico não revelou nenhuma diferença significativa ( $p = 0,277$ ), indicando que nenhuma mudança ocorreu durante os 60 dias de fermentação na relação *Archaea/Bacteria* durante as duas estações analisadas.

A fim de observar a variação da população de arqueas em relação à produção de metano ao longo do tempo de fermentação, foi realizado uma correlação entre os resultados de produção de metano obtidos e os valores resultantes da proporção *Archaea/Bacteria* obtidos por qPCR. Durante o processo de biodigestão realizado nos meses de verão esta correlação foi de 0,8917 ( $R^2 = 0,7952$ ) enquanto nos meses de inverno foi de 0,9644 ( $R^2 = 0,9300$ ). Pela figura 7 é possível observar o resultado da correlação entre as variáveis durante as duas estações analisadas. A partir desse dados foi possível observar que o aumento da população de arqueas em ambos os processos de fermentação foi correlacionado com aumento na produção de metano, o que indica a arqueas como o grupo funcional especializado na produção de biogás.



**Figura 7.** Representação da relação *Archaea/Bacteria* em função da produção de metano durante o processo de digestão anaeróbica operado nos meses de verão (A) e inverno (B).

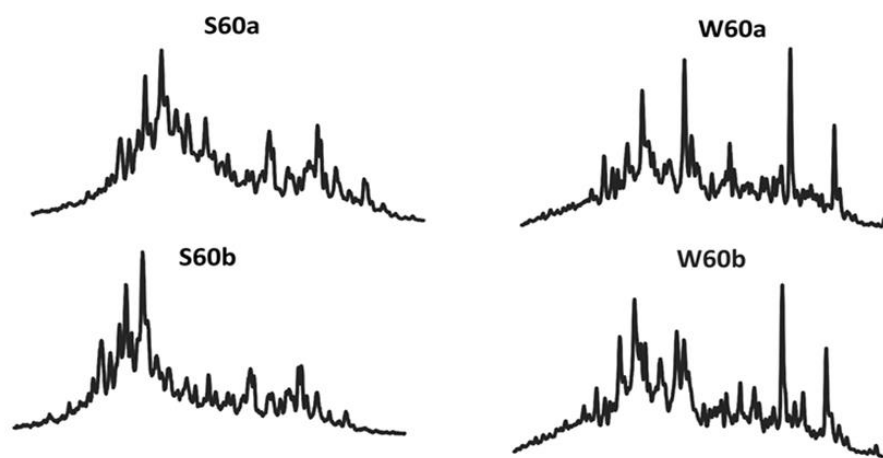
A dinâmica temporal e sazonal das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* foram também obtidas pela análise CE-SSCP. Os perfis de comunidades microbianas resultantes foram alinhados e comparados a fim de destacar as distâncias genéticas entre as amostras. Distâncias euclidianas foram computadas e o desenvolvimento de ambas as comunidades é mostrado usando uma análise de componentes principais (ACP) (Figura 8). Assim, a ACP mostra a dissimilaridade na dinâmica da comunidade bacteriana entre as 58 amostras analisadas, aproximadamente 50% dessas variações são explicadas pela PC1 e PC2.



**Figura 8.** Análise de componentes principais dos perfis CE-SSCP entre os dados das comunidades bacterianas das amostras finais de verão, S60a e S60b, e inverno, W60a e W60b. Amostras iniciais do processo de digestão anaeróbia operados no verão (S0 a S11) e as amostras de inverno (W0 a W8) estão evidenciadas.

Duas etapas distintas foram observadas para as amostras iniciais coletadas no processo realizado no verão (S0 a S11) e as amostras do período de inverno (W0 a W8), sugerindo que os estágios iniciais ou *start-up* são diferenciados para as duas estações. Entretanto, os pontos consecutivos apresentaram uma maior similaridade, não sendo possível observar qualquer tipo de diferença entre as amostras coletadas nas diferentes estações. Provavelmente, todas as comunidades microbianas

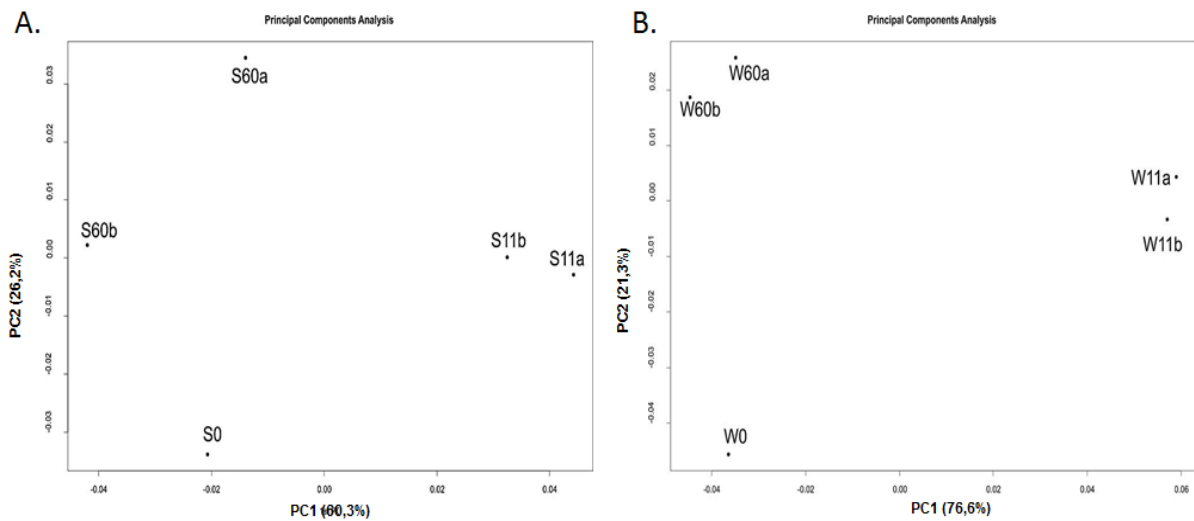
progrediram para o mesmo estado estacionário, indicando que, em ambas as estações, o processo de biodigestão anaeróbia teve uma dinâmica das comunidades semelhante, o que confirma os resultados obtidos por qPCR. Representação dos perfis CE-SSCP das amostras finais foram apresentados na Figura 9. Por esta figura, é possível ilustrar como a diversidade relativa da comunidade bacteriana é calculada, pela visualização dos número de pico dos perfis. Além disso, cada pico de migração do perfil CE-SSCP é proporcional à quantidade de DNA detectado, ou seja, a abundância relativa de cada espécie.



**Figura 9.** Representação da estrutura de padrões dos perfis CE-SSCP. Os diferentes perfis de CE-SSCP foram alinhados com base em um padrão interno ROX e as áreas foram normalizados. Cada pico de migração do perfil CE-SSCP é proporcional à quantidade de DNA detectado, ou seja, a abundância relativa de cada espécie.

A estrutura da comunidade das arqueas foi menos complexa do que a estrutura da comunidade bacteriana. No que se refere aos padrões CE-SSCP para as arqueas, ao longo dos tempos de amostragem, foram observadas estruturas comunitárias relativamente semelhantes nas amostras de verão e de inverno. O perfil CE-SSCP obtido apresentou uma baixa diversidade (Figura 10).





**Figura 10.** Análise de componentes principais dos perfis CE-SSCP entre os dados das comunidades arqueas das amostras dos afluentes e efluentes obtidas durante o processo de digestão anaeróbia verão (A) e no inverno (B).

A análise temporal da dinâmica bacteriana e das arqueas nos digestores anaeróbios por qPCR e CE-SSCP revelaram que, tanto no processo realizado nos meses de verão como no inverno, obtiveram abundância microbiana semelhante, e que a ligeira variação de temperatura (aproximadamente 10°C) entre as estações não foi definitivo para uma variação da dinâmica entre os digestores. Estes resultados indicam que o tempo de fermentação e possivelmente outros fatores, como condições de operação e desempenho do digestor, têm um grande efeito na dinâmica microbiana e que a sucessão ecológica ocorreu em tempo similar para ambos os períodos avaliados.

Os valores de abundância absoluta dos domínios *Bacteria* e *Archaea* estão de acordo com outras análises da comunidade em digestores anaeróbios (ALEXANDER et al., 2011). Outros estudos também mostraram um deslocamento das comunidades bacterianas nas fases iniciais do processo com tendência para uma estabilização ou consolidação após um tempo de fermentação de dejetos de animais por diferentes métodos, como CE-SSCP (PEU et al., 2006), análise metagenômica (LEE et al., 2012) e DGGE (BENGELSDORF et al., 2013). As réplicas dos biodigestores operados a temperatura ambiente (a e b) mostraram um desempenho semelhante e altamente comparável.

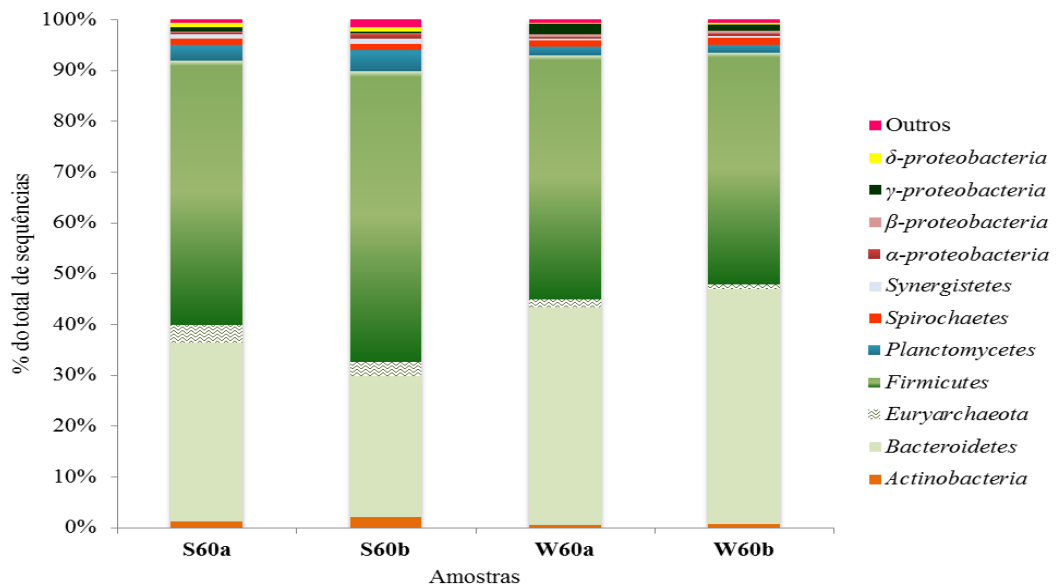
Diferenças de temperatura durante o processo de digestão também não mostraram diferença na relação *Archaea/Bacteria* em ambas as estações. Segundo a literatura, outras proporções dos domínios *Archaea/Bacteria* foram anteriormente

relatadas, entre 0 - 7% em biodigestores em larga escala alimentados com dejetos animal (porco e vaca) utilizando sequenciamento das amostras (SUNDBERG et al., 2013); cerca de 6% em um biorreator alimentado com forragem de beterraba calculado por qPCR (KLOCKE et al., 2007); e entre 0,5 - 4,5% em digestores anaeróbios alimentados com dejetos líquidos calculado também por qPCR (MOLETTA-DENAT et al., 2010). Deste modo, as diferentes condições parecem produzir grandes variações nas proporções de *Archaea/Bacteria* e os resultados obtidos neste estudo foram da mesma ordem que os valores relatados na literatura. Além disso, a abundância de bactérias foi maior do que de arqueas, o que corrobora dados de outros estudos (HORI et al., 2006; LIU et al., 2009).

#### 4.2.2 Estrutura das comunidades microbianas: filo e família

Amostras finais obtidas de biorreatores após o processo de digestão anaeróbia nos meses de verão (S60a e S60b) e inverno (W60a e W60b) foram submetidos à análise da diversidade microbiana utilizando o gene 16S rRNA. A abundância relativa de grupos bacterianos e de arqueas nos diferentes biorreatores anaeróbios foi analisada e as percentagens das sequências pertencentes aos diferentes grupos taxonômicos encontrados estão resumidas na Figura 11.

Todas as sequências das amostras coletadas no verão (S60a e S60b) e no inverno (W60a e W60b) foram representadas por 15 filós. Os valores médios das sequências identificadas do domínio *Bacteria* corresponderam a 97,8% das sequências detectadas, enquanto o restante pertencia ao domínio *Archaea* (Tabela 2).



**Figura 11.** Similaridade taxonômica das sequências bacterianas e arqueas recuperada das amostras finais, S60a e S60b, obtidas após 60 dias de fermentação em biodigestores operados no verão e nas amostras, W60a e W60b obtidas nas mesmas condições no inverno.

**Tabela 2.** Números e estimativas da diversidade de sequências dos domínios *Bacteria* e *Archaea* nas amostras finais, S60a e S60b, obtidas após 60 dias de fermentação em biodigestores operados no verão, e nas amostras, W60a e W60b obtidas nas mesmas condições no inverno.

Grupo	Nome das amostras	OTUs observadas	Número de sequencias	Índice Shannon (H)	Índice Simpson (D)
<i>Bacteria</i>	S60a	795	5183	5,36	0,98
	S60b	708	4338	5,27	0,98
	W60a	588	4594	4,71	0,95
	W60b	486	3416	4,59	0,95
<i>Archaea</i>	S60a	22	188	2,31	0,85
	S60b	18	129	2,10	0,81
	W60a	11	79	1,89	0,80
	W60b	9	35	1,95	0,86

As análises taxonômicas das sequências bacterianas identificaram 13 filos e 17 classes em todos os biorreatores. Todas as porcentagens indicadas a seguir representam a abundância relativa das sequências de bactérias detectadas. O filo *Firmicutes* (bactérias Gram-positivas, baixo conteúdo GC) foi mais abundante em todos os biorreatores, representando 51,9 - 57,2% das sequências analisadas das

amostras coletadas ao final da biodigestão realizada no verão (S60a e S60b, respectivamente) e 48,0 - 45,5% nas sequências das amostras de inverno (W60a e W60b, respectivamente). Dentre os *Firmicutes*, as sequências pertencentes à classe de *Clostridia* foram as mais observadas (97,3% das sequências *Firmicutes* nas amostras de verão e 95,0% de inverno).

Sequências pertencentes ao filo *Bacteroidetes* representaram a segunda comunidade bacteriana mais identificada, constituindo 35,1 - 27,8% das S60a e S60b, respectivamente, e 42,7 - 46,2% das W60a e W60b, respectivamente. A família mais dominante foi *Bacteroidia*, com cerca de 90,0% das sequências *Bacteroidetes*, seguida por *Sphingobacteria*, com cerca de apenas 5% para todas as amostras.

*Planctomycetes* foi o terceiro mais encontrado, representando 3,1 - 4,1% das amostras S60a e S60b, respectivamente, e 1,6% das amostras de inverno. Em seguida, foram observados também os filios *Actinobacteria* (com até 1,1%) e *Spirochetes* (com até 1%). Diferentes classes de *Proteobacteria* foram encontradas em ambas as condições, porém em pequenas quantidades, sendo representadas principalmente por  $\gamma$ -*proteobacteria* e  $\delta$ -*proteobacteria*, enquanto  $\beta$ - e  $\alpha$ -*proteobacteria* contribuíram com menos de 1% do número total de sequências em todos os biorreatores. Além disso, foram também identificadas sequências pertencentes à *Caldiserica*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Lentisphaerae*, *Spirochaetes*, *Synergistetes* e *Verrucomicrobia*, contudo em baixa frequência.

Análises taxonômicas do domínio *Archaea* mostraram apenas dois filios: *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*. Todas as percentagens mencionadas a seguir refletem a relativa abundância das sequências das arqueas detectadas. Em todas as amostras analisadas, sequências do filo *Euryarchaeota* foram as mais encontradas, representando 99,4 - 93,0% das sequências de verão (S60a e S60b, respectivamente) e 100,0 - 97,1% do inverno (W60a e W60b, respectivamente), enquanto as restantes pertenciam a *Crenarchaeota*.

Dentro do filo *Euryarchaeota*, as sequências pertencentes à família *Methanobacteriales* foram as mais encontradas em todas as amostras de verão, S60a (53,4%) e S60b (69,0%), e inverno, W60a (35,7%) e W60b (40,5%). Entre as espécies hidrogenotróficas, a mais abundante foi a *Methanobrevibacter* sp., representando 26,6% (S60a), 43,4% (S60b), 37,9% (W60a) e 25,7% (W60b).

Outras sequências detectadas do filo *Euryarchaeota* foram representadas pelas famílias: *Methanosarcinales* (4,2 - 6,9% das amostras de S60a e S60b e 27,8 - 20% da W60a e W60b, respectivamente) e *Methanomicrobiales*, na qual o *Methanocorpusculum* sp. foi responsável pela maioria das sequências.

#### 4.2.3 Estrutura das comunidades microbianas: OTU

A fim de comparar a estrutura microbiana entre as amostras finais (S60a, S60b, W60a e W60b), as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foram determinadas ao nível de distância de 3% (Tabela 2). Um total de 17 962 sequências foi classificado em 1710 OTUs (1676 OTUs para o domínio *Bacteria* e 34 OTUs para o *Archaea*) com base nos resultados do algoritmo BLASTN.

Os níveis filogenéticos estruturais bacterianos e de arqueas foram observados usando os índices de diversidade de Simpson e de Shannon. Os índices Simpson e Shannon (Tabela 2) indicaram relativa semelhança entre as diversidades em ambas as estações. Ainda, estes dados indicaram uma maior diversidade de comunidades bacterianas em comparação com arqueas, o que corrobora os resultados do qPCR. Todos os resultados foram reprodutíveis a partir de cada réplica (a e b).

Para caracterizar o nível de similaridade entre as amostras em função das diferentes condições sazonais, foram calculadas as OTUs mais importantes para os domínios *Bacteria* e *Archaea*. Dentre as 20 OTUs mais prevalentes mostrados na Tabela 3 é possível visualizar 36,8 - 49,2% da estrutura da comunidade bacteriana e na Tabela 4, encontram-se as 10 OTUs dominantes entre as sequências do domínio *Archaea*, no qual foi possível avaliar a distribuição de 79,7 - 89,1% de todas as sequências de arqueas.

Estes resultados foram consistentes com os dados da afiliação filogenética. Por exemplo, 10 dos 20 OTUs mais importantes para as bactérias pertencem ao filo *Firmicutes* (filo predominante), nove são do filo *Bacteroidetes* (o segundo maior filo), e apenas um é do filo *Planctomycetes* (o terceiro filo mais predominante). Os 20 OTUs mais relevantes foram filiados principalmente a bactérias não cultiváveis de diferentes habitats anaeróbios (rúmen e digestor anaeróbio). Apenas um pequeno grupo (B6, B9 e B14) mostrou identidade de sequência inferior a 98% às sequências da base de dados pública.

**Tabela 3.** Abundância relativa de sequências 16S rRNA do domínio *Bacteria* nas amostras finais, S60a e S60b, obtidas após 60 dias de fermentação em biodigestores operados no verão, e nas amostras W60a e W60b, obtidas nas mesmas condições no inverno.

OTU <sup>a</sup>	Filó / Família	Organismos mais estreitamente relacionados (nº de acesso)	Sm % <sup>b</sup>	% do total				Origem
				S60a	S60b	W60a	W60b	
B1	<i>Bacteroidetes/ Bacteroidales</i>	Bactéria incultivável (DQ261226)	100	4,2	4,2	17,0	19,1	Índia: Unidades de biogás
B2	<i>Firmicutes/ Clostridiales</i>	Bactéria incultivável do rúmen (AB614913.1)	100	6,5	10,6	1,4	0,6	Japão: rúmen
B3	<i>Bacteroidetes/ Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidetes</i> incultivável (CU926372.1)	100	3,7	3,9	1,6	1,2	França: digestão anaeróbia das lammas
B4	<i>Bacteroidetes/ Bacteroidales</i>	<i>Parabacteroides</i> sp. (JN029805.1)	100	1,8	1,5	4,9	2,9	China: águas residuais
B5	<i>Bacteroidetes/ Bacteroidales</i>	<i>Porphyromonadaceae</i> incultivável (HQ132399.1)	100	3,5	2,8	1,1	1,3	China: amostras ambientais
B6	<i>Firmicutes/ Clostridiales</i>	Bactéria incultivável do rúmen (JX218389.1)	97	0,2	0,6	3,9	4,1	Canadá: rúmen
B7	<i>Firmicutes/ Clostridiales</i>	<i>Syntrophomonadaceae</i> incultivável (JN173140.1)	99	0,4	0,7	3,3	2,8	Canadá: biodigestor dejetos de suínos
B8	<i>Bacteroidetes/ Bacteroidales</i>	Bactéria incultivável (DQ261241.1)	100	3,4	2,1	0	0	Índia: Unidades de biogás
B9	<i>Firmicutes/ Clostridiales</i>	Bactéria incultivável do rúmen (AB270018)	94	0,1	0,2	3,7	2,3	Japão: rúmen
B10	<i>Firmicutes/ Clostridiales</i>	Bactéria incultivável (JX096391.1)	100	3,3	1,7	0,2	0,1	Canadá: rúmen de bovinos de corte
B11	<i>Bacteroidetes/ Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidetes</i> incultivável (JF818098.1)	100	2,0	1,8	0,9	0,3	EUA: comunidades células combustível microbianas
B12	<i>Bacteroidetes/ Bacteroidales</i>	<i>Bacteroides</i> sp. (KC502888.1)	100	0,2	0,1	2,3	3,5	Austrália: biofilmes
B13	<i>Firmicutes/ Clostridiales</i>	<i>Firmicutes</i> incultivável (CU926705)	100	0,3	0,2	2,1	2,7	França: digestão anaeróbia das lammas
B14	<i>Planctomycetes / Planctomycetales</i>	Bactéria incultivável do rúmen (JX218351)	91	1,5	1,9	0,2	0,5	Canadá: rúmen
B15	<i>Bacteroidetes/ Sphingobacteriales</i>	<i>Bacteroidetes</i> incultivável (AB635947.1)	100	0,3	0,3	1,4	2,3	Japão: águas subterrâneas
B16	<i>Bacteroidetes/ Bacteroidales</i>	<i>Proteiniphilum</i> sp. (JQ086799.1)	98	0,9	1,0	1,1	0,9	Alemanha: aquífero
B17	<i>Firmicutes/ unclassified</i>	<i>Firmicutes</i> incultivável (GQ132814)	99	1,0	0,7	1,0	1,2	EUA: Digestores Anaeróbios
B18	<i>Firmicutes/ Clostridiales</i>	Bactéria incultivável (AB506626.1)	100	1,2	1,5	0,5	0,3	Japão: rúmen
B19	<i>Firmicutes/ Clostridiales</i>	Bactéria incultivável (AB507549.1)	100	0,3	0,7	1,2	1,7	Japão: rúmen

**Tabela 3.** continuação...

B20	<i>Firmicutes/ Clostridiales</i>	Bactéria incultivável (KC551546.1)	100	1,1	1,2	0,2	0,5	China: lodo ativado
<b>Total de amostras</b>			36,8	38,5	48,7	49,2		

<sup>a</sup> Número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) identificadas

<sup>b</sup> Porcentagem de similaridade

A composição das 10 OTUs mais relevantes no domínio *Archaea* é apresentada na Tabela 4. Todos pertenciam ao filo *Euryarchaeota* e a maioria das sequências foi relacionada com sequências de espécies conhecidas de diversos ambientes. Apenas um dos 10 OTUs, A7, mostrou similaridade inferior a 99% às sequências da base de dados pública. As OTUs dominantes, A1 e A2, foram similares a microrganismos da família *Methanobacteriales*, estas corresponderam a 68 a 70% das sequências das amostras S60a e S60b e 48 a 60% das amostras W60a e W60b.

**Tabela 4.** Abundância relativa de sequências 16S rRNA do domínio *Archaea* nas amostras finais, S60a e S60b, obtidas após 60 dias de fermentação em biodigestores operados no verão, e nas amostras W60a e W60b, obtidas nas mesmas condições no inverno.

OTU <sup>a</sup>	Filo / Família	Organismos mais estritamente relacionados (nº de acesso)	Sm % <sup>b</sup>	% do total				Origem
				S60a	S60b	W60a	W60b	
A1	<i>Euryarchaeota / Methanobacteriales</i>	<i>Methanobrevibacter</i> sp. (DQ135988)	100	33,1	51,0	45,0	32,0	Austrália: rúmen
A2	<i>Euryarchaeota / Methanobacteriales</i>	<i>Methanocorpusculum</i> sp. (JQ772449)	100	35,1	20,6	3,3	28,0	China: reservatório de óleo
A3	<i>Euryarchaeota / não classificado</i>	<i>Euryarchaeota</i> incultivável (GU257038)	90	6,3	15,5	16,4	20,0	Alemanha: sedimentos
A4	<i>Euryarchaeota / Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcina mazei</i> (CP004144)	99	0,6	2,1	30,0	12,0	Brasil: sedimento
A5	<i>Euryarchaeota / Methanobacteriales</i>	<i>Methanoregula formicicum</i> (NR_102441)	99	10,3	5,4	0	0	EUA
A6	<i>Euryarchaeota / Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcinaceae</i> incultivável (JQ668651)	99	0	7,6	6,6	16,0	China: digestão anaeróbia
A7	<i>Euryarchaeota / não classificado</i>	<i>Euryarchaeota</i> incultivável (JN820167)	96	3,7	5,4	0	0	EUA
A8	<i>Euryarchaeota / Methanobacteriales</i>	<i>Methanomicrobia</i> incultivável (AB780957)	100	4,8	0	6,7	4,0	China: digestão anaeróbia
A9	<i>Euryarchaeota / Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i> incultivável (JQ952751)	100	1,3	8,7	1,6	4,0	Inglaterra: rúmen
A10	<i>Euryarchaeota / Methanosarcinales</i>	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6 (NR_102903)	100	4,8	0	0	0	EUA
<b>Total de amostras</b>				79,7	89,1	87,3	88,5	

<sup>a</sup> Número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) identificadas

<sup>b</sup> Porcentagem de similaridade

A comparação da análise taxonômica do domínio *Bacteria*, entre as duas estações, mostrou uma composição semelhante quanto os filos dominantes (Figura 11). No entanto, foi possível observar pequenas mudanças no percentual de composição entre os filos encontrados. Em suma, estas mudanças nas porcentagens, juntamente com outros dados (resultados do índice de Shannon e variação nos padrões de picos CE-SSCP, Figura 9), resultaram que mesmo com a abundância e a dinâmica sendo semelhante, a composição estrutural das comunidades bacterianas foram diferentes entre as estações. Provavelmente, a diversidade e a composição da comunidade microbiana variaram devido à diferença de temperatura entre as estações, mas também outros fatores como variação de nutrientes ou ainda a presença de compostos inibitórios podem estar envolvidos.

Os filos mais prevalentes foram *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, que correspondem a microrganismos responsáveis pela degradação da matéria orgânica complexa e fermentação. A predominância destes filos em reatores de biogás está em concordância com outras análises (MCGARVEY et al., 2007; LIU et al., 2009; KAMPMANN et al., 2012; BENGELSDORF et al., 2013). Neste estudo, dentro de filo *Firmicutes*, a classe dominante foi a *Clostridia*, o que confirma os resultados obtidos por outros autores, que sugere que muitos *Clostridia* estão envolvidos na decomposição de polissacarídeos e, assim, desempenham um papel importante na hidrólise do substrato utilizado na fermentação (KRAUSE et al., 2008; JAENICKE et al., 2011; SUNDBERG et al., 2013).

Os filos menos abundantes, em particular, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Lentisphaerae*, *Synergistetes* e *Verrucomicrobia*, têm sido normalmente encontrados em uma ampla variedade de ambientes e desempenham vários papéis na digestão anaeróbia de dejetos animais (LEVÉN, ERIKSSON e SCHNÜRER, 2007; RITARI et al., 2012). Estes filos mostraram percentagens diferenciadas entre as estações, o que indica que existem componentes microbianos mais complexos que residem dentro deste sistema.

Pode-se sugerir que existem pequenas diferenças nas vias de formação de metano nos diferentes processos de biodigestão com base nos resultados da composição e estrutura da comunidade de arqueas avaliados nos períodos de verão e inverno. Uma pequena mudança na estrutura da comunidade metanogênica foi observada devido a uma variação do número e distribuição das OTUs entre as duas estações. O filo *Euryarchaeota* foi o principal grupo *Archaea* em ambas as estações.



No entanto, *Methanobacteriales* dominaram as comunidades das arqueas nos meses de verão, e no processo nos meses de inverno, o domínio foi dividido entre *Methanobacteriales* e *Methanosarcinales*.

Estudos anteriores sobre as populações de arqueas em biodigestores não sugerem qualquer relação entre gêneros, temperatura e produção de biogás (HORI et al., 2006; LEVÉN, ERIKSSON e SCHNÜRER, 2007; SUNDBERG et al., 2013). Entretanto, os nossos resultados indicam que a ordem hidrogenotrófica seria um grupo metanogênico chave nos processos de biodigestão realizado a temperatura ambiente e que a composição da comunidade *Methanobacteriales* pode ser afetada por uma ligeira mudança de temperatura.

Entre *Methanobacteriales*, A1 e A2 foram as OTUs mais importantes e estão relacionadas às espécies do gênero *Methanobrevibacter* sp. e *Methanocorpusculum* sp., linhagens que estão geralmente presentes no rúmen e estão relacionados a um papel importante na produção de metano em ambientes em que há variações de temperatura sazonais. Além disso, os genomas destes gêneros são significativamente enriquecidos com genes envolvidos na utilização de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> durante metanogênese (SIMANKOVA et al., 2003). Assim, a elevada percentagem deste gênero em ambas as estações, neste estudo, mostrou o papel essencial desempenhado por estas espécies na metanogênese e pode estar relacionada à adição de esterco bovino no substrato para esses biorreatores.

A abundância de clones relacionados com a família *Methanosarcinales* é amplamente descrito em uma variedade de digestores anaeróbios. Muitas metanogênicas do gênero *Methanosarcina* exibem características metabólicas de interesse, como metabolismo de hidrogênio e acetato como fonte de energia (KLOCKE et al., 2007; LEVÉN, ERIKSSON e SCHNÜRER, 2007). Neste estudo, as OTUs A3 e A5 foram mais proeminentes entre as sequências das amostras coletadas nos meses de inverno.

As sequências de arqueas e bactérias descritas neste estudo tiveram alta semelhança com linhagens não cultivadas descritas em uma ampla variedade de ambientes naturais e artificiais em diferentes partes do mundo, como por exemplo, no trato intestinal de animais, águas residuais e digestores anaeróbios. Assim, a comunidade microbiana analisada parece ser representante de um consórcio microbiano anaeróbio degradante de biomassas (KLOCKE et al., 2007).

A regulação da temperatura do digestor é um dos fatores decisivos durante o processo em países tropicais, como o Brasil, já que a maioria das temperaturas anuais está na gama mesófila. Em conjunto, esses resultados revelaram os primeiros conhecimentos sobre como uma ligeira mudança de temperatura pode variar a estrutura microbiana em digestores anaeróbios operados a temperatura ambiente. No entanto, esta mudança de estrutura não foi capaz de influenciar a qualidade da produção de metano ou ainda a dinâmica das comunidades, o que conduz à conclusão de que ocorreu provavelmente uma redundância de grupos, ou seja, entre as estações houve uma mudança na composição das comunidades, entretanto todos os grupos foram capazes de realizar funções similares.

**CAPÍTULO II. ANÁLISE DO RISCO CLÍNICO-MICROBIOLÓGICO  
DURANTE A DIGESTÃO ANAERÓBIA: BACTÉRIAS  
POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS E RESISTÊNCIA AOS  
ANTIMICROBIANOS**

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1. DEJETOS BOVINOS COMO FONTE DE MICRORGANISMOS POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS E GENES DE RESISTÊNCIA

Bactérias clinicamente relevantes ou potencialmente patogênicas são definidas como bactérias que podem causar doenças a seres humanos e esta capacidade de causar doença (patogenicidade) depende de dois importantes fatores, a virulência do ser infectante e a susceptibilidade do ser infectado (CASADEVALL e PIROFSKI, 2000).

A denominação virulência é atribuída ao conjunto dos fatores microbianos que podem agredir o hospedeiro, enquanto o termo “susceptibilidade” é usado para abranger todos os fatores de defesa inespecíficos e específicos do hospedeiro (CASADEVALL e PIROFSKI, 2000). Vale ressaltar que nem a virulência nem a susceptibilidade são fatores constantes, pois variam de acordo com a influência de vários fatores externos (fatores genéticos e estado nutricionais do hospedeiro, o quantidade e espécie do inoculante e a via de infecção) ou como resultado da própria relação microbiota x hospedeiro (CASADEVALL e PIROFSKI, 1999). Desta forma, estas variações fazem com que as infecções sejam caracterizadas pela magnitude das respostas do hospedeiro e do tipo de dano que ocorre com as diferentes infecções microbianas e a medida resultante destas duas interações descreve o grau de patogenicidade (CASADEVALL e PIROFSKI, 1999; 2007)

A virulência de um microrganismo potencialmente patogênico significa o conjunto dos fatores agressivos utilizados para lesar os tecidos do hospedeiro infectado. A aquisição destes genes que codificam os fatores de virulência pode ter uma infinidade de papéis funcionais, incluindo a capacidade para facilitar a adesão microbiana, invasão, ou ambos, bem como a promoção do crescimento de um microrganismo em um hospedeiro pelo escape do sistema imune (inibição da fagocitose e da regulação da capacidade de sobrevivência intracelular). A resistência a antibióticos também pode ser vista como um fator de virulência, visto que complica o tratamento médico de uma infecção bacteriana (CASADEVALL e PIROFSKI, 2000; 2007).

Um número crescente de estudos tem demonstrado o isolamento de bactérias patogênicas obrigatórias ou putativas em dejetos de origem de gado leiteiro. A partir

desses trabalhos foi possível observar que o perfil da microbiota é diversificado e compreende diferentes potenciais patógenos humanos, tais como: *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium* spp., *Salmonella enterica*, além de bactérias formadoras de esporos (SAWANT et al., 2007; WATANABE et al., 2010; DUNGAN, KLEIN e LEYTEM, 2012). A prevalência e os níveis de patógenos nos dejetos são afetados por vários fatores, como raça dos animais, dieta, estresse, idade ou mesmo hábitos de pastagens (NICHOLSON, GROVES e CHAMBERS, 2005).

As adoções de práticas que reduzem ao mínimo a transferência de contaminantes são de importância fundamental em um sistema de produção, pois estes dejetos podem conter diversas bactérias potencialmente patogênicas. Além disso, a persistência destas bactérias pode ocorrer no ambiente de criação dos animais por longos períodos de tempo devido à disseminação dentro da fazenda, seja nos equipamentos de alimentação e distribuição de água ou nos dejetos aplicados ao solo dentro da propriedade para produzir alimentos. Por conseguinte, o risco de contaminação e a segurança microbiológica irão depender, em grande parte, da capacidade de sobrevivência dos microrganismos no ambiente (AMARAL et al., 2004; SINTON et al., 2007).

## 1.2. ANTIMICROBIANOS NAS FAZENDAS DE PRODUÇÃO DE GADO LEITEIROS

Os antimicrobianos são tradicionalmente definidos como substâncias de baixo peso molecular que promovem a morte (ação bactericida) ou inibem o crescimento e a reprodução bacteriana (ação bacteriostática). São vários os mecanismos de ação dos antimicrobianos, com atuação na síntese da parede celular e aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática, interferência na replicação do DNA e na síntese proteica (KONEMAN et al., 2008; RANG et al., 2007).

Desde 1940, com a introdução dos antimicrobianos no tratamento das doenças infecciosas, houve uma mudança significativa no controle da população microbiana, o que resultou em impactos positivos para a saúde pública e qualidade de vida das populações humanas. Atualmente, os antimicrobianos têm grande utilidade tanto na medicina humana quanto no setor de produção animal, como na bovinocultura, avicultura, suinocultura e aquicultura (AMINOV, 2009; MARTINEZ, 2008; 2009).

Antibióticos são usados na produção animal geralmente, terapêuticamente, para tratar doenças (altas doses e aplicados individualmente ou contra determinado grupo) ou subterapeuticamente, para aumentar a eficiência alimentar ou prevenir doenças (tipicamente baixas doses). Entretanto, alguns antibióticos não são absorvidos devidamente e quantidades são excretadas na urina ou dejetos. Desta forma, o uso de agentes antimicrobianos em sistemas de produção pode exercer uma pressão seletiva para o surgimento e propagação de variantes resistentes (HEUER, SCHMITT e SMALLA, 2011; BAQUERO, TEDIM e COQUE, 2013).

A resistência aos antimicrobianos refere-se à habilidade dos microrganismos para se protegerem das atividades dos antibióticos. A definição de resistência a antibiótico varia de acordo com o contexto. Entretanto, clinicamente, a resistência refere-se à capacidade de um microrganismo de sobreviver ou crescer em concentrações terapêuticas do antibiótico, que normalmente iriam inibir ou matar membros suscetíveis da mesma linhagem (HARRIS, CORMICAN e CUMMINS, 2012).

Algumas espécies bacterianas são consideradas naturalmente resistentes aos antimicrobianos (resistência intrínseca). A resistência natural é uma característica intrínseca de um microrganismo, que ocorre sem uma exposição prévia ao antibiótico e é exibida por todos os exemplares de determinada espécie (MARTINEZ, 2008). A resistência adquirida aos antibióticos, por sua vez, pode resultar da mutação de genes reguladores ou estruturais, da aquisição de genes de resistência veiculados por elementos genéticos móveis, transferência horizontal ou da combinação de todos estes mecanismos. Além disso, neste caso, a resistência não estará presente em todos os indivíduos da mesma espécie. As bactérias podem também ser fenotipicamente suscetíveis, mas possuem genes de resistência que não são expressos (MARTINEZ e BAQUERO, 2002).

Além da resistência simples, quando um microrganismo é resistente a uma só droga, pode ocorrer também resistência múltipla, ou seja, a mesma linhagem é resistente a dois ou mais antimicrobianos de um mesmo grupo ou de grupos diferentes. Essa resistência múltipla de organismos patogênicos aos antibióticos causa dificuldades no tratamento efetivo de infecções humanas, o qual se torna mais caro e mais demorado, expondo os indivíduos a um maior risco (AMINOV, 2009). Várias evidências mostram que as drogas antimicrobianas podem realmente interferir com a expressão de determinantes de virulência microbianos (DINIZ et al.,

2004), principalmente no âmbito de infecções hospitalares. No caso de linhagens isoladas do meio ambiente, observa-se a possibilidade de transferência horizontal, isto é, uma determinada bactéria pode contribuir para resistência a um determinado antibiótico a outra, de mesma espécie, espécie diferente, ou mesmo de outro gênero. Este fato ganha notoriedade ao considerar-se ambientes enriquecidos com diversos agentes de pressão seletiva (KÜMMERER, 2004).

A utilização de antibióticos e de propagação de genes de resistência em contextos clínicos é uma preocupação amplamente reconhecida, entretanto, a resistência a antibióticos como problema ambiental necessita de estudos mais detalhados. A introdução de uma baixa concentração de antibióticos no meio pode ter um efeito significativo sobre a estabilidade do ecossistema e a seleção e disseminação de genes de resistência a antibióticos (MARTINEZ, 2009).

Uma grande preocupação para a bovinocultura de leite são, por exemplo, as doenças infecciosas de origem bacteriana, como a mastite, por apresentarem potenciais riscos na produção de leite. Em regra, os cálculos das perdas econômicas baseiam-se principalmente na perda imediata do leite causada pela mastite clínica. No entretanto, nas infecções subclínicas, os prejuízos são maiores, dado que sua frequência nos rebanhos e a longa persistência inaparente de infecções. A contínua ação irritante de microrganismos sobre a mucosa, durante uma ou várias lactações, provoca perda progressiva do epitélio secretor, reduzindo a produção láctea (SOMMERHÄUSER et al., 2003). Entre as principais perdas econômicas decorrentes da mastite bovina está a redução na produção em quantidade e qualidade do leite e produtos derivados, perdas devido ao descarte prematuro de vacas, custos com drogas e serviços veterinários, além do aumento da mão de obra. Assim, a principal estratégia para o controle deste problema é o uso de antibióticos (HALASA et al., 2007).

Informações publicadas sobre o uso de antibióticos na bovinocultura leiteira no Brasil são limitadas. Por esta razão, informações específicas sobre a frequência, a duração e a quantidade de antibióticos usados nestes rebanhos normalmente não estão disponíveis. Vários trabalhos apontam os antimicrobianos mais usados em outras localidades. Como exemplo, os antibióticos mais utilizados pelos produtores no Canadá são os  $\beta$ -lactâmicos, cefalosporinas de terceira geração e combinações de penicilina, que também são empregados na terapêutica humana (SAINI et al., 2012). Na China, vários antibióticos, como tetraciclina, sulfonamidas,

fluroquinolones, macrolídeos, trimetropim, lincomicina e florfenicol foram detectados no solo e água, sugerindo que os antibióticos usados nas fazendas de gado podem ser uma importante fonte de poluição aos meios subsequentes (ZHOU et al., 2013). No Peru, um trabalho recente em uma pequena fazenda de gado leiteiro mostrou que os antibióticos mais comumente usados foram oxitetraciclina, penicilinas e sulfametoxazol-trimetropim (REDDING et al., 2013). Na França, uma alta frequência de resistência a macrolídeos e lincosaminas mediada por *ermB* foi demonstrada em inúmeros isolados provenientes de mastite, sugerindo que estes antimicrobianos são comumente usados nas fazendas (HAENNI et al., 2011).

O aumento da introdução de agentes antimicrobianos no ambiente, seja por terapia médica ou animal, resulta em novas pressões seletivas em populações bacterianas. A resistência a antibióticos e genes de virulência idênticos aos relatados em patógenos humanos são detectados em todo o mundo em dejetos e em águas residuais tratadas. Numerosos fatores biológicos e físico-químicos podem influenciar a persistência e disseminação desses determinantes durante o tratamento de águas residuais (VARELA e MANAIA, 2013).

A propagação da resistência a estes antimicrobianos em bactérias patogênicas para os seres humanos limita severamente as opções terapêuticas no controle das infecções humanas e, portanto, o uso destas substâncias em animais deve ser controlado ou evitado, de modo a prevenir a disseminação da resistência aos medicamentos (HEUER, SCHMITT e SMALLA, 2011).

### **1.3. USO DE EFLUENTES DE BIODIGESTORES COMO BIOFERTILIZANTES**

A tecnologia de biodigestão anaeróbia de dejetos animais apresenta diversas vantagens. Um dos produtos resultantes da obtenção do biogás é o biofertilizante, produto que promove o aumento da produtividade agrícola, com redução da necessidade de fertilizantes comerciais. Além disso, o biogás é também utilizado na produção de energia térmica e elétrica, o que promove a descentralização e autossuficiência energética de empresas agrícolas, em razão do baixo custo da tecnologia e de sua aplicação (KARIM et al., 2005; ABBASI, TAUSEEF e ABBASI, 2012; ABUBAKER, RISBERG e PELL, 2012; LUSTE, HEINONEN-TANSKI e LUOSTARINEN, 2012).



A produção do biofertilizante se dá pela fermentação (digestão anaeróbia) de resíduos orgânicos. A principal razão para a capacidade de fertilização do biofertilizante se encontra no fato da digestão da biomassa diminuir drasticamente o teor de carbono presente na mesma. Isso ocorre devido a biodigestão da matéria orgânica perder exclusivamente carbono sob a forma de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. Além disso, há um aumento do teor de nitrogênio e demais nutrientes devido à perda de C/N da matéria orgânica; desse modo, alguns microrganismos do solo conseguem um melhor índice de fixação do nitrogênio, além do próprio biofertilizante conter alguns nutrientes solubilizados (UBALUA, 2007).

Vários estudos apontam a presença e persistência de microrganismos clinicamente relevantes em efluentes de biodigestores. Embora geralmente não sejam encontrados em grande número, podem representar risco para a saúde pública, quando descartados no meio ambiente sem diminuição dos números de microrganismos potencialmente patogênicos (KIM et al., 2013).

O uso de efluentes como fertilizante tem sido discutido como uma fonte potencial de infecção, em consequência que são suspeitos de transferir bactérias patogênicas para legumes e outras culturas. Em maio de 2011, na Alemanha, um surto de *Escherichia coli* enterohemorrágica O104:H4 foi um exemplo de uma doença de origem alimentar. Cerca de 3.800 pacientes foram infectados e sofreram de gastroenterite aguda ou mesmo síndrome hemolítico-urêmico. Estudos epidemiológicos e de vigilância foram realizados para identificar a origem das infecções e, estes estudos conduziram à hipótese de que os vegetais, como pepinos ou tomate contaminados, poderiam estar envolvidos na propagação de bactérias patogênicas. Brotos de feno-grego cultivados a partir de sementes do Egito foram identificados como a fonte mais provável de infecção, identificando que todos os casos foram causados pela transferência deste patógeno em alimentos (ALTMANN et al., 2011; EIKMEYER et al., 2013). Ainda na Europa, a prevalência de bactérias indicadoras (*Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.) e bactérias formadoras de esporos (*Clostridium* spp. e *Bacillus* spp.) foram observadas em efluentes de quatro biodigestores de escala real na Suécia, alimentados com dejetos de animais durante um ano (BAGGE, SAHLSTRÖM e ALBIHN, 2005).

Em recente estudo no Vietnã, a segurança microbiológica de efluentes de biogás também foi avaliada em sistemas de produção em pequena escala alimentados com dejetos de suínos. Apenas uma pequena redução de *E. coli* nos

efluentes foi observado (1 a 2 ciclos log de redução) após 50 dias de fermentação, resultado este que associou o uso destes efluentes a riscos para a saúde humana e animal (HUONG et al., 2014).

*Escherichia coli* não é o único potencial patógeno de origem alimentar relevante. Outras bactérias patogênicas causadoras de infecções alimentares em humanos, como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter*, *Vibrio* e espécies de *Clostridium*, são também encontradas em dejetos ou em efluentes de biodigestores alimentados com dejetos de animais (BAGGE, SAHLSTRÖM e ALBIHN, 2005; WATCHARASUKARN et al., 2009; BAGGE, PERSSON e JOHANSSON, 2010; CHEN et al., 2012).

O gênero *Clostridium* é bem difundido em sistemas de produção de biogás, pois realiza as primeiras etapas de digestão anaeróbia. Este gênero compreende alguns agentes patogênicos importantes, como *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens* e *C. tetani*. Diante deste fato, recentemente em uma usina de biogás, *C. botulinum* foi identificado em fezes de animais, que seriam substrato de biodigestores e esta foi relacionada à disseminação desse patógeno por meio dos efluentes (EIKMEYER et al., 2013).

Assim, diante destes inúmeros estudos, ainda pouco se discute a respeito da segurança sanitária destes efluentes, que são tipicamente usados para fertilização ou lançados no meio ambiente após a digestão anaeróbia. Novos estudos necessitam ser realizados com intuito de observar a prevalência de patógenos, principalmente em diferentes aspectos físico-químicos do processo de biodigestão (HUONG et al., 2014).

#### **1.4. FATORES RESPONSÁVEIS PELA ELIMINAÇÃO OU INATIVAÇÃO DE BACTÉRIAS CLINICAMENTE RELEVANTES NO PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA**

Os principais fatores que causam a eliminação ou inativação de patógenos nos efluentes, durante a digestão anaeróbia, irão variar de acordo com as práticas de manipulação. Dentre estes fatores podemos citar tempo de retenção, temperatura, pH, condições ambientais, tipo de dejetos empregados, além dos tipos de patógenos existentes (SAHLSTRÖM, 2003; MASSÉ, GILBERT e TOPP, 2011).

As taxas de redução dos agentes patogênicos, ou o grau de decomposição, poderão ser utilizados para avaliação da eficácia do processo fermentativo. A morte microbiana em um sistema de biodigestão segue um padrão exponencial e a extensão da inativação microbiana sob diferentes condições do processo pode ser avaliada utilizando parâmetros cinéticos e modelos, entretanto isso requer extensos dados experimentais para definição da cinética de degradação. Geralmente o perfil da curva de sobrevivência depende das características intrínsecas dos microrganismos testados, bem como outros fatores importantes, incluindo a linhagem, temperatura, condições de aquecimento, atividade de água, pH e nutrientes (SMITH et al., 2005).

Dentre estes fatores a temperatura e o tempo de retenção são peças chaves para sobrevivência de patógenos nos biodigestores (WATCHARASUKARN et al., 2009). Os processos de digestão anaeróbia comumente são operados em temperaturas constantes, na faixa mesofílica (25 - 38°C) ou termofílica (50 - 55°C). As digestões anaeróbias em alta temperatura geralmente proporcionam uma maior eficiência na degradação da matéria orgânica em relação à digestão em temperaturas mesófilas, o que resulta em uma maior produção de biogás. Além disso, a digestão termofílica, apresenta uma maior taxa de redução de agentes patogênicos dos efluentes. Entretanto, os processos mesofílicos requerem menos entrada de energia para o aquecimento e são menos afetados por efeitos inibitórios liberados durante a degradação (SAHLSTRÖM et al., 2004; BAGGE, SAHLSTRÖM e ALBIHN, 2005; BAGGE, PERSSON e JOHANSSON, 2010). Inúmeros trabalhos apontam que a inativação bacteriana está intimamente relacionada à temperatura (SAHLSTRÖM, 2003; BAGGE, SAHLSTRÖM e ALBIHN, 2005; VENGLOVSKY et al., 2009).

Além disso, a sobrevivência das bactérias pode ser dependente das características das diferentes espécies bacterianas e presença de nutrientes. Em um trabalho realizado por Kearney et al. (1993) foi observado um rápido declínio de diferentes bactérias, como *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* e *Y. enterocolitica*, logo após o carregamento inicial dos biodigestores. Segundo estes autores, houve uma oferta insuficiente de nutrientes disponíveis para o número de bactérias. Assim, a flutuação de nutrientes em sistemas contínuos pode influenciar a persistência de bactérias.

Existe uma necessidade urgente para o desenvolvimento de métodos custo-efetivos dirigidos nas questões ambientais de dejetos a fim de reduzir os contaminantes microbiológicos (MASSÉ, GILBERT e TOPP, 2011). A este respeito, a digestão anaeróbia a temperatura ambiente seria a solução para o tratamento de dejetos de gado e também de águas residuais, e este processo poderia ter um efeito principal na redução dos requisitos de energia e custos.

O Brasil é o país que apresenta condições climáticas na faixa mesofílica (entre 20°C e 40°C), o que garante a digestão anaeróbia a temperatura ambiente durante todo o ano, sem aquecimento do digestor (KUNZ, MIELE e STEINMETZ, 2005; KUNZ, OLIVEIRA e HIGARASHI, 2009). No entanto, ainda permanece incerto se a variação de temperatura entre as estações do ano na gama mesofílica poderia afetar a estabilidade da comunidade microbiana, a inativação de bactérias clinicamente relevantes ou mesmo a propagação de genes de resistência (LEVÉN, ERIKSSON e SCHNÜRER, 2007; LEE et al., 2012). Poucos estudos têm sido realizados para investigar o efeito da mudança de temperatura sobre a estrutura da comunidade microbiana em reatores de biogás operados a temperatura ambiente, especialmente aqueles em digestores anaeróbios que tratam dejetos de vacas leiteiras.

Do exposto, o conhecimento da prevalência e a dinâmica de bactérias clinicamente relevantes e de genes de resistência são fundamentais para compreender a segurança sanitária do processo de biodigestão, além dos riscos associados ao uso destes efluentes para a saúde humana e animal.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a ocorrência e a persistência, o perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas e os marcadores genéticos de resistência de grupos bacterianos de relevância clínico-microbiológica, durante o processo de digestão anaeróbia em biorreatores de escala piloto operados a temperatura ambiente.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os grupos de bactérias de importância durante o processo de digestão anaeróbia;
- Isolar e identificar bastonetes Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* e não fermentadores de interesse presentes durante a digestão anaeróbia;
- Isolar e identificar cocos Gram-positivos dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* durante a digestão anaeróbia;
- Determinar o perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas de interesse clínico humano das linhagens bacterianas isoladas e identificadas;
- Avaliar por PCR quantitativo a abundância de genes de resistência aos antimicrobianos durante a digestão anaeróbia, representativos daqueles mais relevantes em medicina humana e veterinária (macrolídeos, *ermB*, aminoglicosídeos, *aphA2* e beta-lactâmicos, *bla<sub>TEM-1</sub>*);
- Identificar sequências de DNA codificadores para a região 16S rRNA de espécies bacterianas potencialmente patogênicas nos efluentes de biodigestão anaeróbia.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DOS AFLUENTES E EFLUENTES

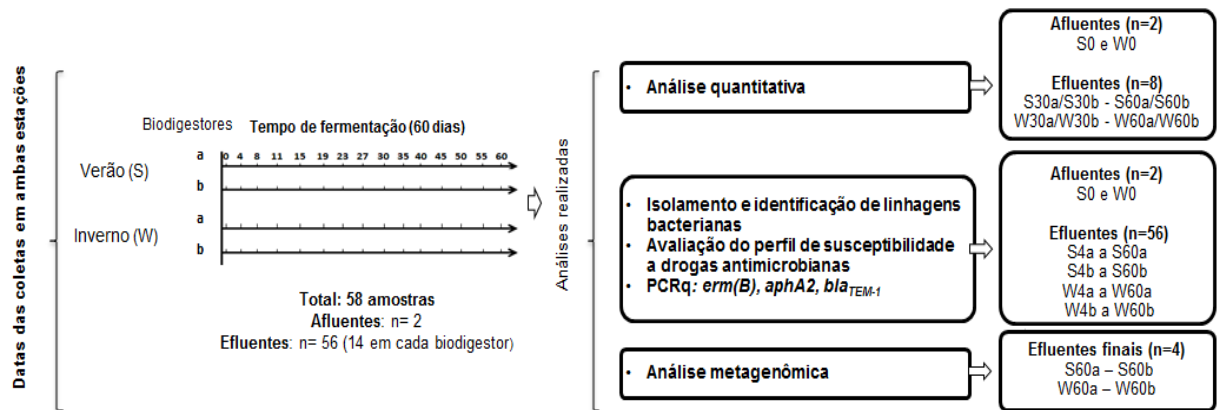
Nos mesmos ensaios descritos no Capítulo I, foram também realizados experimentos para as análises microbiológicas dos afluentes e efluentes. Os ensaios foram realizados em dois períodos do ano. O primeiro no verão (18 de janeiro de 2012 a 19 de março de 2012) e outro durante outono/inverno (11 de abril de 2012 a 10 junho de 2012), ambos operados com tempo de retenção hídrico (TRH) de 60 dias. A temperatura ambiente foi aferida diariamente com o auxílio de um termômetro digital portátil.

Alíquotas de 30 mL das amostras do afluente (carregamento inicial) e do efluente (biofertilizante) foram coletadas em diferentes tempos de retenção para as análises microbiológicas.

Conforme, descrito no Material e Métodos do Capítulo I, as amostras foram denominadas por um código que representam a estação, dia de coleta e origem (entre os dois biodigestores). Amostras coletadas nos meses de verão e de inverno foram denotadas com as letras S (*Summer*) e W (*Winter*), respectivamente. Os números (0 a 60) foram adicionados referindo-se às datas de amostragem durante a digestão anaeróbia, seguidos, das letras (a e b) que correspondeu a cada um dos biodigestores em que foi realizada a fermentação.

No total 58 amostras foram coletadas para as análises microbiológicas, duas do afluente, uma referente ao carregamento inicial de ambos os biodigestores no verão (denominada S0) e outra do carregamento inicial no ensaio realizado no inverno (denominada W0). As demais amostras (n = 56) foram coletadas, conforme o esquema da Figura 12.

Todas as amostras foram coletadas em frascos descartáveis e estéreis e transportadas, imediatamente, até o Laboratório de Microbiologia do Rúmen, da Embrapa Gado de Leite.



**Figura 12.** Esquema referente às datas de coleta das amostras dos afluentes e efluentes e as análises microbiológicas realizadas. Amostras coletadas nos meses de verão e de inverno foram denotadas com as letras S e W, respectivamente. Os números (0 a 60) referem-se às datas de amostragem e as letras (a e b) correspondem a cada um dos dois biodigestores em que foi realizada a fermentação.

### 3.2. ANALISE QUANTITATIVA

Amostras do afluente ( $n = 2$ ; carregamento inicial) e do efluente ( $n = 8$ ) de ambos os ensaios de biodigestão (verão e inverno) foram coletadas para as análises quantitativas e procedidas as diluições seriadas até  $10^{-8}$  em solução salina (0,9% NaCl). As amostras foram homogeneizadas e, a partir das diluições obtidas, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas com auxílio de alça de Drigalski, em duplicata, nos seguintes meios de cultura seletivos aeróbios: ágar eosina azul de metileno, para contagem de colônias fermentadoras (família *Enterobacteriaceae*) ou não-fermentadoras de lactose (ENT e BGN NF), ágar hipertônico manitol, para contagem de cocos Gram-positivos/catalase positivo (CGP/C+), como *Staphylococcus* spp. e em ágar bile esculina, suplementado com 0,01% de azida sódica, para contagem de cocos Gram-positivos/catalase negativo (CGP/C-), como *Enterococcus* spp. Posteriormente, os meios foram incubados em estufa bacteriológica a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas e a placa de menor diluição a conter entre 30 e 300 colônias foi utilizada para estimar o número de bactérias nas amostras (APHA, 2004).

### 3.3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS

Amostras do afluente (n = 2) e do efluente (n = 56) de ambos os ensaios de biodigestão (verão e inverno) foram coletadas. Alíquotas de 10 mL foram processadas para o isolamento seletivo de linhagens bacterianas de interesse, considerando-se cocos Gram-positivos (CGP) dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, bastonetes Gram-negativos anaeróbios facultativos da família *Enterobacteriaceae* (ENT) e bastonetes Gram-negativos não fermentadores (BGN NF).

#### 3.3.1. Isolamento e identificação de espécies de cocos Gram-positivos

Para o isolamento e identificação de *Staphylococcus*, 100 µL das amostras foram inoculados sem diluição, por esgotamento, com auxílio de alças bacteriológicas estéreis, em AHM (*Himedia Laboratories Pvt. Ltd.*, Índia), seletivo para as espécies do gênero. Após 24 horas de incubação a 35 °C, cinco colônias, no máximo, de diferentes morfotipos, fermentadoras ou não do manitol, foram isoladas e cultivadas novamente em AHM, para a obtenção de culturas puras. Em seguida, foi realizada avaliação morfotintorial pela coloração de Gram e subcultivo em TSA (*Himedia Laboratories Pvt. Ltd.*, Índia), para posteriores testes de identificação bioquímico-fisiológica (KONEMAN et al., 2008).

Para o isolamento e identificação de *Streptococcus* e *Enterococcus*, 500 µL dos espécimes foram inoculados, para enriquecimento, em Caldo Todd Hewitt, suplementado com 8 µg/mL de gentamicina e 15 µg/mL de ácido nalidíxico. Após 24 horas de incubação a 35 °C foi realizado subcultivo das culturas em Ágar sangue (AS), para o isolamento de linhagens de *Streptococcus*, e em Ágar BE (*Himedia Laboratories Pvt. Ltd.*, Índia) acrescido de Azida Sódica (0,01%), para o isolamento seletivo de *Enterococcus*. Do AS foram selecionadas linhagens apresentando ou não hemólise do tipo beta, e do BE foram selecionadas colônias que hidrolisaram a esculina. Em seguida, foi realizada a avaliação morfotintorial pela coloração de Gram, para observação dos CGP aos pares ou em cadeias. As linhagens bacterianas isoladas foram avaliadas quanto à produção da enzima catalase, pelo teste em lâmina com peróxido de hidrogênio (3%). A produção de bolhas decorrente da liberação de oxigênio (gás) indicou reação positiva (KONEMAN et al., 2008).



Posteriormente, para a identificação específica dos CGP isolados, foi utilizado o kit comercial BBL *Crystal Gram-Positive Identification System* (Becton, Dickinson and Company, EUA). Os kits foram utilizados conforme instrução do fabricante. Após inóculo, o sistema foi fechado e incubado a 37°C por cerca de 20 a 24 horas. A leitura foi realizada analisando-se as alterações de cor ou presença ou ausência de fluorescência resultante da atividade metabólica dos microrganismos. Os resultados foram convertidos em números de dez dígitos, cujo perfil foi analisado de acordo com a base de dados do BBL *Crystal GP ID Kit*. Após identificação, as amostras foram armazenadas em meio de congelamento, a - 20°C.

### 3.3.2. Isolamento e identificação de espécies de bastonetes Gram-negativos

Para o isolamento e identificação dos BGN da família *Enterobacteriaceae* e BGN não-fermentadores, 100 µL das amostras foram inoculados, sem diluição, por esgotamento, com auxílio de alças bacteriológicas estéreis, em Agar EMB (*Himedia Laboratories Pvt. Ltd.*, Índia). Após 24 horas de incubação a 35°C, cinco colônias, no máximo, de diferentes morfotipos foram isoladas e cultivadas novamente em EMB, para a obtenção de culturas puras. Em seguida, foi realizada a avaliação morfotintorial pela coloração de Gram e subcultivo em TSA.

As linhagens bacterianas isoladas foram submetidas à identificação presuntiva pela avaliação da habilidade de fermentação da lactose, sacarose e glicose, com ou sem a produção de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S, por método bioquímico-fisiológico utilizando-se Agar TSI (*Himedia Laboratories Pvt. Ltd.*, Índia). Neste sistema, as amostras foram inoculadas e incubadas a 35°C por 24 horas (KONEMAN et al., 2008).

Para a identificação específica das enterobactérias isoladas foi utilizado o sistema comercial *API 20E* (BioMérieux®, França), enquanto os BGN não fermentadores foi utilizado o sistema *API 20NE* (BioMérieux®, França), de acordo com as instruções do fabricante. Após inóculo, o sistema foi fechado e incubado a 37°C por cerca de 18 a 20 horas. A leitura foi realizada analisando-se as alterações de cor resultante da atividade metabólica dos microrganismos, e mediante as combinações das provas positivas, foi gerado um código, que, lançado no software do fabricante, possibilitou a identificação das bactérias. Após identificação, as amostras foram armazenadas em meio de congelamento a - 20°C.

### 3.4. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A DROGAS ANTIMICROBIANAS

O perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas das amostras bacterianas isoladas e identificadas foi avaliado pelo método de diluição em ágar, tal como recomendado pelo CLSI (CLSI, 2012).

Foram avaliados diferentes antimicrobianos para cada grupo bacteriano, selecionados em função da sua utilização na rotina dos hospitais e pela população em geral. Para os CGP foi avaliada a susceptibilidade às drogas, oxacilina, vancomicina, levofloxacino, rifamicina, penicilina, eritromicina, ampicilina/sulbactam e sulfametoxazol/trimetropim. Para os ENT, levofloxacino, amicacina, gentamicina, meropenen, cefepime, sulfametoxazol/trimetropim, ampicilina, ampicilina/sulbactam, cloranfenicol, piperacilina/tazobactam e para os BGN NF, foram avaliados os antimicrobianos piperacilina/tazobactam, cefepime, sulfametoxazol/trimetropim, cloranfenicol, gentamicina, meropenen, levofloxacino e amicacina.

Concentrações crescentes dos antimicrobianos (0,0625 µg/mL a 1.024,0 µg/mL) foram adicionadas a frascos com 40 mL do meio de cultura AMH fundido (45°C), e vertido em placas de Petri estéreis, para realização do teste em duplicata.

As linhagens bacterianas foram inoculadas em ágar TSA e incubadas a 37°C, por 24 horas, em estufa bacteriológica. Após o crescimento bacteriano, com auxílio de alças bacteriológicas estéreis, foram obtidas suspensões bacterianas em solução salina estéril (NaCl 0,9%), com turbidez ajustada para 0,5 na escala McFarland (~10<sup>8</sup> UFC/mL). Com o uso do Replicador de Steers (STEERS et al., 1959), inóculos padronizados (10<sup>5</sup> células/ponto) das amostras foram adicionados a placas com os antimicrobianos, sequencialmente, em ordem crescente de concentração, as quais foram incubadas a 35°C em estufa bacteriológica. Placas controle, sem adição da droga, também foram inoculadas. A fim de garantir a reprodutibilidade dos testes foram utilizadas como controle, as linhagens bacterianas de referência *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). A leitura dos resultados foi realizada após 24 horas de incubação, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) de antimicrobianos para cada isolado.

Os dados para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das linhagens bacterianas isoladas foram apresentados em termos de CIM<sub>50</sub> (concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir 50% das amostras testadas)

e CIM<sub>90</sub> (concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir 90% das amostras testadas), variação das CIMs e taxas de sensibilidade, resistência intermediária e resistência.

#### 3.4.1. Perfil de múltipla resistência aos antimicrobianos

A partir dos resultados das CIM, o índice de múltipla resistência a antibióticos (MAR) foi calculado. Este cálculo foi realizado para cada isolado, pela divisão do número de drogas ao qual determinado isolado foi resistente sobre o número total de drogas testadas: para os CGP, foram avaliadas oito drogas, para os ENT, dez e para os BGN NF, oito antimicrobianos. O índice MAR acima de 0,2 indica multirresistência (KRUMPERMAN, 1983).

### 3.5. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DO AFLUENTE E EFLUENTE

Com intuito de avaliar a dinâmica temporal (durante os 60 dias de fermentação) e sazonal (verão e inverno) dos genes de resistência e a presença de bactérias potencialmente patogênicas nas amostras finais, conforme descrito no Capítulo I, amostras do afluente e efluente (n = 58) tiveram o DNA total extraído e armazenado à -80°C. Posteriormente, estas amostras de DNA foram submetidas à liofilização e enviados a temperatura ambiente ao *Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement* (INRA/FR) para serem realizados os procedimentos seguintes.

#### 3.6. PCR QUANTITATIVO (qPCR)

Reações de PCR quantitativo (qPCR) foram utilizadas para quantificar a abundância dos genes de resistência, *ermB*, *aphA2* e *bla<sub>TEM-1</sub>*, associadas com macrolídeos, aminoglicosídeos e beta-lactâmicos, respectivamente, e para o domínio *Bacteria* em amostras de DNA extraídos dos afluentes e efluentes dos biodigestores. Os genes de resistência escolhidos são representativos dos antibióticos comumente utilizados na medicina humana e veterinária (KEMPER, 2008). Todos os iniciadores usados no qPCR são listados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Sequência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas técnicas de qPCR aplicadas na avaliação da dinâmica e abundância de genes de resistências.

Gene alvo	Iniciadores	Sequência5'-3'	Temp. de anelamento (°C)	Referência
Resistência a $\beta$ -Lactâmicos	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	F: CATTTCGTGTCGCCCTTAT	58	SHI et al., 2013
		R: GGGCGAAAACCTCTCAAGGAT		
Resistência a macrolídeos	<i>ermB</i>	F: AGCCATGCGTCTGACATCTA	55	SHI et al., 2013
		R: CTGTGGTATGGCGGGTAAGT		
Resistência a aminoglicosídeos	<i>aphA2</i>	F: GATTGAACAAGATGGATTGC	55	SHI et al., 2013
		R: CCATGATGGATACTTTCTCG		
16S rRNA - <i>Bacteria</i>	W208	F: ACTCCTACGGGAGGCAG	60	YU et al., 2005
	W209	R: GACTACCAGGGTATCTAATCC		
	W210	TGCCAGCAGCCGCGGTAATAC-Tamra		

Para os genes de resistência, a reação foi composta de 1  $\mu$ l de cada iniciador (0,2 mM), 12,5  $\mu$ L *Sso-Advanced SYBR Green Supermix* (Bio-Rad Laboratories, Inc.), 5,5  $\mu$ L de água ultra pura. Para completar o volume da reação de qPCR foi inserido em cada poço da placa de 96 poços um volume de 5  $\mu$ L de cada DNA na concentração de 10 ng/ $\mu$ L e 1 ng/ $\mu$ L, em triplicatas. Em seguida, a placa de reação foi submetida ao equipamento *CFX96 Real Time Detection System* (Bio-Rad Laboratories, Inc.). As condições utilizadas para a amplificação dos iniciadores foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg. e temperatura de anelamento conforme o iniciador (Tabela 5). Em seguida, foi realizada a leitura da curva de *melting* com temperatura variando de 65 a 95°C, para verificação da especificidade da reação (ausência picos inespecíficos e/ou dímeros de iniciadores).

A análise dos dados gerados foi feita com o auxílio do software CFX® Manager software 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc). Por meio deste software determinou-se o *threshold*, ou limiar de detecção, de cada amostra testada. O *threshold* corresponde a um ponto de referência, dado que neste ponto todas as amostras possuem a mesma intensidade de fluorescência. Uma vez determinado o

*threshold*, foi estabelecido o número de CT (*threshold cycle*) de cada amostra, o qual se refere ao número de ciclo no qual a curva de amplificação de cada amostra atinge o *threshold* estabelecido.

A eficiência de amplificação (E) de cada um dos pares de iniciadores foi determinada por meio de uma curva padrão composta de cinco pontos e que foi gerada a partir de reações em triplicata de PCR em tempo real, nas quais foram utilizadas diluições seriadas de plasmídeos com os genes de resistência obtidos por clonagem molecular.

As reações de amplificação para o domínio *Bacteria* foram realizadas em um volume total de 25 µL. Assim, todas as misturas de reação continham 12,5 µL de *Express qPCR Supermix with premixed ROX (Invitrogen, França)*, 10 nM iniciadores, 8 nM sonda TaqMan, 5 µl de DNA na concentração de 1 e 0,1 ng/µL, e água adicionada para obter o volume final. O programa utilizado foi o seguinte: incubação inicial de 20 s, a 95°C e 40 ciclos de desnaturação (95°C, 15 s, 60°C, 1 min.). Clones LC103 foram utilizados como padrões para *Bacteria* (BRAUN et al., 2005). O número total de bactérias foi expresso como o número de cópias por grama de afluente e efluente.

### 3.7. IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA CODIFICADORES PARA A REGIÃO 16S rRNA DE ESPÉCIES BACTERIANAS POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS

A persistência de espécies bacterianas potencialmente patogênicas nos efluentes de biodigestão anaeróbia foram identificadas pela avaliação dos dados gerados a partir do pirosequenciamento do metagenoma. Estes dados foram obtidos das amostras finais do processo de biodigestão durante os meses de verão (S60a e S60b) e inverno (W60a e W60b), realizados conforme descrito no Capítulo I.

Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foram definidas como grupo de sequências com um p-distância de 0,03 (ou 97% de similaridade). As OTUs foram taxonomicamente classificadas usando BLASTN contra a base de referência SILVA.

Em seguida, as OTUs foram taxonomicamente classificadas usando BLASTn contra o banco de dados *in-house* criado com sequências 16S rRNA de bactérias clinicamente relevantes (Tabela 6).

**Tabela 6.** Sequências do gene 16S rRNA de bactérias clinicamente relevantes inseridas no banco de dados *in-house* criado para classificações taxonômicas das OTUs definidas neste estudo.

Espécies selecionadas	Número de acesso nos bancos de dados
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	NC_009085
<i>Burkholderia cepacia</i>	GQ359110
<i>Bacillus anthracis</i> str. H9401	NC_017729
<i>Bacteroides fragilis</i> 638R	FQ312004
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i>	CP001900
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	ANAV01000042
<i>Clostridium botulinum</i> NCTC 2916	NZ_ABDO02000001
<i>Clostridium difficile</i> CD196	NC_013315
<i>Clostridium perfringens</i>	NZ_ABDY01000045
<i>Clostridium tetani</i> E88	NC_004557
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> HC01	NC_016786
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4200	NZ_GG670380
<i>Enterococcus faecium</i>	AY172570
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	NC_010468
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586	NC_003454
<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP	NC_007146.2
<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> HS11286	CP003200
<i>Listeria monocytogenes</i>	S55472.1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	NC_009565.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCGM2.S1	AP012280
<i>Neisseria meningitidis</i> M01-240149	CP002421
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> str. SC-B67	NC_006905.1
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	NZ_GG730226
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A	NC_002976
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a	NC_010943
<i>Streptococcus agalactiae</i> GD201008-001	CP003810
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 700669	NC_011900
<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS5005	NC_007297
<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar <i>eltor</i> str. N16961	NC_002505
<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i>	NC_008800

As 30 sequências do gene 16S rRNA analisadas neste estudo incluíram as sequências de bactérias potencialmente patogênicas conhecidas recuperadas do banco de dados do GenBank. As sequências dos genes 16S rRNA mais representativas foram escolhidas para esta investigação de acordo com as seguintes

normas: (a) linhagens com boa caracterização fenotípica (b) linhagens isoladas como fonte de contaminação ou infecção em humanos (c) sequências com menor quantidade de bases indeterminadas.

Para a classificação final, uma espécie de bactéria foi definida como "identificada confiantemente pelo sequenciamento do gene 16S rRNA" se identificação pelo alinhamento fosse maior que 97% e pelo menos 249 pb atribuído à respectiva sequência genética 16S rRNA das espécies de bactérias clinicamente relevantes

### 3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar o desempenho médio dos processos de digestão anaeróbia em ambas as estações, os dois biodigestores avaliados e amostrados foram tratados como repetições. As médias e desvios padrão de todos os dados foram determinados. O teste de ANOVA e o teste a posteriori de Tukey foram utilizados para comparações da distribuição dos diferentes grupos nos diferentes biodigestores. As contagens bacterianas nos experimentos de contagem direta em superfície (*spread plate*) foram convertidas em  $\log_{10}$  do número de unidades formadoras de colônias por mL de afluente ou efluente (log UFC/mL). Em seguida, o teste ANOVA foi utilizado para comparação das taxas de redução, entre as amostras do afluente e do efluente (após 60 dias de fermentação).

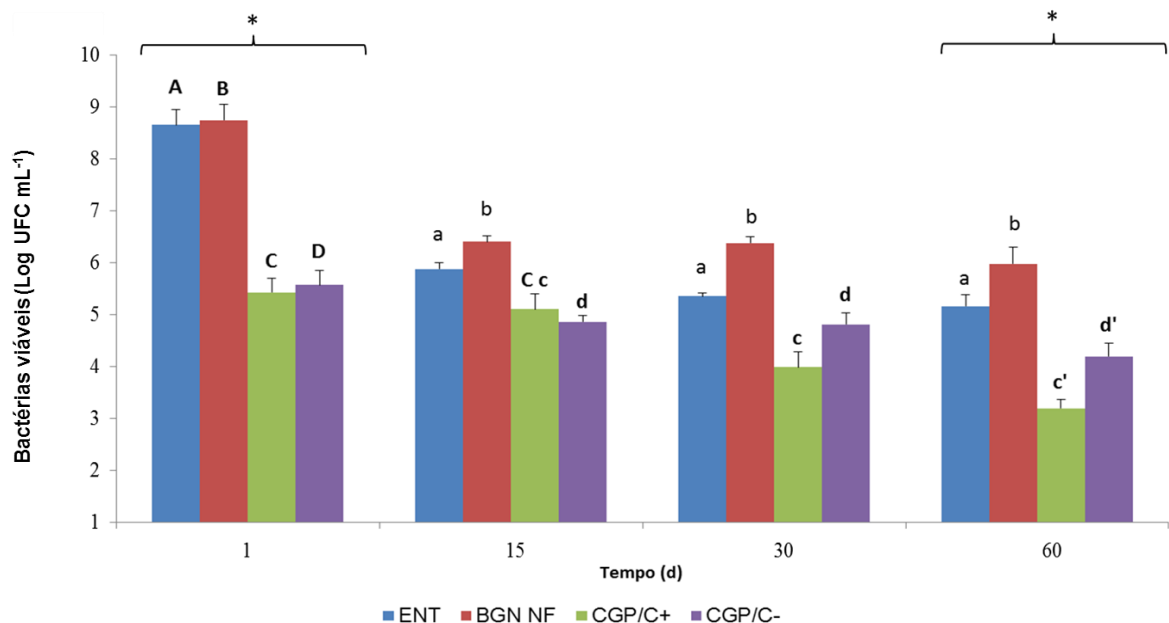
O número total de genes *ermB*, *aphA2*, *bla<sub>TEM-1</sub>* e bactérias totais foi transformado em  $\log_{10}$  e, em seguida, a abundância dos genes para cada amostragem foi analisada por ANOVA. A correlação entre os diferentes genes de resistência (*ermB*, *aphA2*, *bla<sub>TEM-1</sub>*) foi analisada pelo cálculo do coeficiente de correlação de Pearson. Para as análises de correlação, todos os valores de gene de resistência foram normalizados em relação ao número de bactérias totais (abundância relativa), a fim de minimizar as variâncias causadas pelas diferenças de abundância bacteriana.

O nível estabelecido para significância dos testes utilizados foi  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. PREVALÊNCIA BACTERIANA E SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DURANTE O PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA

As densidades bacterianas totais foram obtidas por contagem direta em superfície (*spread plate*), tanto nas amostras do afluente (carregamento inicial) como dos efluentes (após 30 e 60 dias de fermentação). Entre os grupos estudados, ENT, BGN NF, CGP/C+ e CGP/C-, não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras coletadas nos diferentes ensaios de biodigestão (verão e inverno). Desta forma, os dados foram exibidos como média dos resultados obtidos em função dos mesmos dias de coleta. Pela Figura 13, é possível observar o valor médio das amostras do afluente, relativo à média do carregamento inicial (S0 e W0). O dia 15 corresponde à média das amostras analisadas após 15 dias de fermentação (S15a, S15b, W15a e W15b). O dia 30, média das amostras analisadas após 30 dias de fermentação (S30a, S30b, W30a e W30b) e o dia 60, média dos efluentes após 60 dias de fermentação (S60a, S60b, W60a e W60b).



**Figura 13.** Valor médio das contagens bacterianas viáveis (log UFC/mL) das amostras dos afluentes (carregamento inicial) e dos efluentes (dias 15, 30 e 60) obtidas de biodigestores alimentados com dejetos bovinos operados a temperatura ambiente durante verão e inverno. ENT: Bacilos Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae*; BGN NF: Bacilos Gram-negativos não fermentadores; CGP/C+: Cocos Gram-positivos/catalase positivo; CGP/C-: Cocos Gram-positivos/catalase-negativo. Letras diferentes, incluindo minúsculas ou maiúsculas e " \* " indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).



Durante os dois períodos, a contagem de CGP/C+ em ágar Manitol reduziu 2,1 ciclos log, no afluente apresentou  $2,65 \times 10^5$  UFC/mL (carregamento inicial), sendo observado no efluente após 60 dias de fermentação  $1,57 \times 10^3$  UFC/mL (99,40% de redução,  $p = 7,9 \times 10^{-8}$ ). Ao longo da avaliação do processo, a diminuição das contagens de CGP/C+ foram observadas entre a carga inicial e o 30º dia de fermentação ( $p = 0,0001$ ) e entre o 30º e 60º dias de digestão anaeróbia ( $p = 0,001$ ).

Em relação aos CGP/C-, as contagens, no ágar bile-esculina, variaram 2,2 ciclos log, de  $3,71 \times 10^5$  nos afluentes para  $1,57 \times 10^4$  UFC/mL nos efluentes finais (95,76% de redução,  $p = 0,0001$ ). A redução das contagens de UFC entre os CGP/C- foram observados entre a carga inicial e o 15º dia ( $p = 0,0008$ ) e entre o 30º e 60º dias de digestão anaeróbia ( $p = 0,0495$ ).

Os bastonetes Gram-negativos também mostraram uma boa taxa de redução no meio eosina azul de metileno, com a redução média de 3 ciclos log. Os ENT variaram de  $4,42 \times 10^8$  a  $1,45 \times 10^5$  UFC/mL, enquanto BGN NF variaram entre  $5,43 \times 10^8$  e  $9,44 \times 10^5$  UFC/mL, com a redução média de 99,96% ( $p = 1,1 \times 10^{-11}$ ) e 99,82% ( $p = 1,8 \times 10^{-8}$ ), respectivamente. A partir da carga inicial, as diminuição das contagens bacterianas, considerando os grupos microbianos (ENT e BGN NF), foram observadas apenas no 15º dia de digestão anaeróbia ( $p = 2,5 \times 10^{-12}$  e  $p = 8,8 \times 10^{-9}$ , respectivamente). Após o 15º dia até os efluentes finais não foram observadas mais reduções significativas (ENT:  $p = 0,166$ , e BGN NF:  $p = 0,152$ ). Em geral, as taxas de redução entre os grupos de microrganismos a partir de amostras de afluente foram significativamente diferentes das amostras dos efluentes ( $p = 0,029$ ).

Em relação à distribuição e identificação específica, os dados das tabelas 7 e 8 representam a diversidade bacteriana (afluente e efluente) representada na amostragem recuperada no sistema de biodigestão avaliado em ambas as estações. Seiscentos e sessenta ( $n = 660$ ) isolados bacterianas foram recuperadas, sendo 67 no afluente e 593 nos efluentes. Linhagens representativas de CGP (estafilococos, enterococos e estreptococos) foram as mais frequentes tanto nos afluentes ( $n = 33$ , 49,25%) quanto nos efluentes ( $n = 353$ , 59,53%), seguidos dos Gram-negativos, ENT nos afluentes ( $n = 28$ , 41,79%) e efluentes ( $n = 176$ , 29,68%) e BGN NF nos afluente ( $n = 6$ , 8,96%) e efluentes ( $n = 57$ , 9,61%). De acordo com a análise de variância, não foi observada diferença significativa entre os pontos amostrados

(afluente e efluente), avaliando as variações nos mesmos grupos bacterianos ( $p = 0,093$ ). Tal resultado não era inesperado, posto que, para os experimentos de isolamento e identificação, as amostras foram homogeneizadas e escolhidas cinco colônias de cada placa.

**Tabela 7.** Espécies bacterianas recuperadas de amostras dos afluentes obtidas de biodigestores alimentados com dejetos bovinos operados a temperatura ambiente durante duas estações (verão e inverno).

Grupo Bacteriano (n) e frequência de identificação das espécies (%)		
Gram-positivos	Gram-negativos	
CGP (n = 33)	ENT (n = 28)	BGN NF (n = 6)
<i>Enterococcus hirae</i> (15,1)	<i>Escherichia coli</i> (82,1)	<i>Ralstonia pickettii</i> (50,0)
<i>Enterococcus faecium</i> (12,1)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (7,1)	<i>Alcaligenes faecalis</i> (33,3)
<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i> (12,1)	<i>Enterobacter sakazakii</i> (7,1)	<i>Burkholderia cepacia</i> (16,6)
<i>Kytococcus sedentarius</i> (12,1)	<i>Salmonella choleraesuis</i> spp. (3,5)	
<i>Staphylococcus capitis</i> (9,0)		
<i>Staphylococcus xylosus</i> (9,0)		
<i>Aerococcus viridans</i> (6,0)		
<i>Enterococcus avium</i> (6,0)		
<i>Enterococcus faecalis</i> (6,0)		
<i>Leuconostoc citreum</i> (3,0)		
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (3,0)		
<i>Micrococcus</i> sp. (3,0)		

CGP: Cocos Gram-positivos; ENT: Bacilos Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae*; BGN NF: Bacilos Gram-negativos não-fermentadores

A identificação microbiana das amostras do afluente é mostrada na Tabela 7. Dos 33 CGP, foram identificadas 12 espécies diferentes, 36,36% CGP/C+ e 63,64% CGP/C-. Os mais prevalentes foram *Enterococcus hirae* (15,15%), *Enterococcus faecium* (12,12%), *Enterococcus casseliflavus/gallinarum* (12,12%) e *Kytococcus sedentarius* (12,12%). Dos 34 bastonetes Gram-negativos, 82,35% foram ENT e 17,65% foram BGN NF. Para ENT, as espécies mais prevalentes foram *Escherichia coli* (82,14%) e entre os BFN NF, as espécies mais prevalentes foram *Ralstonia pickettii* (50,00%) e *Alcaligenes faecalis* (33,33%).

**Tabela 8.** Espécies bacterianas recuperadas de amostras dos efluentes obtidas de biodigestores alimentados com dejetos bovinos operados a temperatura ambiente durante duas estações (verão e inverno).

Grupo Bacteriano (n) e frequência de identificação das espécies (%)			
Gram-positivos		Gram-negativos	
CGP (n = 353)	ENT (n = 176)	BGN NF (n = 57)	Outros BGN (n = 7)
<i>Enterococcus faecium</i> (15,0)	<i>Escherichia coli</i> (82,9)	<i>Alcaligenes faecalis</i> (17,5)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (100,0)
<i>Enterococcus hirae</i> (12,1)	<i>Morganella morganii</i> (6,8)	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (17,5)	
<i>Streptococcus bovis</i> (7,6)	<i>Citrobacter freundii</i> (2,8)	<i>Ralstonia pickettii</i> (10,5)	
<i>Aerococcus viridans</i> (7,0)	<i>Enterobacter asburiae</i> (1,1)	<i>Burkholderia cepacia</i> (8,8)	
<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i> (6,5)	<i>Enterobacter cloacae</i> (1,1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (7,0)	
<i>Enterococcus avium</i> (6,5)	<i>Providencia stuartii</i> (1,1)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (7,0)	
<i>Staphylococcus capitis</i> (6,5)	<i>Raoultella terrigena</i> (1,1)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (3,5)	
<i>Staphylococcus xylosus</i> (4,5)	<i>Serratia marcescens</i> (1,1)	<i>Acinetobacter junii</i> (3,5)	
<i>Kytococcus sedentarius</i> (4,2)	<i>Pantoe spp.</i> (0,5)	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (3,5)	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (3,6)	<i>Providencia alcalifaciens</i> (0,5)	<i>Pseudomonas putida</i> (3,5)	
<i>Enterococcus faecalis</i> (3,1)	<i>Salmonella choleraesuis</i> (0,5)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (3,5)	
<i>Streptococcus equinus</i> (2,5)		<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (1,7)	
<i>Streptococcus salivarius</i> (2,5)		<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (1,7)	
<i>Micrococcus luteus</i> (2,2)		<i>Alcaligenes piechaudii</i> (1,7)	
<i>Enterococcus durans</i> (1,9)		<i>Moraxella osloensis</i> (1,7)	
<i>Staphylococcus lentus</i> (1,7)		<i>Ochrobactrum anthropi</i> (1,7)	
<i>Enterococcus raffinosus</i> (1,4)		<i>Pseudomonas fluorescens</i> (1,7)	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (1,4)		<i>Pseudomonas luteola</i> (1,7)	
<i>Staphylococcus auricularis</i> (1,4)		<i>Wautersia paucula</i> (1,75)	
<i>Streptococcus criceti</i> (1,4)			
<i>Streptococcus vestibularis</i> (1,4)			
<i>Aerococcus urinae</i> (1,1)			
<i>Staphylococcus hominis</i> (1,1)			
<i>Streptococcus uberis</i> (1,1)			
<i>Leuconostoc citreum</i> (0,8)			
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (0,8)			
<i>Lactococcus lactis</i> (0,5)			
<i>Kocuria varians/rosea</i> (0,2)			

CGP: Cocos Gram-positivos; ENT: Bacilos Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae*; BGN NF: Bacilos Gram-negativos não-fermentadores; BGN: Bacilos Gram-negativos

A identificação das amostras dos efluentes é resumida na Tabela 8. Os CGP foram os mais observados, com 28 espécies identificadas, sendo 25,21% CGP/C+ e 74,78% CGP/C-. Os mais prevalentes foram *Enterococcus faecium* (15,01%), *Enterococcus hirae* (12,18%) e *Streptococcus bovis* (7,65%). De forma semelhante ao que foi encontrado nas amostras dos afluentes, *Escherichia coli* (82,95%) foi o mais prevalente entre ENT, seguido por *Morganella morganii* (6,81%) e *Citrobacter freundii* (2,84%). Para BGN NF, foram observadas 19 espécies diferentes, sendo *Alcaligenes faecalis* (17,58%) e *Pseudomonas alcaligenes* (17,58%) as mais identificadas.

O perfil de susceptibilidade às drogas antimicrobianas das linhagens bacterianas foi plotado em função dos quatro diferentes grupos amostrados (CGP/C+, CGP/C-, ENT e BGN NF) recuperadas nas amostras dos afluentes e efluentes em ambas as estações, como pode ser observado nas tabelas 9 e 10. Os Apêndices C – J mostram o perfil de suscetibilidade de todos os isolados diante dos diversos grupos de antimicrobianos testados.

Dos 660 isolados, 239 linhagens (36,21%) eram resistentes a pelo menos um dos agentes antimicrobianos testados. Considerando os CGP/C+ nas amostras dos afluentes, a maior frequência de resistência foi a penicilina (83,33%). Níveis de resistência antimicrobiana superior a 8,00% foram observadas contra rifamicina, eritromicina e levofloxacino. Em contraste, vancomicina, ampicilina-sulbactam, oxacilina e sulfametoxazol-trimetropim foram os antimicrobianos mais eficazes, com taxas de sensibilidade de 100,00%. Em relação aos CGP/C-, 9,52% foram resistentes à penicilina. Importantes percentuais de resistência intermediária entre os CGP/C- foram observados contra rifamicina (9,52%) e eritromicina (14,28%).

Ainda entre as amostras dos afluentes, ao considerar os ENT, a maior taxa de resistência foi contra a ampicilina (21,42% de resistência e 14,28% de resistência intermediária). A resistência também foi observada contra a ampicilina-sulbactam, gentamicina e sulfametoxazol-trimetropim (> 10%). Meropenem, levofloxacino e cefepime foram as drogas mais efetivas, com nenhuma resistência antimicrobiana detectada. Entre os BGN NF recuperados dos afluentes, nenhuma resistência foi observada.

**Tabela 9.** Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de linhagens bacterianas recuperadas das amostras dos afluentes obtidas de biodigestores alimentados com dejetos bovinos operados a temperatura ambiente durante duas estações (verão e inverno).

Microrganismos (n) e antimicrobianos testados	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)			Padrões de susceptibilidade antimicrobiana (%) <sup>a</sup>			
	CIM <sub>50%</sub>	CIM <sub>90%</sub>	Varição	S	I	R	
CGP/C+ <sup>b</sup>	Rifamicina	0,06	0,24	0,06 - 8,00	83,34	8,33	8,33
	Vancomicina	0,24	1,00	0,12 - 2,00	100,00	-	-
	Ampicilina/Sulbactam	0,24	0,50	0,06 - 4,00	100,00	-	-
	Penicilina	0,50	2,00	0,06 - 16,00	16,67	-	83,33
	Eritromicina	0,24	0,50	0,06 - 16,00	75,01	16,66	8,33
	Oxacilina	0,24	0,24	0,06 - 0,24	100,00	-	-
	Levofloxacino	0,50	8,00	0,50 - 16,00	50,01	16,66	33,33
	Sulfametoxazol/Trimetropim	0,30	2,40	0,30 - 19,00	100,00	-	-
CGP/C- <sup>c</sup>	Rifamicina	1,00	1,00	0,06 - 2,00	90,48	9,52	-
	Vancomicina	2,00	2,00	0,06 - 4,00	100,00	-	-
	Penicilina	0,25	1,00	0,06 - 32,00	90,48	-	9,52
	Eritromicina	0,06	1,00	0,06 - 16,00	80,96	14,28	4,76
	Levofloxacino	1,00	2,00	0,24 - 2,00	100,00	-	-
ENT <sup>d</sup>	Meropenen	0,06	0,06	0,06 - 1,00	100,00	-	-
	Gentamicina	1,00	64,00	0,25 - 128,00	82,15	-	17,85
	Amicacina	2,00	4,00	1,00 - 32,00	96,43	3,57	-
	Levofloxacino	0,06	0,24	0,06 - 1,00	100,00	-	-
	Sulfametoxazol/Trimetropim	0,06	76,00	0,03 - 76,00	82,15	-	17,85
	Cefepime	0,06	0,12	0,06 - 1,00	100,00	-	-
	Piperacilina/Tazobactam	2,00	4,00	1,00 - 32,00	96,43	3,57	-
	Cloranfenicol	4,00	8,00	4,00 - 32,00	96,43	-	3,57
	Ampicilina/Sulbactam	4,00	64,00	1,00 - 128,00	78,58	7,14	14,28
Ampicilina	8,00	32,00	2,00 - 512,00	64,30	14,28	21,42	
BGN NF <sup>e</sup>	Meropenen	0,25	0,25	0,06 - 0,25	100,00	-	-
	Gentamicina	0,25	0,25	0,12 - 0,25	100,00	-	-
	Amicacina	0,50	1,00	0,25 - 2,00	100,00	-	-
	Levofloxacino	0,06	0,12	0,06 - 0,12	100,00	-	-
	Sulfametoxazol/Trimetropim	2,40	4,80	0,60 - 38,00	100,00	-	-
	Cefepime	0,50	0,50	0,12 - 4,00	100,00	-	-
	Piperacilina/Tazobactam	1,00	1,00	1,00 - 8,00	100,00	-	-
	Cloranfenicol	4,00	8,00	4,00 - 8,00	100,00	-	-

<sup>a</sup>S – Sensível, I – Resistência intermediária, R – Resistente; <sup>b</sup>CGP/C+: Cocos Gram-positivos/Catalase-positivo (n = 12); <sup>c</sup>CGP/C-: Cocos Gram-positivos/Catalase-negativo (n = 21); <sup>d</sup>ENT: Bacilos Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* (n = 28); <sup>e</sup>BGN NF: Bacilos Gram-negativos não-fermentadores (n = 6).

**Tabela 10.** Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de linhagens bacterianas recuperadas das amostras dos efluentes de biodigestores alimentados com dejetos bovinos operados a temperatura ambiente durante duas estações (verão e inverno).

Microrganismos (n) e antimicrobianos testados		Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)			Padrões de susceptibilidade antimicrobiana (%) <sup>a</sup>		
		CIM <sub>50%</sub>	CIM <sub>90%</sub>	Varição	S	I	R
CGP/C+ <sup>b</sup>	Rifamicina	0,06	1,00	0,06 - 8,00	91,02	6,74	2,24
	Vancomicina	0,24	2,00	0,06 - 2,00	100,00	-	-
	Ampicilina/Sulbactam	0,24	2,00	0,06 - 16,00	98,88	1,12	-
	Penicilina	1,00	8,00	0,06 - 16,00	25,85	-	74,15
	Eritromicina	0,24	2,00	0,06 - 32,00	70,79	19,10	10,11
	Oxacilina	0,24	0,24	0,06 - 0,50	91,02	-	8,98
	Levofloxacino	2,00	64,00	0,06 - 64,00	49,45	16,85	33,70
	Sulfametoxazol/Trimetropim	2,40	9,50	0,30 - 128,00	95,51	-	4,49
CGP/C- <sup>c</sup>	Rifamicina	0,12	4,00	0,06 - 8,00	91,67	6,82	1,52
	Vancomicina	0,50	4,00	0,06 - 4,00	100,00	-	-
	Penicilina	0,25	2,00	0,06 - 32,00	97,35	-	2,65
	Eritromicina	0,06	1,00	0,06 - 16,00	85,23	12,50	2,27
	Levofloxacino	1,00	2,00	0,06 - 4,00	96,59	3,41	-
ENT <sup>e</sup> outros BGN <sup>d</sup>	Meropenen	0,06	0,25	0,06 - 2,00	99,45	0,55	-
	Gentamicina	1,00	1,00	0,06 - 128,00	99,45	-	0,55
	Amicacina	4,00	4,00	0,25 - 32,00	99,45	0,55	-
	Levofloxacino	0,06	0,12	0,06 - 1,00	100,00	-	-
	Sulfametoxazol/Trimetropim	0,06	4,80	0,06 - 38,00	100,00	-	-
	Cefepime	0,06	0,12	0,06 - 8,00	100,00	-	-
	Piperacilina/Tazobactam	2,00	4,00	0,06 - 32,00	99,45	0,55	-
	Cloranfenicol	4,00	8,00	0,06 - 32,00	92,90	4,37	2,73
	Ampicilina/Sulbactam	8,00	128,00	1,00 - 512,00	75,96	7,65	16,39
Ampicilina	8,00	64,00	0,06 - 1024,00	63,95	18,57	17,48	
BGN NF <sup>e</sup>	Meropenen	0,06	0,50	0,06 - 8,00	96,50	-	3,50
	Gentamicina	0,25	4,00	0,06 - 64,00	96,50	-	3,50
	Amicacina	1,00	8,00	0,12 - 128,00	96,50	-	3,50
	Levofloxacino	0,12	0,50	0,06 - 2,00	100,00	-	-
	Sulfametoxazol/Trimetropim	9,50	38,00	0,6 - 304,00	91,33	-	8,77
	Cefepime	0,50	4,00	0,06 - 64,00	96,50	-	3,50
	Piperacilina/Tazobactam	1,00	4,00	0,06 - 256,00	98,25	-	1,75
Cloranfenicol	4,00	32	0,06 - 32,00	73,69	7,01	19,29	

<sup>a</sup>S – Sensível, I – Resistência intermediária, R – Resistente; <sup>b</sup>CGP/C+: Cocos Gram-positivos/Catalase-positivo (n = 89); <sup>c</sup>CGP/C-: Cocos Gram-positivos/Catalase-negativo (n = 264); <sup>d</sup>ENT: Bacilos Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* (n = 176) e outros BGN (n = 7); <sup>e</sup>BGN NF: Bacilos Gram-negativos não-fermentadores (n = 57).

Em relação às bactérias isoladas a partir das amostras dos efluentes (Tabela 10), entre os oito antibióticos testados para os CGP/C+, vancomicina foi a única droga 100,00% eficiente. A penicilina foi a droga menos eficaz (74,15% de resistência), seguido por levofloxacino (33,70% de resistência) e eritromicina

(10,11% de resistência). Entre os CGP/C- foram observadas baixas taxas de resistência contra rifamicina, penicilina e eritromicina. Considerando os BGN, as linhagens ENT resistentes foram apenas contra ampicilina e ampicilina-sulbactam (> 10%), enquanto as linhagens de BGN NF, a resistência antimicrobiana foi observada contra quase todos os fármacos testados, especialmente cloranfenicol (19,29% de resistência). A exceção foi para levofloxacino, para o qual não foi observada nenhuma resistência.

O índice de múltipla resistência a antibióticos (MAR) é apresentado na Tabela 11. De acordo com este critério, 55,65% das bactérias isoladas apresentaram perfil de multirresistência (MAR > 0,2).

**Tabela 11.** Frequência de bactérias multirresistentes a antimicrobianos e índice de múltipla resistência (MAR) entre os grupos de microrganismos isolados de amostras do afluente e efluente de biodigestores alimentados com dejetos bovinos operados a temperatura ambiente durante duas estações (verão e inverno).

Amostras	Grupo Microbiano	Frequência de resistência(%)	MAR (frequência de determinação%)		
			<0.2	>0.2	Varição
Afluente	CGP/C+ <sup>a</sup>	83,33	50,00	33,33	0,12 - 0,50
	CGP/C- <sup>b</sup>	28,57	23,81	4,76	0,12 - 0,25
	ENT <sup>c</sup>	50,00	21,43	28,57	0,10 - 0,50
	BGN NF <sup>d</sup>	0	0	0	0
Efluente	CGP/C+	88,76	25,84	62,92	0,12 - 0,62
	CGP/C-	17,42	14,77	2,65	0,12 - 0,37
	ENT e outros BGN <sup>e</sup>	37,15	10,92	26,23	0,10 - 0,30
	BGN NF	29,83	15,79	14,04	0,12 - 0,62

<sup>a</sup>CGP/C+: Cocos Gram-positivos/Catalase-positivo; <sup>b</sup>CGP/C-: Cocos Gram-positivos/Catalase-negativo; <sup>c</sup>ENT: Bacilos Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae*; <sup>d</sup>BGN NF: Bacilos Gram-negativos não-fermentadores; <sup>e</sup>BGN: Bacilos Gram-negativos.

Com relação aos CGP/C+, o índice variou de 0,12 -0,50 e 0,12 - 0,62 nos isolados recuperados do afluente e do efluente, respectivamente. Ainda entre os CGP/C+, 33,33% dos isolados oriundos do afluente apresentaram MAR > 0,2, enquanto os isolados dos efluentes, 62,92% apresentaram MAR > 0,2. Quanto aos CGP/C-, 4,76% dos isolados do afluente apresentaram MAR > 0,2, e entre os dos efluentes, 2,65% das bactérias isoladas exibiram MAR > 0,2.

No que diz respeito às linhagens ENT isoladas a partir das amostras do afluente, 28,57% apresentaram MAR > 0,2, enquanto os ENT e outros BGN isolados das amostras dos efluentes, 26,23% apresentaram MAR > 0,2. Finalmente, entre os BGN NF apenas as linhagens isoladas das amostras dos efluentes apresentaram múltipla resistência (14,04%).

A inativação de patógenos, como os enterococos, enterobactérias e BGN NF oportunistas, como *Pseudomonas* spp. e o estudo da ocorrência de resistência antimicrobiana justifica a relevância microbiológica de lidar corretamente com efluentes de digestão anaeróbia. Por outro lado, o estudo da ocorrência de resistência antimicrobiana em microrganismos putativos pode ser útil na monitorização e na compreensão do processo de resistência antimicrobiana tanto em humanos, animais e na área de saúde ambiental (HOLM-NIELSEN; AL SEADI; OLESKOWICZ-POPIEL, 2009; VENGLOVSKY et al., 2009; COSTA, LOUREIRO e MATOS, 2013).

A densidade de BGN e enterococos observados nos esterco bovinos (afluente) foi comparável aos valores reportados anteriormente, que indicaram  $10^5$ - $10^8$  organismos por grama de fezes (THURSTON-ENRIQUEZ, GILLEY e EGHBALL, 2005; WALCZAK e XU, 2011; DUNGAN, KLEIN e LEYTEM, 2012). Após o período de fermentação (30 - 60 dias), em ambas as estações ocorreram uma redução das contagens de todos os grupos de bactérias analisados nos efluentes. A taxa de decaimento de bactérias viáveis é dependente de muitos fatores, mas principalmente, as características das diferentes espécies bacterianas, temperatura e do tempo de retenção durante a digestão anaeróbia (SMITH et al., 2005; PANDEY e SOUPIR, 2011). Estes dados indicaram que um processo de digestão estável estava ocorrendo e que os biodigestores estavam atingindo um desempenho semelhante ao alcançado pelos digestores de grande escala. Além disso, os resultados apresentados estão de acordo com Saunders et al. (2012), que relataram aumento nas taxas de inativação de bactérias indicadoras, como *E. coli* e coliformes fecais, em digestores anaeróbios alimentados com dejetos de bovinos leiteiros.

Enterococos e *Enterobacteriaceae* foram os microrganismos mais identificados em todas as amostras. Trata-se de microrganismos ubíquos e oportunistas. Além disso, eles ocorrem naturalmente no intestino de humanos e animais e são reconhecidos por serem capazes de sobreviver e se multiplicar mesmo em situação de estresse e/ou em ambientes hostis, devido a tolerância a



vários fatores, como a mudança de temperatura e pH (FISHER e PHILLIPS, 2009; COSTA et al., 2013). De acordo com estudos anteriores, as populações de enterococos e *Enterobacteriaceae* são predominantes em digestores operados a temperaturas mesófilas utilizando esterco bovino como substrato (BAGGE, SAHLSTRÖM e ALBIHN, 2005; SAWANT et al., 2007). Entretanto as composições das comunidades microbianas (por exemplo, presença de estafilococos coagulase negativo ou BGN NF) podem variar devido às práticas de manejo dos dejetos, condições ambientais e dos tipos de dejetos (SAHLSTRÖM et al., 2004).

Ao considerar a utilização dos efluentes da digestão anaeróbia como biofertilizante em áreas agrícolas, é importante destacar que esses efluentes somente serão adequados e/ou aceitos se a segurança sanitária for garantida de forma satisfatória. Quanto a presença de agentes patogênicos, a regulamentação para uso de esterco para agricultura é baseada em três princípios: (i) exigência de um tratamento, para reduzir a quantidade de patógenos, como por exemplo, a digestão anaeróbia, (ii) confirmação deste tratamento, e (iii) garantia da qualidade microbiológica desses dejetos (VENGLOVSKY et al., 2006; MARTENS e BÖHM, 2009). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a digestão anaeróbia de esterco bovino provoca uma redução de vários agentes patogênicos. Contudo, outro aspecto que deve ser observado para utilização desse tipo de efluentes é a persistência de bactérias resistentes. Entretanto, poucos estudos têm relatado a prevalência de resistência aos antimicrobianos entre bactérias isoladas de efluentes de digestores anaeróbios (ABDUL e LLOYD, 1985; BENERAGAMA et al., 2011, 2013)

Como mostrado na Tabela 9, uma importante proporção de linhagens de bactérias isoladas de amostras do afluente exibiu resistência a diferentes antibióticos, e praticamente o mesmo padrão de resistência foi detectado nos isolados dos efluentes (Tabela 10). Estes dados mostraram vários padrões de resistência, tanto em bactérias comensais como patogênicas, que podem se disseminar pelo ambiente e possivelmente, contribuir com a propagação da resistência a antibióticos utilizados na terapia humana (WALSH et al., 2012).

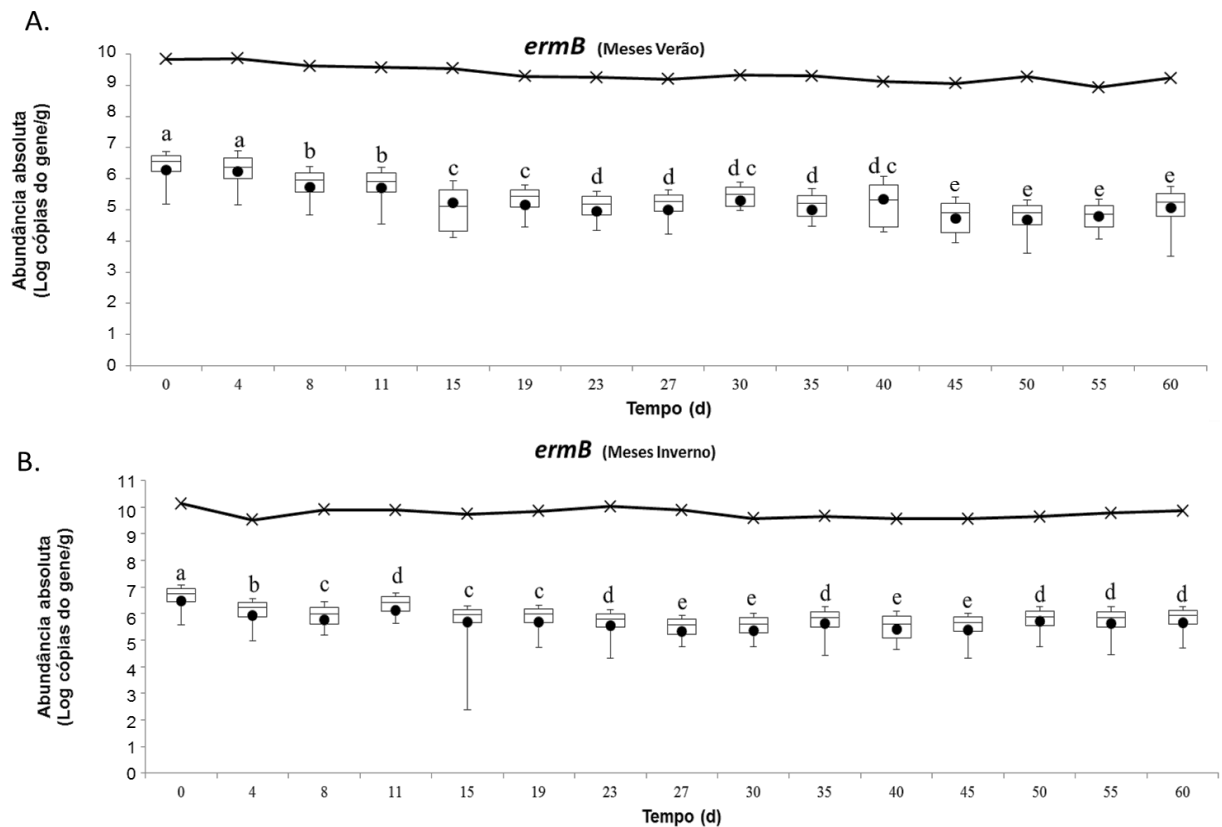
O índice MAR é amplamente usado para se referir a bactérias resistentes a múltiplas drogas em diversos ambientes. A alta frequência de MAR > 0,2 entre as bactérias isoladas nas amostras indica que os efluentes dos biodigestores podem atuar como disseminador de genes de resistência. O risco de disseminação pode

tornar-se mais acentuado quando a presença da resistência é correlacionada com a existência de linhagens patogênicas, como as isoladas neste estudo (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas* spp.). Provavelmente, a abundância dessas bactérias multirresistentes reflete uma resposta adaptativa microbiana para o uso empírico de diferentes antimicrobianos nas fazendas (COSTA et al., 2013). Além disso, um estudo mostrou que estas linhagens são extremamente proficientes na transferência de genes de resistência e que estas espécies sobreviveram por até um mês após a aplicação no solo (NICHOLSON et al., 2005).

#### 4.2. DINÂMICA DE GENES DE RESISTÊNCIA DURANTE O PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA

A fim de determinar a dinâmica dos genes de resistência no processo de digestão anaeróbia, amostras dos afluentes e efluentes foram analisadas durante 60 dias de fermentação e em duas estações diferentes (verão e inverno). Para cada uma das amostras durante o processo de digestão anaeróbia, o número de cópias do gene *ermB*, *aphA2* e *bla<sub>TEM-1</sub>* por grama de afluente e efluente foi realizada a partir da média dos dois biodigestores operados durante cada estação. A eficiência de remoção das cópias de genes de resistência foi avaliada considerando valores do afluente (carregamento inicial) e do efluente (dia 60). Quando os genes de resistência foram normalizados para o número de bactérias totais 16S rRNA de cada amostra os índices de redução foram semelhantes. Desta forma, os gráficos foram apresentados com os valores absolutos dos números de cópias dos genes de resistência e bactérias totais para cada ponto a fim de avaliar a dinâmica durante o processo.

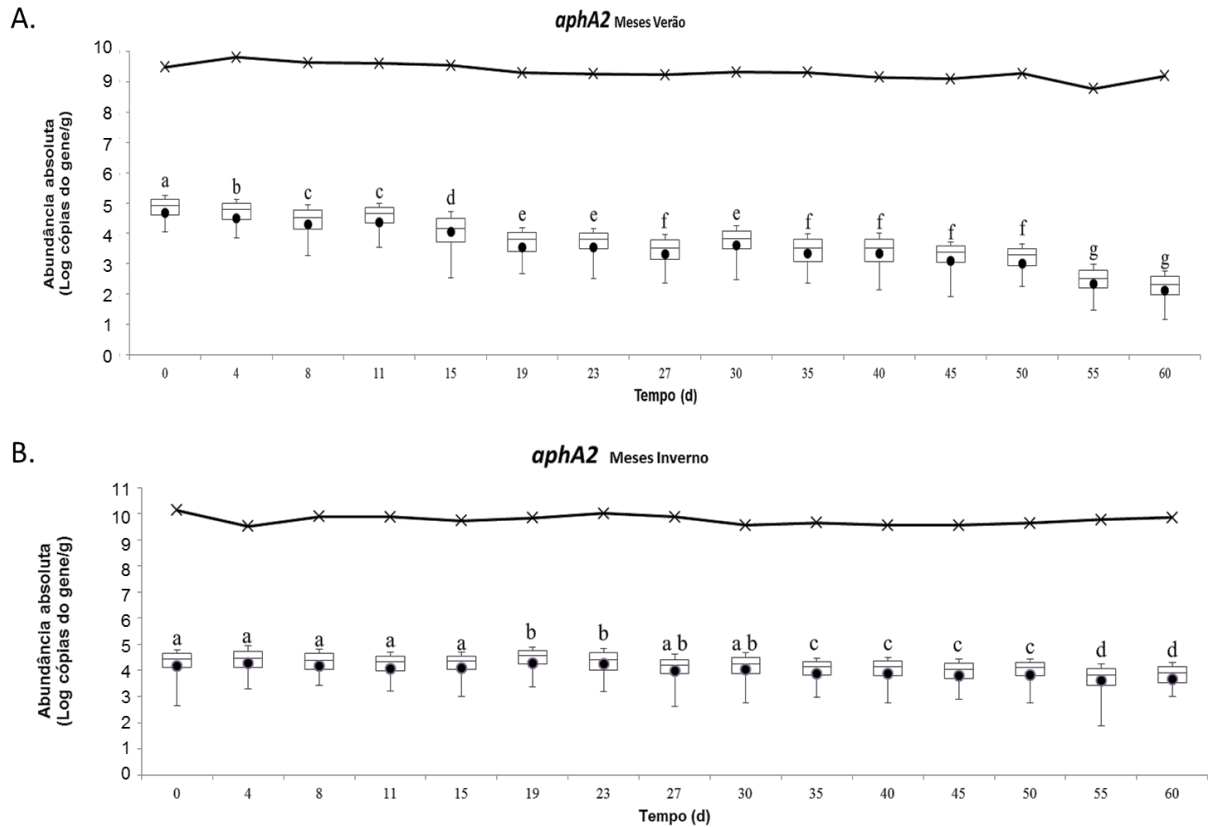
A dinâmica do gene exibiu um padrão semelhante em ambas às estações, com redução do número de cópias em relação ao tempo de fermentação. Durante o processo de biodigestão nos meses de verão e inverno, a abundância de *ermB* foi de 1 ciclo log a menos nos efluentes finais (após 60 dias de fermentação) do que nos afluentes (amostras do carregamento inicial). 93,9% dos números de cópias do gene *ermB* foram reduzidos no processo anaeróbio no verão e 84,0% nos meses de inverno (Figura 14).



**Figura 14.** Abundância absoluta do gene *ermB* durante a digestão anaeróbia nos meses de verão (A) e de inverno (B). Todos os dados são expressos como  $\log_{10}$  cópias de *ermB* por grama de amostras dos afluentes ou efluentes. Barra de erros indicam valores máximos e mínimos ( $n = 10$ ); Limite superior da caixa indica o percentil de 75% dos dados e o inferior indica o percentil de 25%, e as linhas horizontais dentro das caixas indicam os valores medianos. Letras diferentes mostram diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Símbolos (•) indicam valores médios da quantificação de *ermB* e (x) significa valores médios da quantificação de bactérias totais (16S rRNA).

Com relação ao número de cópias do gene *aphA2*, a quantificação nas diferentes amostras do processo de digestão anaeróbia em ambas as estações são comparados na Figura 15. A abundância do número de cópias do gene *aphA2* nas amostras dos afluentes também não variou entre as diferentes estações (cerca de  $10^4$ ). Durante o processo de biodigestão nos meses de inverno, a abundância absoluta do gene *aphA2* não diminuiu significativamente durante os primeiros 30 dias de fermentação, e a redução após este período foi menor do que o observado para os meses de verão. Nas amostras finais (dia 60), as concentrações foram aproximadamente de  $10^2$  e  $10^3$  cópias do gene nos processos avaliados no verão e no inverno, respectivamente. Nos ensaios de biodigestão durante os meses de

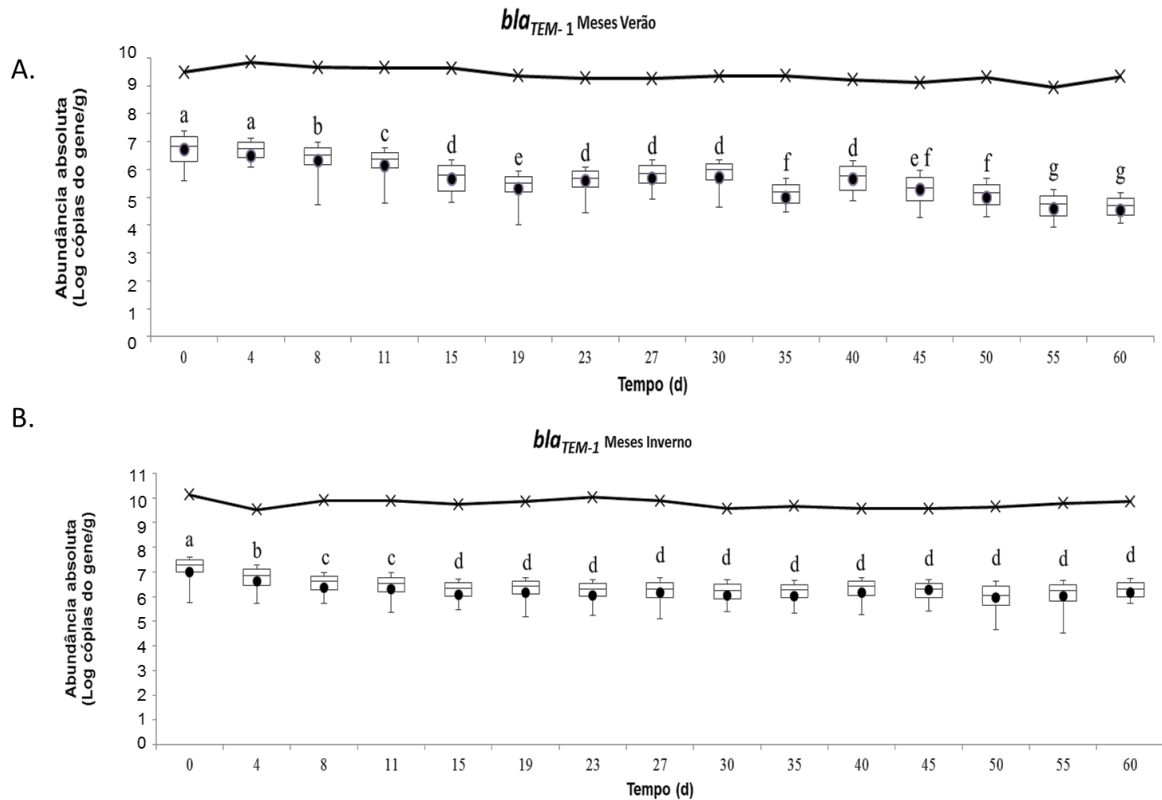
inverno a taxa de remoção foi de 1 ciclo log, enquanto nos meses de verão a redução foi próxima de 2,2 ciclos log.



**Figura 15.** Abundância absoluta do gene *aphA2* durante a digestão anaeróbia nos meses de verão (A) e de inverno (B). Todos os dados são expressos como  $\log_{10}$  cópias de *aphA2* por grama de amostras dos afluentes ou efluentes. Barra de erros indicam valores máximos e mínimos ( $n = 10$ ); Limite superior da caixa indica o percentil de 75% dos dados e o inferior indica o percentil de 25%, e as linhas horizontais dentro das caixas indicam os valores medianos. Letras diferentes mostram diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Símbolos (●) indicam valores médios da quantificação de *aphA2* e (x) significa valores médios da quantificação de bactérias totais (16S rRNA).

Para a comparação da dinâmica do número de cópias do gene *bla<sub>TEM-1</sub>*, a quantificação nas diferentes amostras do processo de digestão anaeróbia em ambas as estações são mostradas na Figura 16. Nas amostras do carregamento inicial (afluente), comparadas com os outros genes avaliados, *bla<sub>TEM-1</sub>* foi o mais abundante com quase  $10^7$  cópias do gene por grama de afluente. Durante os ensaios de biodigestão nos meses de verão, elevadas quantidades de *bla<sub>TEM-1</sub>* persistiram durante 15 dias. Possivelmente em resposta ao processo de digestão anaeróbia, houve redução para cerca de  $10^4$  cópias do gene no dia 60 (2,2 ciclos log de

redução). O mesmo ocorreu para os meses de inverno, quando se observou diminuição na quantificação de *bla*<sub>TEM-1</sub> durante o processo de fermentação, o que resultou em cerca de 10<sup>4</sup> cópias do gene no dia 60 (redução de 0,84 ciclo log).



**Figura 16.** Abundância absoluta do gene *bla*<sub>TEM-1</sub> durante a digestão anaeróbica nos meses de verão (A) e de inverno (B). Todos os dados são expressos como log<sub>10</sub> cópias de *bla*<sub>TEM-1</sub> por grama de amostras dos afluentes ou efluentes. Barra de erros indicam valores máximos e mínimos (n = 10); Limite superior da caixa indica o percentil de 75% dos dados e o inferior indica o percentil de 25%, e as linhas horizontais dentro das caixas indicam os valores medianos. Letras diferentes mostram diferença estatística (p < 0,05). Símbolos (●) indicam valores médios da quantificação de *bla*<sub>TEM-1</sub> e (x) significa valores médios da quantificação de bactérias totais (16S rRNA).

Correlações entre os diferentes genes de resistência (*ermB*, *aphA2* e *bla*<sub>TEM-1</sub>) foram estudadas por meio do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson em relação a todas as amostras dos afluentes e efluentes avaliados (Tabela 12). O número de cópias de todos os genes de resistência foi normalizado em relação ao número de bactérias totais (16S rRNA) quantificadas em cada ponto para minimizar a variação causada pelas diferenças de abundâncias bacterianas. O coeficiente de correlação positivo entre os genes de resistência indica alterações na abundância na

mesma direção, enquanto um coeficiente de correlação negativo indica o contrário (WANG et al., 2012).

Entre as correlações calculadas (Tabela 12), foi possível observar que todos os genes de resistência foram positivamente correlacionados em ambas as estações. As correlações mais fortes foram observadas entre *aphA2* e *bla<sub>TEM-1</sub>* nos meses de verão (0,960) e a mais fraca foi entre *aphA2* e *ermB* nos meses de inverno (0,495).

**Tabela 12.** Coeficiente de correlação de Pearson entre a abundância relativa dos diferentes genes de resistência (Abundância absoluta dos genes de resistência/abundância absoluta dos gene 16S rRNA) em todas as amostras de digestão anaeróbia avaliados.

	<i>ermB</i>	<i>aphA2</i>	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>
<i>ermB</i>	1	0,495 <sup>a</sup>	0,803 <sup>a</sup>
<i>aphA2</i>	0,803 <sup>b</sup>	1	0,720 <sup>a</sup>
<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	0,812 <sup>b</sup>	0,960 <sup>b</sup>	1

<sup>a</sup> Matriz triangular superior direita se baseia na abundância relativa das amostras do processo de digestão anaeróbia dos meses de inverno.

<sup>b</sup> Matriz triangular inferior esquerda se baseia na abundância relativa das amostras do processo de digestão anaeróbia dos meses de verão.

A análise da ocorrência e abundância dos genes de resistência mostrou que *ermB*, *aphA2* e *bla<sub>TEM-1</sub>* estavam presentes nas amostras tanto dos afluentes como dos efluentes do processo de digestão anaeróbia. O gene *ermB* confere resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas, e tem sido detectado em ambientes de bovinos (CHEN et al., 2007; NEGREANU et al., 2012). Estudos anteriores também observaram a ocorrência de *bla<sub>TEM-1</sub>* e *aphA2* em bactérias intestinais e ambientais (SHI et al., 2013). Todos esses genes têm sido citados como sendo altamente transferíveis, devido a sua capacidade de transferência entre as bactérias Gram-negativas e positivas (ROBERTS, 2004; LACHMAYR et al., 2009).

Comparativamente, os genes mostraram diferentes quantidades iniciais, sendo que *bla<sub>TEM-1</sub>* e *ermB* apresentaram maior abundância nas amostras do afluente. Estes resultados corroboram com trabalhos anteriores que mostraram que a resistência a estes antibióticos é disseminada e realça a persistência de pressão seletiva nos dejetos, mesmo que no manejo animal nunca se tenha utilizado antibióticos (ALEXANDER et al., 2008; HAENNI et al., 2011; HEUER, SCHMITT e

SMALLA, 2011; MUNIR, WONG e XAGORARAKI, 2011)). A disseminação de genes que codificam resistência para a microbiota de ruminantes e bactérias de dejetos é potencialmente relevante. Com a transferência dos genes determinantes de resistência, estes organismos, se bem adaptados para sobreviver, podem potencialmente servir como um reservatório de longo prazo da resistência a antibióticos (GHOSH e LAPARA, 2007).

Os nossos resultados mostram claramente que o processo de digestão anaeróbia a temperatura ambiente foi eficaz na redução do número de cópias dos genes de resistência avaliados. Uma análise mais detalhada da dinâmica dos genes mostrou que os genes foram reduzidos a diferentes valores de maneira irregular em cada processo de biodigestão. Assim, a abundância e a remoção do número de cópias dos genes variaram ao longo do processo de fermentação provavelmente por fatores temporais (tempo de fermentação) e sazonais (verão e inverno). Tais diferenças podem ser resultado das diferenças na capacidade de sobrevivência das bactérias hospedeiras (WANG et al., 2012).

Poucos estudos têm sido conduzidos para avaliar quantitativamente os efeitos da digestão anaeróbia a temperatura ambiente sobre os genes de resistência em esterco bovino. No entanto, Sahlström (2003) revelou que a temperatura e tempo de retenção são parâmetros críticos para sobrevivência de bactérias durante a digestão anaeróbia de dejetos. Entretanto não somente estas hipóteses devem ser observadas, variação do substrato, mudança da comunidade microbiana ou mesmo fatores relacionados ao carregamento de substâncias inibitórias podem estar estreitamente relacionados a variação do número de cópias dos genes de resistência. Além disso, ressalta-se que as contagens de bactérias totais se mantiveram praticamente estáveis durante todo o tempo de fermentação. Como tal, a redução dos genes de resistência nas duas estações não se refere à diminuição do número total das bactérias.

Outro resultado que mostrou que o tempo de operação do sistema e a temperatura podem afetar a resistência foi a análise das correlações dos genes. Estes resultados mostraram sempre uma correlação positiva entre a abundância relativa de cada gene nas diferentes estações do ano. Desta maneira, o processo de digestão anaeróbia a temperatura ambiente teve implicações distintas para os diferentes genes de resistência e a natureza específica dessas relações, como por exemplo, uso mais severo de antibióticos numa determinada época do ano ou

mesmo dosagens preventivas sazonais, precisam ser mais bem avaliadas em outros estudos (NÖLVAK et al., 2013).

#### 4.3. PREVALÊNCIA DE SEQUÊNCIAS DE BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS

A fim de investigar a persistência de espécies bacterianas potencialmente patogênicas nos efluentes de biodigestão anaeróbia pela avaliação dos dados gerados a partir do pirosequenciamento do metagenoma, um banco de dados foi criado com 30 sequências 16S rRNA de bactérias clinicamente relevantes.

As sequências que estavam dentro de uma similaridade de 97% com os dados deste banco de dados foram quantificadas e classificadas como potenciais agentes patogênicos (Tabela 13).

**Tabela 13.** Porcentagem de sequências similares a sequência 16S rRNA de bactérias clinicamente relevantes nos efluentes finais da digestão anaeróbia amostrados durante os meses de verão e de inverno.

Espécies	% total			
	S60a	S60b	W60a	W60b
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	0,19	0,02	1,72	0,61
<i>Burkholderia cepacia</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus anthracis</i> str. H9401	0,15	0,02	0,22	0,41
<i>Bacteroides fragilis</i> 638R	ND	ND	0,02	ND
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	ND	ND	ND	ND
<i>Clostridium botulinum</i> NCTC 2916	ND	ND	0,02	ND
<i>Clostridium difficile</i> CD196	0,17	0,30	0,13	0,64
<i>Clostridium perfringens</i>	0,04	0,02	0,02	0,03
<i>Clostridium tetani</i> E88	ND	ND	ND	ND
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> HC01	0,04	0,07	0,09	0,47
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4200	ND	0,07	0,07	0,12
<i>Enterococcus faecium</i>	ND	0,07	0,07	0,12
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	ND	ND	ND	ND
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586	ND	ND	ND	ND
<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP	ND	ND	ND	ND
<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> HS11286	ND	0,05	ND	ND
<i>Listeria monocytogenes</i>	ND	ND	ND	ND



**Tabela 12.** continuação...

<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	ND	ND	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCGM2.S1	0,04	ND	ND	ND
<i>Neisseria meningitidis</i> M01-240149	ND	ND	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>choleraesuis</i> str.B67	ND	0,05	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A	ND	ND	ND	ND
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a	0,10	0,02	0,24	0,20
<i>Streptococcus agalactiae</i> GD201008-001	ND	0,23	ND	ND
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 700669	ND	0,23	ND	ND
<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS5005	ND	0,23	ND	ND
<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar <i>eltor</i> str. N16961	ND	ND	ND	ND
<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i>	ND	ND	ND	ND
<b>Porcentagem total</b>	0,73	1,38	2,59	2,60
<b>Total de sequências</b>	5183	4338	4594	3416

ND: Não detectado

Entre o número total de sequências obtidas para as diferentes amostras, apenas cerca de 0,73 - 1,38% representam a quantidade de patógenos potencialmente patogênicos provenientes das sequências obtidas do final do processo de fermentação realizado no verão (S60a e S60b) e 2,59 - 2,60% representam a abundância de patógenos oriundos do processo durante os meses de inverno (W60a e W60b).

Das 30 sequências escolhidas, apenas 16 diferentes patógenos foram identificados por similaridade. *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringens* sp. foram os mais comuns e estavam presentes em todas as quatro amostras. Provavelmente, a presença acentuada destes microrganismos se deve pelo fato de serem bactérias ubíquas. Resultados semelhantes foram relatados anteriormente e estes estudos mostraram que a redução destas bactérias potencialmente patogênicas é uma grande preocupação para o uso destes efluentes como biofertilizantes (WATCHARASUKARN et al., 2009; EIKMEYER et al., 2013). Vale ressaltar que os biodigestores avaliados eram continuamente alimentados com esterco bovino, deste modo, dificilmente a presença dos patógenos seria reduzida às quantidades indetectáveis.

Estes dados mostraram à persistência de bactérias clinicamente relevantes e podem ser considerados tendenciosos pela exigência da seleção de alguns grupos de potenciais patógenos, entretanto estes resultados corroboram os dados apresentados por outros estudos utilizando diferentes substratos. Bibby, Viau e Peccia (2010) utilizaram pirosequenciamento 454 com intuito de identificar as bactérias patogênicas e observaram a predominância de sequências do gênero *Clostridium* em efluentes de biodigestão de biossólido proveniente de lodo de esgoto municipal. Ye e Zhang (2011) estudando estações de tratamento de águas residuais municipais observaram que *Aeromonas veronii*, *Aeromonas hydrophila*, e *Clostridium perfringens* foram as espécies mais semelhantes às bactérias potencialmente patogênicos pesquisadas.

Todos os resultados foram semelhantes a partir de cada réplica, em ambos os biodigestores operados no verão ( $p = 0,191$ ), e nos dois operados no inverno ( $p = 0,993$ ). Além disso, não foram encontradas diferenças significativas na abundância de sequências de patógenos entre as amostras de verão e o inverno ( $p = 0,463$ ), sugerindo que independentes da estação, todos os reatores obtiveram abundância semelhante de patógenos após 60 dias de fermentação.

Quantidades maiores de sequências de patógenos foram identificadas nas amostras analisadas no inverno quando comparadas com as amostras do verão, entretanto nenhuma diferença significativa foi encontrada. Provavelmente, este resultado mostra a influência discreta da temperatura na variação da comunidade bacteriana no processo de biodigestão. Porém para uma maior discussão desta hipótese, outros estudos devem ser realizados com maior número de biodigestores. Segundo Massé, Gilbert e Topp et al. (2011), a temperatura é um fator decisivo para a diversificação e abundância de bactérias patogênicas em efluentes de biodigestores alimentados com dejetos de animais.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

A crescente busca por novas fontes alternativas para produção de energia e reciclagem de resíduos aponta para a utilização dos dejetos bovinos como opção economicamente viável dada a relevância da atividade de pecuária no Brasil. Os resíduos gerados pela pecuária são altamente poluentes e questões ambientais sobre sustentabilidade são levantadas. Neste sentido a digestão anaeróbia destes resíduos promove a reciclagem e a geração de energia. Ainda, em função da natureza das transformações biológicas durante o processo de digestão anaeróbia, o produto final tem potencialidade de uso com biofertilizante.

Do ponto de vista da produção de biogás, nosso estudo mostra que a digestão anaeróbia a temperatura ambiente, em condições tropicais, utilizando os dejetos bovinos como substrato, é uma tecnologia viável. No entanto questões sobre a sustentabilidade do processo foram relevantes, o que leva em consideração a distribuição de microrganismos potencialmente patogênicos e o seu perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas. Embora os patógenos putativos humanos e animais sejam importantes para as primeiras etapas do processo de digestão anaeróbia, devida atenção deve ser dada a sua persistência ao longo da biotransformação, sobretudo ao se destacar o uso do produto final como biofertilizante.

O uso indiscriminado de antimicrobianos na pecuária brasileira suscitam preocupações acerca da persistência de microrganismos potencialmente patogênicos e resistentes a drogas antimicrobianas, como observado neste estudo, durante a digestão anaeróbia de dejetos bovinos. Os resultados observados permitem ratificar a discussão da participação das fazendas de gado no nosso país como ecossistemas importantes no fenômeno da resistência bacteriana aos antimicrobianos, problema destacado pela Organização Mundial de Saúde, como desafio no século XXI. Acredita-se que as fazendas atuem como um importante reservatório de genes de resistência a drogas de uso clínico-humano e animal.

Como um todo, apesar dos dados apresentados nesse estudo endossarem a digestão anaeróbia de dejetos da pecuária como solução importante para reciclagem e produção de energia, levanta preocupações significativas sobre a sua sustentabilidade e riscos de caráter sanitários durante o processo. Sugere-se que

sejam realizados estudos adicionais sobre adequações físico, químicas e biológicas que possam interferir com a persistência de bactérias de relevância clínica e resistentes aos antimicrobianos. Além disso, discussões a respeito do uso de antimicrobianos em fazendas de animais e ambientes circundantes são necessárias.

## CONCLUSÕES

- Ao longo dos 60 dias de tempo de retenção hidráulica, os biodigestores em escala-piloto operados a temperatura ambiente exibiram taxas de rendimento médio e teores de metano semelhantes em ambas as estações do ano analisados.
- Os microrganismos dos domínios *Bacteria* e *Archaea* apresentam dinâmica e abundância semelhante durante os processos de biodigestão nos meses de verão e inverno.
- Apesar da estrutura da comunidade bacteriana nos estágios iniciais ou *start-up* serem diferentes durante a biodigestão anaeróbia, as comunidades progridem para o mesmo estado estacionário em ambas as estações analisadas.
- Existe uma correlação positiva entre a produção de metano e a relação *Archaea/Bacteria* durante os processos de biodigestão nos meses de verão e inverno.
- Análises de similaridade filogenética mostram a presença de pelo menos 15 filós diferentes entre os domínios *Bacteria* e *Archaea*. A maioria correspondente ao domínio *Bacteria*.
- Os filós mais representativos do domínio *Bacteria* foram *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, enquanto o domínio *Archaea*, o filo *Euryarchaeota* foi a mais proeminente.
- Durante o processo de biodigestão ocorreu a redução dos grupos ENT, BGN NF, CGP/C+ e CGP/C-, entretanto a sua persistência suscita reflexão quanto ao uso do efluente diretamente como biofertilizante.

- Entre os bastonetes Gram-negativos, *Escherichia coli* foi a mais isolada nas amostras e entre os cocos Gram-positivos, *Enterococcus sp.*, tanto dos afluentes como dos efluentes do processo de digestão anaeróbia.
- Linhagens apresentando resistência aos antimicrobianos foram recuperadas das amostras dos efluentes, o que caracteriza os resíduos do processo de biodigestão como um importante reservatório de determinantes de resistência.
- Amostras dos afluentes e efluentes durante os processos de biodigestão nos meses de verão e inverno apresentaram linhagens bacterianas com multirresistência aos antimicrobianos.
- Genes de resistência (*ermB*, *aphA2* e *bla<sub>TEM-1</sub>*) foram mensuráveis tanto dos afluentes como nos efluentes durante os processos de biodigestão nos meses de verão e inverno.
- Entre as sequências identificadas, aquelas correspondentes a *Acinetobacter baumannii* e *Clostridium sp.* foram as mais frequentes ao final do processo de digestão anaeróbia tanto dos ensaios nos meses de verão como no inverno.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, T.; TAUSEEF, S. M; ABBASI, S. A. 2012. Anaerobic digestion for global warming control and energy generation—An overview. **Renewable and sustainable energy reviews**, **16(5)**: 3228–3242.
- ABDUL, P.; LLOYD, D. 1985. The survival of antibiotic resistant and sensitive *Escherichia coli* strains during anaerobic digestion. **Applied microbiology and biotechnology**, **22**: 373 – 377.
- ABUBAKER, J.; RISBERG, K.; PELL, M. 2012. Biogas residues as fertilisers – Effects on wheat growth and soil microbial activities. **Applied energy**, **99**: 126–134.
- AHRING, B. K.; IBRAHIM, A. A.; MLADENOVSKA, Z. 2001. Effect of temperature increase from 55 to 65°C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure. **Water research**, **35(10)**: 2446–2452.
- ALEXANDER, T.; YANKE, W.; TOPP, E.; OLSON, M. E.; READ, R.R.; MORCK, D.W.; MCALLISTER, T.A. 2008. Effect of subtherapeutic administration of antibiotics on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria in feedlot cattle. **Applied and environmental microbiology**, **74**: 4405–4416.
- ALEXANDER, T. W.; YANKE, J. L.; REUTER, T.; TOPP, E.; READ, R. R.; SELINGER, B. L.; MCALLISTER, T. A. 2011. Longitudinal characterization of antimicrobial resistance genes in feces shed from cattle fed different subtherapeutic antibiotics. **BMC microbiology**, **11**: 19.
- AL-MASRI, M. R. 2001. Changes in biogas production due to different ratios of some animal and agricultural wastes. **Bioresource technology**, **77**: 97–100.
- ALTMANN, M.; WADL, M.; ALTMANN, D.; BENZLER, J.; ECKMANN, T.; KRAUSE, G.; M. AN DER HEIDEN, A. 2011. Timeliness of surveillance during outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, Germany, 2011. **Emerging infectious diseases**, **17**: 1906–1909.
- ALVAREZ, R.; VILLCA, S.; LIDÉN, G., 2006. Biogas production from llama and cow manure at high altitude. **Biomass and bioenergy**, **30 (3)**: 66-75.
- AMARAL, C. M. C.; AMARAL, L. A.; LUCAS JÚNIOR, J.; NASCIMENTO, A. A.; FERREIRA, D. D. S.; MACHADO, M. R. F. 2004. Biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros submetidos a diferentes tempos de retenção hidráulica. **Ciência rural**, **34**: 1897–1902.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 2004. **Standard Methods for the Examination of water and wastewater** (9215 Heterotrophic Plate Count). 18. ed. Washington, 2004.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1995. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19. ed. Washington, 312p.

AMINOV, R. I. 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Environmental microbiology**, **11**: 2970–2988.

AMON, T.; AMON, B.; KRYVORUCHKO, V.; ZOLLITSCH, W.; MAYER, K.; GRUBER, L. 2007. Biogas production from maize and dairy cattle manure—Influence of biomass composition on the methane yield. **Agriculture, ecosystems & environment**, **118(1)**: 173–182.

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.. 2005. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Revista de engenharia sanitária e ambiental**, **10**: 152–161.

BAGGE, E.; PERSSON, M.; JOHANSSON, K-E. 2010. Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants. **Journal of applied microbiology**, **109(5)**: 1549–1565.

BAGGE, E.; SAHLSTRÖM, L.; ALBIHN, A. 2005. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. **Water research**, **39(20)**: 4879–4886.

BAQUERO, F.; TEDIM, A. P.; COQUE, T. M. 2013. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. **Frontiers in microbiology**, **4**: 15.

BAREITHER, C.A.; WOLFE, G.L.; MCMAHON, K.D.; BENSON, C.H. 2013. Microbial diversity and dynamics during methane production from municipal solid waste. **Waste management**, **33(10)**: 1982–1992.

BARNS, S.M.; DELWICHE, C.F.; PALMER, J.D.; PACE, N.R. 1996. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. **Proceedings of the national academy of science**, **93(17)**: 9188–9193.

BENERAGAMA, N.; YUSUKE, M.; YAMASHIRO, T.; IWASAKI, M.; ADEKUNLE, L.S.; UMETSU, K. 2011. The survival of cefazolin resistant bacteria in thermophilic co-digestion of dairy manure and waste. **Journal of agricultural science and technology**, **1**: 1181–86.

BENERAGAMA, N.; IWASAKI, M.; LATEEF, S. A.; YAMASHIRO, T.; IHARA, I.; UMETSU, K. 2013. The survival of multidrug-resistant bacteria in thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion of dairy manure and waste milk. **Animal science journal**, **84(5)**: 426–433.

BENGELSDORF, F. R.; GERISCHER, U.; LANGER, S.; ZAK, M.; KAZDA, M. 2013. Stability of a biogas-producing bacterial, archaeal and fungal community degrading food residues. **FEMS microbiology ecology**, **84(1)**: 201–22.



BIBBY, K.; VIAU, E.; PECCIA, J. 2010. Pyrosequencing of the 16S rRNA gene to reveal bacterial pathogen diversity in biosolids. **Water research**, **44(14)**: 4252–4260.

BITTON, G. 2005. Wastewater microbiology. 3ª edição. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

BOE, K.; BATSTONE, D.J.; STEYER, J. P.; ANGELIDAKI, I. 2010. State indicators for monitoring the anaerobic digestion process. **Water research**, **44(20)**: 5973–80.

BRAUN, F.; HAMELIN, J.; GÉVAUDAN, G.; PATUREAU, D. 2011. Development and application of an enzymatic and cell flotation treatment for the recovery of viable microbial cells from environmental matrices such as anaerobic sludge. **Applied and environmental microbiology**, **77(24)**: 8487–8493.

BROCHIER-ARMANET, C.; BOUSSAU, B.; GRIBALDO, S.; FORTERRE, P. 2008. Mesophilic *crenarchaeota*: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*. **Nature reviews microbiology**, **6**: 245-252.

CAETANO, L. 1985. **Proposição de um sistema modificado para quantificação de biogás**. Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 75 f.

CARDINALI-REZENDE, J.; PEREIRA, Z. L.; SANZ, J. L.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. 2012. Bacterial and archaeal phylogenetic diversity associated with swine sludge from an anaerobic treatment lagoon. **World journal of microbiology & biotechnology**, **28(11)**: 3187–3195.

CARDOSO, A. M.; CLEMENTINO, M. B. M.; VIEIRA, R. P.; ALMEIDA, R. V.; ALQUERES, S. M. C. 2003. *Archaea*: Potencial Biotecnológico. **Revista biotecnológica ciência e desenvolvimento**, **30**: 71–77.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infection and immunity**, **67**: 3703–3713.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. 2000. Host-Pathogen Interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. **infection and immunity**, **68**: 6511–6518.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. 2007. Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes. **Eukaryotic cell**, **6(12)**: 2169–2174.

CHACHKHIANI, M.; DABERT, P.; ABZIANIDZE, T.; PARTSKHALADZE, G.; TSIKLARI, L.; DUDAURI, T.; GODON, J.J. 2004. 16S rDNA characterisation of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure. **Bioresource technology**, **93(3)**: 227–232.

CHAE, K.J.; JANG, A.; YIM, S.K.; KIM, I.S. 2008. The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. **Bioresource technology**, **99(1)**: 1–6.

CHEN, J.; YU, Z.; MICHEL, F.C.; WITTUM, T.; MORRISON, M. 2007. Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. **Applied and environmental microbiology**, **73(14)**: 4407–4416.

CHEN, Y.; FU, B.; WANG, Y.; JIANG, Q.; LIU, H. 2012. Reactor performance and bacterial pathogen removal in response to sludge retention time in a mesophilic anaerobic digester treating sewage sludge. **Bioresource technology**, **106**: 20–26.

CHYNOWETHA, D.P.; OWENSA, J.M.; LEGRAND, R. 2001. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. **Renewable energy**, **22 (1–3)**: 1–8.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: 22nd informational supplement. Document M100-S22. CLSI, Wayne, PA.

COSTA, P. M.; LOUREIRO, L.; MATOS, A. J. F. 2013. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. **International journal of environmental research and public health**, **10(1)**: 278–294.

CÔTÉ, C.; MASSÉ, D. I.; QUÉSSY, S. 2006. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. **Bioresource technology**, **97(4)**: 686–691.

DEMIREL, B.; SCHERER, P. 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. **Reviews in environmental science and bio/technology**, **7(2)**: 173–190.

DINIZ, C.G.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R.; ROCHA, E.R.; SMITH, C.J. 2004. Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. **The journal of antimicrobial chemotherapy**, **54**: 100–108.

DUNGAN, R.S.; KLEIN, M.; LEYTEM, A.B. 2012. Quantification of bacterial indicators and zoonotic pathogens in dairy wastewater ponds. **Applied and environmental microbiology**, **78(22)**: 8089–8095.

EIKMEYER, F. G.; KÖFINGER, P.; POSCHENEL, A.; JÜNEMANN, S.; ZAKRZEWSKI, M.; HEINL, S.; MAYRHUBER, E.; GRABHERR, R.; PÜHLER, A.; SCHWAB, H.; SCHLÜTER, A. 2013. Detailed analysis of metagenome datasets obtained from biogas-producing microbial communities residing in biogas reactors

does not indicate the presence of putative pathogenic microorganisms. **Biotechnology for biofuels**, **6(1)**: 49.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus* sp: a review. **Microbiology**, **155**: 1749–1757.

GHOSH, S.; LAPARA, T.M. 2007. The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. **The ISME journal**, **1**: 191–203.

GODON, J. J.; ZUMSTEIN, E.; DABERT, P.; HABOUZIT, F.; MOLETTA, R.; 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. **Applied and environmental microbiology**, **63(7)**: 2802–2813.

GUNASEELAN, N. 1997. Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review. **Biomass and bioenergy**, **13**: 83–114.

HAENNI, M.; SARAS, E.; CHAUSSIÈRE, S. C.; TREIL, M. 2011. *ErmB*-mediated erythromycin resistance in *Streptococcus uberis* from bovine. **The veterinary journal**, **189**: 356–358.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; ØSTERÅS, O.; HOGVEEN, H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. **The veterinary quarterly**, **29(1)**: 18–31.

HARRIS, S.J.; CORMICAN, M.; CUMMINS, E. 2012. Antimicrobial residues and antimicrobial-resistant bacteria: impact on the microbial environment and risk to human health—A review. **Human and ecological risk assessment: an international journal**, **18(4)**: 767–809.

HEUER, H.; SCHMITT, H.; SMALLA, K. 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. **Current opinion in microbiology**, **14(3)**: 236–243.

HILL, D. T.; TAYLOR, S. E.; GRIFT, T. E. 2001. Simulation of low temperature anaerobic digestion of dairy and swine manure. **Bioresource technology**, **78(2)**: 127–131.

HOLM-NIELSEN, J. B.; AL SEADI, T.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. 2009. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. **Bioresource technology**, **100(22)**: 5478–5484.

HORI, T.; HARUTA, S.; UENO, Y.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. 2006. Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a digester. **Applied and environmental microbiology**, **72(2)**: 1623-1630.

HUBER, H.; HOHN, M. J.; RACHEL, R.; FUCHS, T.; WIMMER, V. C.; STETTER, K. O. 2002. A new phylum of *Archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. **Nature**, **417(6884)**: 63–67.

HUONG, L. Q.; MADSEN, H.; ANH, L. X.; NGOC, P.T.; DALSGAARD, A. 2014. Hygienic aspects of livestock manure management and biogas systems operated by small-scale pig farmers in Vietnam. **Science of the total environment**, **470**: 53–57.

IPEA, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. 2012. Diagnóstico dos resíduos orgânicos do setor agrossilvopastoril e agroindústrias associadas. Ed. BNDES, Brasília, 2012.

JAENICKE, S.; ANDER, C.; BEKEL, T.; BISDORF, R.; DRÖGE, M.; GARTEMANN, K.H.; JÜNEMANN, S.; KAISER, O.; KRAUSE, L.; TILLE, F.; ZAKRZEWSKI, M.; PÜHLER, A.; SCHLÜTER, A.; GOESMANN, A. 2011. Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. **PloS one**, **6(1)**:e14519.

KAMPMANN, K.; RATERING, S.; KRAMER, I.; SCHMIDT, M.; ZERR, W.; SCHNELL, S. 2012. Unexpected stability of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* communities in laboratory biogas reactors fed with different defined substrates. **Applied and environmental microbiology**, **78**: 2106–2119.

KARIM, K.; THOMAS KLASSON, K.; HOFFMANN, R.; DRESCHER, S.R.; DEPAOLI, D.W.; AL-DAHMAN, M.H. 2005. Anaerobic digestion of animal waste: effect of mixing. **Bioresource technology**, **96(14)**: 1607–1612.

KEARNEY, T.E.; LARKIN, M.J.; FROST, J.P.; LEVETT, P.N. 1993. Survival of pathogenic bacteria during mesophilic anaerobic digestion of animal waste. **Journal applied bacteriology**, **75**: 215–219.

KEMPER N. 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological indicators**, **8**: 1 –13.

KIM, J.; LIM, J.; LEE, C. 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. **Biotechnology advances**, doi: 0.1016/j.biotechadv.2013.05.010.

KLOCKE, M.; MÄHNERT, P.; MUNDT, K.; SOUIDI, K.; LINKE, B. 2007. Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. **Systematic and applied microbiology**, **30(2)**: 139–151.

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

KRAUSE, L.; DIAZ, N. N.; EDWARDS, R. A.; GARTEMANN, K. H.; KRÖMEKE, H.; NEUWEGER, H.; PÜHLER, A.; RUNTE, K. J.; SCHLÜTER, A.; STOYE, J.;

SZCZEPANOWSKI, R.; TAUCH, A.; GOESMANN, A. 2008. Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. **Journal of biotechnology**, **136(1-2)**: 91–101.

KRUMPERMAN, P. H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing *Escherichia coli* to identify risk sources of faecal contamination of foods. **Applied and environmental microbiology**, **46**: 165-170.

KUMAR, K.V.; SRIDEVI, V.; RANI, K.; SAKUNTHALA, M.; KUMAR, C.S. 2013. A review on production of biogas, fundamentals, applications & its recent enhancing techniques. **Chemical engineering**, **57**: 14073–14079.

KÜMMERER, K. 2004. Resistance in the environment. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, **54**: 311–320.

KUNZ, A.; MIELE, M.; STEINMETZ, R. L. R. 2009. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. **Bioresource technology**, **100**: 5485–5489.

KUNZ, A.; OLIVEIRA, P. A.; HIGARASHI, M. M. 2005. Biodigestor para o tratamento de dejetos de suínos: influência da temperatura ambiente. **Comunicado Técnico Embrapa/CNPQA**, **416**: 1–5.

LACHMAYR, K.L.; KERKHOF, L.J.; DIRIENZO, A.G.; CAVANAUGH, C.M.; FORD, T.E. 2009. Quantifying nonspecific TEM beta-lactamase (*bla*<sub>TEM</sub>) genes in a wastewater stream. **Applied and environmental microbiology**, **75(1)**: 203–211.

LECLERC, M.; DELBES, C.; MOLETTA, R.; GODON, J. J. 2001. Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA *Archaea* during start-up of an anaerobic digester. **FEMS microbiology ecology**, **34(3)**: 213–220.

LECLERC, M.; DELGÈNES, J.P.; GODON, J.J. 2004. Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. **Environmental microbiology**, **6(8)**: 809–819.

LEE, S. H.; KANG, H. J.; LEE, Y. H.; LEE, T. J.; HAN, K.; CHOI, Y.; PARK, H. D. 2012. Monitoring bacterial community structure and variability in time scale in full-scale anaerobic digesters. **Journal of environmental monitoring**, **14(7)**: 1893–1905.

LEVÉN, L.; ERIKSSON, A.R.B.; SCHNÜRER, A. 2007. Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. **FEMS microbiology ecology**, **59(3)**: 683–693.

LIU, F. H.; WANG, S. B.; ZHANG, J. S.; ZHANG, J.; YAN, X.; ZHOU, H. K.; ZHAO, G. P.; ZHOU, Z. H. 2009. The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel

electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis. **Journal of applied microbiology**, **106(3)**: 952–966

LIU, W. T.; CHAN, O. C.; FANG, H. H. P. 2002. Microbial community dynamics during start-up of acidogenic anaerobic reactors. **Water research**, **36**: 3203–3210.

LUSTE, S.; HEINONEN-TANSKI, H.; LUOSTARINEN, S. 2012. Co-digestion of dairy cattle slurry and industrial meat processing by products effect of ultrasound and hygienization pre-treatments. **Bioresource technology**, **104**: 195–201.

MA, Y.; WILSON, C. A.; NOVAK, J. T.; RIFFAT, R.; AYNUR, S.; MURTHY, S.; PRUDEN, A. 2011. Effect of various sludge digestion conditions on sulfonamide, macrolide, and tetracycline resistance genes and class I integrons. **Environmental science & technology**, **45**: 7855–7861.

MARTENS, W.; BÖHM, R. 2009. Overview of the ability of different treatment methods for liquid and solid manure to inactivate pathogens. **Bioresource technology**, **100**: 5374–5378.

MARTÍNEZ, J. L. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. **Science (New York, N.Y.)**, **321**: 365–367.

MARTÍNEZ, J. L. 2009. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. **Proceedings of the royal society biological sciences**, **276**: 2521–2530.

MARTÍNEZ, J. L.; BAQUERO, F. 2002. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. **Clinical microbiology reviews**, **15(4)**: 647–679.

MASSÉ, D.; GILBERT, Y.; TOPP, E. 2011. Pathogen removal in farm-scale psychrophilic anaerobic digesters processing swine manure. **Bioresource technology**, **102(2)**: 641–646.

MCGARVEY, J. A.; MILLER, W.G.; ZHANG, R.; MA, Y.; MITLOEHNER, F. 2007. Bacterial population dynamics in dairy waste during aerobic and anaerobic treatment and subsequent storage. **Applied and environmental microbiology**, **73(1)**: 193–202.

MIRANDA, A. P.; AMARAL, L. A.; LUCAS JUNIOR, J. 2006. Influência da temperatura na biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos e suínos. In: X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação.

MOLETTA-DENAT, M.; BRU-ADAN, V.; DELGENES, J.P.; HAMELIN, J.; WÉRY, N.; GODON, J.J. 2010. Selective microbial aerosolization in biogas demonstrated by quantitative PCR. **Bioresource technology**, **101(19)**: 7252–7257.

MUNIR, M.; WONG, K.; XAGORARAKI, I. 2011. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. **Water research**, **45(2)**: 681–693.

NEGREANU, Y.; PASTERNAK, Z.; JURKEVITCH, E.; CYTRYN, E. 2012. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. **Environmental science & technology**, **46(9)**: 4800–4808.

NICHOLSON, F. A.; GROVES, S. J.; CHAMBERS, B. J. 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. **Bioresource technology**, **96(2)**: 135–43.

NÕLVAK, H.; TRUU, M.; TIIRIK, K.; OOPKAUP, K.; SILDVEE, T.; KAASIK, A.; MANDER, Ü.; TRUU, J. 2013. Dynamics of antibiotic resistance genes and their relationships with system treatment efficiency in a horizontal subsurface flow constructed wetland. **Science of the total environment**, **462**: 636–644.

PANDEY, P. K.; SOUPIR, M. L. 2011. *Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. **AMB express** **1(1)**: 18.

PEU, P.; BRUGÈRE, H.; POURCHER, A. M.; KÉROURÉDAN, M.; GODON, J. J.; DELGENÈS, J. P.; DABERT, P. 2006. Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. **Applied and environmental microbiology**, **72(5)**: 3578–85.

PRUESSE, E.; QUAST, C.; KNITTEL, K.; FUCHS, B. M.; LUDWIG, W. G.; PEPLIES, J.; GLOCKNER, F. O. 2007. SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA Sequence data compatible with ARB. **Nucleic acids research**, **35**: 7188–7196.

QIAO, J. T.; QIU, Y. L.; YUAN, X. Z.; SHI, X. S.; XU, X. H.; GUO, R. B. 2013. Molecular characterization of bacterial and archaeal communities in a full-scale anaerobic reactor treating corn straw. **Bioresource technology**, **143**: 512–518.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. 2007. Rang and Dale's Pharmacology. (6<sup>a</sup> edição). Philadelphia, Churchill Livingstone Elsevier.

REDDING, L. E.; BARG, F. K.; SMITH, G.; GALLIGAN, D.T.; LEVY, M. Z.; HENNESSY, S. 2013. The role of veterinarians and feed-store vendors in the prescription and use of antibiotics on small dairy farms in rural Peru. **Journal of dairy science**: 1–6.

RICO, J. L.; GARCÍA, H.; RICO, C.; TEJERO, I. 2007. Characterisation of solid and liquid fractions of dairy manure with regard to their component distribution and methane production. **Bioresource technology**, **98(5)**: 971–979.

RITARI, J.; KOSKINEN, K.; HULTMAN, J.; KUROLA, J. M.; KYMÄLÄINEN, M.; ROMANTSCHUK, M.; PAULIN, L.; AUVINEN, P. 2012. Molecular analysis of

meso- and thermophilic microbiota associated with anaerobic biowaste degradation. **BMC microbiology**, **12**: 121.

ROBERTS, M. C. 2004. Resistance to macrolide, lincosamide, streptogramin, ketolide, and oxazolidinone antibiotics. **Molecular biotechnology**, **28**: 47–62.

SAHLSTRÖM, L., 2003. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. **Bioresource technology**, **87**: 161-166.

SAHLSTRÖM, L.; ASPAN, A.; BAGGE, E.; DANIELSSON-THAM, M.L.; ALBIHN, A. 2004. Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. **Water research**, **38(8)**: 1989–1994.

SAINI, V.; MCCLURE, J.T.; LÉGER, D.; DUFOUR, S.; SHELDON, A.G.; SCHOLL, D.T.; BARKEMA, H.W. 2012. Antimicrobial use on canadian dairy farms. **Journal of dairy science**, **95**: 1209–1221.

SAUNDERS, O.; HARRISON, J.; FORTUNA, A. M.; WHITEFIELD, E.; BARY, A. 2012. Effect of anaerobic digestion and application method on the presence and survivability of *E. coli* and fecal coliforms in dairy waste applied to soil. **Water air and soil pollution**, **223**: 1055-1063.

SAWANT, A. A.; HEGDE, N. V.; STRALEY, B. A.; DONALDSON, S. C.; LOVE, B. C.; KNABEL, S. J.; JAYARAO, B. M. 2007. Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. **Applied and environmental microbiology**, **73**: 156–163.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. 2009. Introducing MOTHUR: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied environment microbiology**, **75**: 7537–7541.

SHI, P.; JIA, S.; ZHANG, X. X.; ZHANG, T.; CHENG, S.; LI, A. 2013. Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. **Water research**, **47(1)**: 111–120.

SIMANKOVA, M. V.; KOTSYURBENKO, O. R.; LUEDERS, T.; NOZHEVNIKOVA, A. N.; WAGNER, B.; CONRAD, R.; FRIEDRICH, M. W. 2003. Isolation and characterization of new strains of methanogens from cold terrestrial habitats. **Systematic and applied microbiology**, **26**: 312–318.

SINTON, L.; BRAITHWAITE, R.; HALL, C.; MACKENZIE, M. 2007. Survival of indicator and pathogenic bacteria in bovine feces on pasture. **Applied and environmental microbiology**, **73(24)**: 7917–7925.

SMITH, S. R.; LANG, N. L.; CHEUNG, K. H. M.; SPANOUDAKI, K. 2005. Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. **Waste management**, **25(4)**: 417–425.



- SNELL-CASTRO, R.; GODON, J. J.; DELGENÈS, J. P.; DABERT, P. 2005. Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. **FEMS microbiology ecology**, **52**: 229–242.
- SOMMERHÄUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K. 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Veterinary microbiology**, **96**: 91–102.
- SOUZA, C. F.; CAMPOS, J. A.; SANTOS, C. R.; BRESSAN, W. S.; MOGAMI, C. A. 2008. Produção volumétrica de metano: dejetos de suínos. **Ciência e agrotecnologia**, **32(1)**: 219–224.
- SOUZA, S. N. M.; PEREIRA, W. C.; NOGUEIRA, C. E. C.; PAVAN, A. A.; SORDI, A. 2004. Custo da eletricidade gerada em conjunto motor gerador utilizando biogás da suinocultura. **Acta scientiarum technology**, **26**: 127–132.
- ST-PIERRE, B.; WRIGHT, A. D. G. 2013. Metagenomic analysis of methanogen populations in three full-scale mesophilic anaerobic manure digesters operated on dairy farms in Vermont, USA. **Bioresource technology**, **138**:277–284.
- STEERS, E.; FOLTZ, E. L.; GRAVES, B. S.; SURIANO, H. J. 1959. Comparison of bacterial susceptibility to antibiotics as determined by the plate dilution method and by the disc method. **Antibiotics annual**, **7**: 604-613.
- SUNDBERG, C.; AL-SOUD, W.A.; LARSSON, M.; ALM, E.; YEKTA, S. S.; SVENSSON, B. H.; SØRENSEN, S. J.; KARLSSON, A. 2013. 454 Pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. **FEMS microbiology ecology**, **85(3)**: 612-626.
- SURYAWANSHI, P. C.; CHAUDHARI, A. B.; KOTHARI, R. M. 2010. Mesophilic anaerobic digestion: first option for waste treatment in tropical regions. **Critical reviews in biotechnology**, **30(4)**: 259–282.
- THURSTON-ENRIQUEZ, J. A.; GILLEY, J. E.; EGHBALL, B. 2005. Microbial quality of runoff following land application of cattle manure and swine slurry. **Journal of water and health**, **3**: 157–171.
- UBALUA, A. O. 2007. Cassava wastes : treatment options and value addition alternatives. **African journal of biotechnology**, **6**: 2065–2073.
- VARELA, A. R.; MANAIA, C. M. 2013. Human health implications of clinically relevant bacteria in wastewater habitats. **Environmental science and pollution research international**, **20(6)**: 3550–3569.
- VENGLOVSKY, J.; MARTINEZ, J.; PLACHA, I. 2006. Hygienic and ecological risks connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture. **Livestock science**, **102(3)**: 197-203.

VENGLOVSKY, J.; SASAKOVA, N.; PLACHA, I. 2009. Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. **Bioresource technology**, **100(22)**: 5386–5391.

WALCZAK, J. J.; XU, S. 2011. Manure as a source of antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Enterococci*: a case study of a Wisconsin, USA family dairy farm. **Water, air, & soil pollution**, **219(1-4)**: 579–589.

WALSH, J. J.; ROUSK, J.; EDWARDS-JONES, G.; JONES, D. L.; WILLIAMS A. P. 2012. Fungal and bacterial growth following the application of slurry and anaerobic digestate of livestock manure to temperate pasture soils. **Biology and fertility of soils**, **48(8)**: 889–897.

WANG, Y.; QIAN, P. 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PloS one**, **4**: 7401.

WANG, L.; ODA, Y.; GREWAL, S.; MORRISON, M.; MICHEL, F. C.; YU, Z. 2012. Persistence of resistance to erythromycin and tetracycline in swine manure during simulated composting and lagoon treatments. **Microbial ecology**, **63(1)**: 32–40.

WANG, L.; ODA, Y.; GREWAL, S.; MORRISON, M.; MICHEL, F. C.; YU, Z.; VENGLOVSKY, J.; MARTINEZ, J.; PLACHA, I. 2006. Hygienic and ecological risks connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture. **Livestock science**, **102(3)**: 197–203.

WATANABE, N.; BERGAMASCHI, B. A.; LOFTIN, K. A.; MEYER, M. T.; HARTE, T. 2010. Use and environmental occurrence of antibiotics in free stall dairy farms with manured forage fields. **Environmental science & technology**, **44(17)**: 6591–6600.

WATCHARASUKARN, M.; KAPARAJU, P.; STEYER, J.P.; KROGFELT, K. A.; ANGELIDAKI, I. 2009. Screening *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Clostridium perfringens* as indicator organisms in evaluating pathogen-reducing capacity in biogas plants. **Microbial ecology**, **58(2)**: 221–230.

WIRTH, R.; KOVÁCS, E.; MARÓTI, G.; BAGI, Z.; RÁKHELY, G.; KOVÁCS, K. L. 2012. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. **Biotechnology for biofuels**, **5(1)**: 41.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. **Proceedings of the national academy of sciences**, **87(12)**: 4576–4579.

YE, L.; ZHANG, T. 2011. Pathogenic bacteria in sewage treatment plants as revealed by 454 Pyrosequencing. **Environmental science & technology**, **45**: 7173–7179.

- YE, L.; ZHANG, T. 2013. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. **Applied microbiology and biotechnology**, **97(6)**: 2681–2690.
- YU, Y.; LEE, C.; KIM, J.; HWANG, S. 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. **Biotechnology and bioengineering**, **89(6)**: 670–679.
- ZEMB, O.; HAEGEMAN, B.; DELGENES, J. P.; LEBARON, P.; GODON, J. J. 2007. Safum: statistical analysis of SSCP fingerprints using PCA projections, dendrograms and diversity estimators. **Molecular ecology notes**, **7**: 767–770.
- ZHANG, Y.; ZAMUDIO CAÑAS, E. M.; ZHU, Z.; LINVILLE, J. L.; CHEN, S.; HE, Q. 2011. Robustness of archaeal populations in anaerobic co-digestion of dairy and poultry wastes. **Bioresource technology**, **102(2)**: 779–785.
- ZHOU, L. J.; YING, G. G.; LIU, S.; ZHANG, R. Q.; LAI, H. J.; CHEN, Z. F.; PAN, C. G. 2013. Excretion masses and environmental occurrence of antibiotics in typical swine and dairy cattle farms in China. **Science of the total environment**, **444**: 183–195.

**APÊNDICE A.** Artigo Aceito**“Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure”**

Juliana Alves Resende, Vânia Lúcia Silva, Tamara Lopes Rocha de Oliveira, Samuel de Oliveira Fortunato, Jailton da Costa Carneiro, Marcelo Henrique Otenio and Cláudio Galuppo Diniz

*Bioresource Technology*

ISSN: 0960-8524

Impact Factor: 4.750

Imprint: ELSEVIER

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biortech](http://www.elsevier.com/locate/biortech)

## Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure



Juliana Alves Resende<sup>a</sup>, Vânia Lúcia Silva<sup>a</sup>, Tamara Lopes Rocha de Oliveira<sup>a</sup>, Samuel de Oliveira Fortunato<sup>a</sup>, Jailton da Costa Carneiro<sup>b</sup>, Marcelo Henrique Otenio<sup>b</sup>, Cláudio Galuppo Diniz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil  
<sup>b</sup> Embrapa Dairy Cattle, Research Center, 36038-330 Juiz de Fora, MG, Brazil

### HIGHLIGHTS

- Sustainable handling of anaerobic digestion and their effluents are needed.
- Effluents from biodigesters are widely spread into land used for the agriculture.
- Putative pathogenic bacteria persist after anaerobic digestion of cattle manure.
- Antimicrobial-resistant bacteria are prevalent in the effluents from biodigesters.
- Medically important bacteria imposes sanitary risks to the anaerobic digestion.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 October 2013  
 Received in revised form 29 November 2013  
 Accepted 3 December 2013  
 Available online 11 December 2013

#### Keywords:

Anaerobic digestion  
 Biogas  
 Biofertilizer dairy cattle manure  
 Antimicrobial resistance  
 Pathogenic bacteria

### ABSTRACT

Anaerobic digestion figures as a sustainable alternative to avoid discharge of cattle manure in the environment, which results in biogas and biofertilizer. Persistence of potentially pathogenic and drug-resistant bacteria during anaerobic digestion of cattle manure was evaluated. Selective cultures were performed for enterobacteria (ENT), non-fermenting Gram-negative rods (NFR) and Gram-positive cocci (GPC). Antimicrobial susceptibility patterns were determined and a decay of all bacterial groups was observed after 60 days. Multidrug-resistant bacteria were detected both the influent and effluent. GPC, the most prevalent group was highly resistant against penicillin and levofloxacin, whereas resistance to ampicillin, ampicillin-sulbactam and chloramphenicol was frequently observed in the ENT and NFR groups. The data point out the need of discussions to better address management of biodigesters and the implementation of sanitary and microbiological safe treatments of animal manures to avoid consequences to human, animal and environmental health.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

As long as the need for increased food production leads to the dairy industry growth, environmental concerns related to cattle manure management, which includes residues discharge into soil and aquatic ecosystems favoring the spread of putative pathogenic microorganisms are pointed out (Sahlström, 2003; Venglovsky et al., 2009).

In this regard, prospective studies towards new strategies for safe disposal of large quantities of cattle manure should take into

account the sanitary and microbiological risks (Karim et al., 2005). To avoid direct discharge of manure into soil and aquatic ecosystems anaerobic digestion is pointed out as a sustainable alternative resulting in production of biogas and biofertilizer, whilst reducing the microbial load of the surrounding environments (Bagge et al., 2005; Saunders et al., 2012).

However, cattle farming is frequently referred as a reservoir for potentially pathogenic and antimicrobial resistant bacteria or also, reservoir of antibiotic resistance genes (Munir and Xagorarakis, 2011; Thames et al., 2012). To increase production related to prophylaxis, infectious diseases treatment and/or growth promoters, antimicrobial drugs are widely applied in animal husbandry (Heuer et al., 2011). As an ecological consequence, the presence of zoonotic pathogens in the environments and unintentional selection of bacteria that are resistant to antibiotics could have important human and animal health consequences, mainly when

\* Corresponding author. Address: Laboratory of Bacterial Physiology and Molecular Genetics, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil. Tel./fax: +55 32 2102 3213.

E-mail address: [claudio.diniz@ufjf.edu.br](mailto:claudio.diniz@ufjf.edu.br) (C.G. Diniz).

end up in agricultural lands (Walczak and Xu, 2011; Costa et al., 2013).

As long as anaerobic digestion has been considered an attractive method to promote a clean fuel from renewable feed stocks, such as animal manure, to develop a well-established technology, the optimization of anaerobic digestion processes requires effective operative control and possible correlation with reduction of pathogens (Holm-Nielsen et al., 2009).

In Brazil, as the most part of the country is located in the tropical region, the climatic conditions are mostly in the mesophilic range, and the majority of the anaerobic digesters are operated at ambient temperature followed by land application of the effluent (Kunz et al., 2009). In this regard, recycling of cattle manure at ambient temperature, i.e. production of energy and fertilizer from anaerobic digestion, would be of commercial and environmental interests, and no literature is available considering sanitary and ecological safety. Indeed, it is already reported concerns on the persistency of potentially pathogenic and antimicrobial-resistant bacteria during biogas and biofertilizers production, considering other anaerobic digestion models, but at constant temperatures (Beneragama et al., 2012).

In this regard, this study was focused on the evaluation of persistence of clinically relevant bacteria and their susceptibility patterns to antimicrobial drugs during anaerobic digestion effluents in continuous pilot-scale bioreactors, to assess the sanitary risks of the process concerning human, animal and environmental health.

## 2. Methods

### 2.1. Pilot-scale biogas reactor and sample collection

Four experimental continuous bioreactors operating at ambient temperatures, with a 60 day retention time, and 60 L working volume were used. Fresh dairy cattle manure was collected from the experimental Embrapa dairy cattle field located in Coronel Pacheco city, Minas Gerais state, Brazil. The bioreactors were fed daily with influent of dairy cattle manure mixed with cattle wastewater (final total solids concentration 3–4%).

Temperature was measured by using an ordinary mercury thermometer during the sampling. Total solids (TS), volatile solids (VS), and pH of influent and effluent samples were measured according to standard methods (APHA, 2005). Biogas produced was measured every week by gas chromatography (Agilent Technologies, 7820A). All measurements were done in triplicate and the averages were taken as representative values.

In total, 58 samples from the bioreactors were collected at different times, referred to as the influent ( $n = 2$ , before feeding the bioreactors), and effluent ( $n = 56$ , samples were taken every 3–5 days during the digestion). Influent and effluent samples (20 mL) were collected using sterile bottles between January–March (2012) and May–June (2012). All samples were brought to the laboratory and processed within 1 h after collection.

### 2.2. Microbiological quantitative methods

For bacterial counts, influent (1st day) and effluent samples (15th, 30th and 60th days) were collected and 10-fold serially diluted up to  $10^{-8}$  in sterile saline solution (0.9% NaCl). Aliquots of 0.1 mL of each dilution were submitted to selective culture in different culture medium. The lowest dilution that produced microbial counts between 20 and 200 colonies was used to estimate the number of bacteria in the samples. The Gram positive cocci *Enterococcus* spp. were evaluated on Bile Esculin Agar (Himedia Laboratories, India) and *Staphylococcus* spp. on Hypertonic Manitol Agar (Himedia Laboratories, India) after incubation at 35.5 °C for

24 h. The Gram-negative bacteria were evaluated on Eosin-Methylene Blue Agar (Himedia Laboratories, India) after incubation at 37 °C for 24 h, and lactose fermenting (pink, purple or green metallic) and non-fermenting (colorless) colonies were counted. The experiments were performed in duplicates and results were expressed as mean bacterial counts.

### 2.3. Isolation and identification of bacterial samples

From the selective cultures for enterococci, staphylococci and Gram negative rods, three to five representative colonies were selected and sub-cultivated in Brain-Heart Infusion Agar (Himedia Laboratories) for stock by freezing and further experiments. For *Streptococcus* spp. isolation, the collected influent and effluent samples 10-fold serially diluted were streaked on sheep blood agar plates (Brain Heart Infusion supplemented with 5% of sheep blood) and incubated in a capnophilic atmosphere (5% CO<sub>2</sub>). After incubation (18–48 h, 37 °C), pin point white colonies were selected.

The Gram positive cocci (staphylococci, enterococci and streptococci) were presumptively identified by morphotintorial characteristics after Gram staining, as well as the ability to hydrolyze esculin, produce catalase and presence of zone of hemolysis. Species identification was performed using the commercial system BBL Crystal Rapid Gram-Positive ID Kit (Becton & Dickinson, USA), according to the manufacturer's instructions.

The Gram-negative bacteria were presumptively identified by morphotintorial characteristics after Gram staining, as well as the ability of glucose, sucrose and lactose fermentation, oxidase and motility tests. Species identification was performed using API 20E (Bio Mérieux AB, Marcy l'Etoile, France), according to the manufacturer's instructions.

### 2.4. Antimicrobial susceptibility assays

The minimum inhibitory concentrations (MIC) for antimicrobial drugs were determined by the agar dilution method, according to the Clinical and Laboratory Standard Institute guideline (CLSI, 2012). Antibiotic stock solutions were added to melted Mueller-Hinton (Himedia) agar to obtain final concentrations ranging from 0.06 to 1024 µg mL<sup>-1</sup>. The antimicrobial drugs were selected on the basis of microbial characteristics and clinical relevance as follows: (i) for Gram positive cocci catalase-positive (GPC/C+), penicillin (MedQuímica, Brazil), oxacillin (MedQuímica), vancomycin (MedQuímica), ampicillin-sulbactam (Cellofarm, Brazil), rifampin (Sigma Aldrich, USA), levofloxacin (Sigma Aldrich), trimethoprim-sulfamethoxazole (MedQuímica) and erythromycin (Sigma Aldrich); (ii) for Gram positive cocci catalase-negative (GPC/C-), penicillin, vancomycin, rifampin, levofloxacin and erythromycin; (iii) for Gram negative rods *Enterobacteriaceae* (ENT), ampicillin (Cellofarm), ampicillin-sulbactam, piperacillin-tazobactam (Novafarma, Brazil), cefepime (Biochimico, Brazil), meropenem (Biochimico), gentamicin (Novafarma, Brazil), amikacin (Teuto-Brasileiro Laboratorio, Brazil), levofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole and chloramphenicol; and (iv) for non-fermenter Gram negative rods (NFR), piperacillin-tazobactam, cefepime, gentamicin, amikacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, meropenem, levofloxacin and chloramphenicol.

The reference strains *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were included as controls in the antimicrobial susceptibility assays for Gram-positive or Gram-negative bacteria and all tests were performed in duplicate. Using CLSI guidelines, the isolates were classified as sensitive, intermediate, or resistant to the tested antimicrobial agents (CLSI, 2012).

To determine the level of antibiotic resistance of the individual isolated bacteria, the multiple antibiotic resistance (MAR) index

was calculated by dividing the number of antibiotics to which the isolate was resistant by the total number of antibiotics to which the isolates were exposed as previously described (Krumperman, 1983). A MAR value  $>0.2$  was indicative of multiple antibiotic-resistant bacteria.

### 2.5. Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparisons test were applied to compare production of gas and the distribution of different bacterial groups in different biodigesters. Student's *t*-test was used for comparison of the bacterial reduction rates. The significance level was set as  $p < 0.05$ . The microbial counts were converted to the logarithm of the number of colony forming units per mL of biowaste samples ( $\log$  CFU mL<sup>-1</sup>).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Pilot-scale biogas reactor performance

Over the 60 days of hydraulic retention time in which influent of dairy cattle manure was fed, the pH value of the cattle manure (influent) was between 6.55 and 6.86 and ambient temperature was in the mesophilic range (between 25 and 35 °C). The pH was between 6.95 and 7.41 during the study. The percentage reduction in TS of fermenting cattle manure was about 65% and VS was 68%. The average daily biogas produced was 17 L/day, with a methane composition above 44.06–70.27%. There was no significant difference in methane composition among the pilot-scale digesters ( $p = 0.499$ ).

Overall, there are few reports available to compare these results, considering anaerobic digestion of animal manure under ambient temperature at mesophilic range. It had already been shown that methane production by anaerobic digestion using animal manure as substrate, followed the same pattern in both mesophilic (35 °C) or ambient (16.8–29.5 °C) temperatures (Alvarez et al., 2006). Add to that, these data shows a similar methane production rate if compared to other studies with mesophilic bioreactors using, also, animal manure (Rico et al., 2007; Chae et al., 2008).

### 3.2. Bacterial prevalence during anaerobic digestion

The persistence of putative pathogenic bacteria such as Gram positive cocci or Gram negative rods justifies themselves the sanitary risks and microbiological relevance of the sustainable handling of anaerobic digestion and their effluents. From an ecological perspective, the occurrence of antimicrobial resistant bacteria calls to the spread and impacts of antimicrobial resistance both in human, animal and environmental health (Holm-Nielsen et al., 2009; Venglovsky et al., 2009; Costa et al., 2013).

The quantitative analysis for the viable microbial counts is presented in Fig. 1. During the experimental period, total viable count of GPC/C+ on Manitol Agar ranged from  $2.65 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> in the influent (1st day) to  $1.57 \times 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup> in effluent after 60 days of fermentation (99.40% reduction,  $p = 7.9 \times 10^{-8}$ ). Throughout the evaluated time, decrease in GPC/C+ counts were observed between the initial load and 30 days ( $p = 0.0001$ ), and between 30 and 60 days of anaerobic digestion ( $p = 0.001$ ). The bacterial counts of GPC/C- on Bile Esculin Agar varied between  $3.71 \times 10^5$  and  $1.57 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup> (95.76% reduction,  $p = 0.0001$ ) and CFU reduction were observed between initial load and 15 days ( $p = 0.0008$ ), and between 30 and 60 days of anaerobic digestion ( $p = 0.0495$ ). The average ENT count on Eosin-Methylene Blue Agar ranged from  $4.42 \times 10^8$  to  $1.45 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup>, while NFR varied between  $5.43 \times 10^8$  and  $9.44 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup>, with average reduction of 99.96% ( $p = 1.1 \times 10^{-11}$ ) and 99.82% ( $p = 1.8 \times 10^{-8}$ ), respectively. From the initial load, bacterial counts considering these microbial groups (ENT and NFR) were observed only if compared to 15 days of anaerobic digestion ( $p = 2.5 \times 10^{-12}$  and  $p = 8.8 \times 10^{-9}$ , respectively). Up to 60 days no significant bacterial counts were observed (ENT:  $p = 0.166$ , and NFR:  $p = 0.152$ , respectively). Overall, the reduction rates considering all the microbial groups from effluent samples were significantly different from influent samples ( $p = 0.029$ ).

The observed GNR and enterococci densities in cattle manure (influent) were comparable to previously reported values which suggested  $10^5$ – $10^8$  fecal organisms per gram (Walczak and Xu, 2011; Dungan et al., 2012).

The decay rate of viable bacteria after the period of anaerobic digestion of cattle manure is dependent on several factors, mainly,

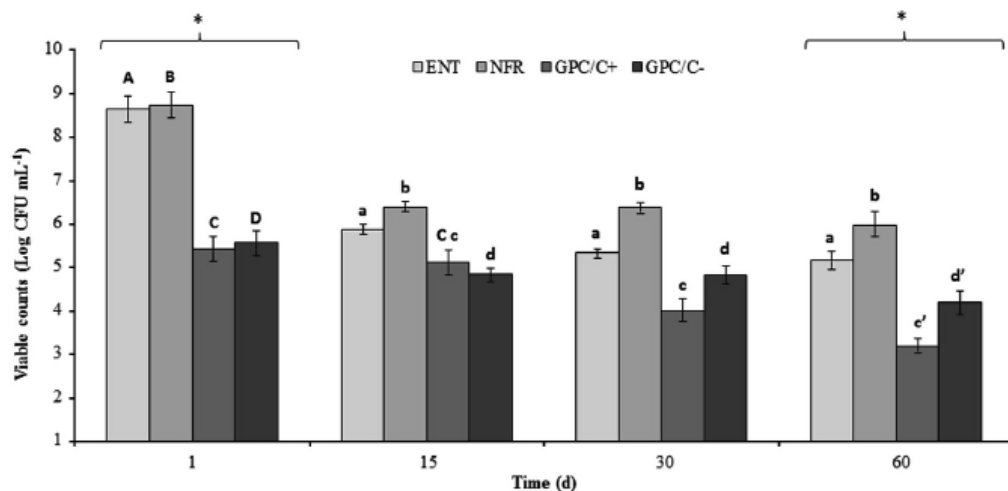


Fig. 1. Mean value of viable microbial counts ( $\log$  CFU mL<sup>-1</sup>) of initial load (1st day), and effluent samples (15th, 30th and 60th days), times 15–60, from pilot-scale anaerobic digesters. ENT: Gram-negative rods from the *Enterobacteriaceae* family; NFR: non-fermenting Gram-negative rods; GPC/C+: Gram-positive cocci/ Catalase-positive; GPC/C-: Gram-positive cocci/ Catalase-negative. Different letters including lowercase or uppercase letters and "\*" indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).



## Author's personal copy

J.A. Resende et al. / *Bioresource Technology* 153 (2014) 284–291

287

bacterial biology, and characteristics of anaerobic digestion including temperature and retention time (Smith et al., 2005; Pandey and Soupir, 2011). These data, together with good production rates of methane, indicate that a stable digestion process was occurring and that the digesters were achieving a performance typical of that achieved by full-scale ones. Add to that, these data are in agreement to Saunders et al. (2012) who reported increased rates of inactivation of indicator bacteria, *E. coli* and fecal coliform, in anaerobic digesters fed with dairy manure.

Six hundred and sixty ( $n = 660$ ) bacterial strains were isolated from influent ( $n = 67$  isolates) and effluent ( $n = 593$  isolates) samples. Representative strains of GPC (staphylococci, enterococci

and streptococci) were the most frequent ( $n = 33$ , 49.25%;  $n = 353$ , 59.53%), followed by ENT ( $n = 28$ , 41.79%;  $n = 176$ , 29.68%) and NFR ( $n = 6$ , 8.96%;  $n = 57$ , 9.61%) in influent and effluent, respectively. According to ANOVA, no significant difference was observed among the sampled sites (influent and effluent) considering the variations in the same bacterial group ( $p = 0.093$ ). Considering the frequency of microbial recovery no significant difference was found between strains (GPC, ENT and NFR) in different samples, isolates were regularly distributed ( $p = 0.209$ ).

Microbial identification of influent samples is shown in Table 1. Out of the 33 GPC, 12 different species were identified, 36.36% GPC/+ and 63.64% GPC/-. The most prevalent were *Enterococcus hirae*

**Table 1**

Species distribution of bacterial strains isolated from influent samples showing the frequency of identification between Gram positive cocci (GPC) and Gram negative, as enterobacteria (ENT) and non-fermenting Gram-negative rods (NFR).

Bacterial group (n) and frequency of species identification (%)		
Gram positive	Gram negative	
GPC (n = 33)	ENT (n = 28)	NFR (n = 6)
<i>Enterococcus hirae</i> (15.15)	<i>Escherichia coli</i> (82.14)	<i>Raistonia pickettii</i> (50.00)
<i>Enterococcus faecium</i> (12.12)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (7.14)	<i>Alcaligenes faecalis</i> (33.33)
<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i> (12.12)	<i>Enterobacter sakazakii</i> (7.14)	<i>Burkholderia cepacia</i> (16.67)
<i>Kytococcus sedentarius</i> (12.12)	<i>Salmonella choleraesuis</i> ssp (3.57)	
<i>Staphylococcus capitis</i> (9.09)		
<i>Staphylococcus xylosum</i> (9.09)		
<i>Aerococcus viridans</i> (6.06)		
<i>Enterococcus avium</i> (6.06)		
<i>Enterococcus faecalis</i> (6.06)		
<i>Leuconostoc citreum</i> (3.03)		
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (3.03)		
<i>Micrococcus species</i> (3.03)		

GPC: Gram-positive cocci; ENT: Gram-negative rods from the *Enterobacteriaceae* family; NFR: non-fermenting Gram-negative rods.

**Table 2**

Species distribution of bacterial strains isolated from effluent samples showing the frequency of identification between Gram positive cocci (GPC) and Gram negative, as enterobacteria (ENT), non-fermenting Gram-negative rods (NFR) and others Gram negatives (GNR).

Bacterial group (n) and frequency of species identification (%)			
Gram positive	Gram negative		
GPC (n = 353)	ENT (n = 176)	NFR (n = 57)	Others GNR (n = 7)
<i>Enterococcus faecium</i> (15.01)	<i>Escherichia coli</i> (82.95)	<i>Alcaligenes faecalis</i> (17.58)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (100.00)
<i>Enterococcus hirae</i> (12.18)	<i>Morganella morganii</i> (6.81)	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (17.58)	
<i>Streptococcus bovis</i> (7.65)	<i>Citrobacter freundii</i> (2.84)	<i>Raistonia pickettii</i> (10.52)	
<i>Aerococcus viridans</i> (7.08)	<i>Enterobacter asburiae</i> (1.13)	<i>Burkholderia cepacia</i> (8.87)	
<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i> (6.52)	<i>Enterobacter cloacae</i> (1.13)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (7.01)	
<i>Enterococcus avium</i> (6.52)	<i>Providencia stuartii</i> (1.13)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (7.01)	
<i>Staphylococcus capitis</i> (6.52)	<i>Raoultella terrigena</i> (1.13)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (3.50)	
<i>Staphylococcus xylosum</i> (4.53)	<i>Serratia marcescens</i> (1.13)	<i>Acinetobacter junii</i> (3.50)	
<i>Kytococcus sedentarius</i> (4.25)	<i>Pantoea</i> spp. (0.56)	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (3.50)	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (3.68)	<i>Providencia alkalifaciens</i> (0.56)	<i>Pseudomonas putida</i> (3.50)	
<i>Enterococcus faecalis</i> (3.12)	<i>Salmonella choleraesuis</i> (0.56)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (3.50)	
<i>Streptococcus equinus</i> (2.55)		<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (1.75)	
<i>Streptococcus salivarius</i> (2.55)		<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (1.75)	
<i>Micrococcus luteus</i> (2.27)		<i>Alcaligenes piechaudii</i> (1.75)	
<i>Enterococcus durans</i> (1.98)		<i>Moraxella osloensis</i> (1.75)	
<i>Staphylococcus lentus</i> (1.70)		<i>Ochrobactrum anthropi</i> (1.75)	
<i>Enterococcus raffinosus</i> (1.42)		<i>Pseudomonas fluorescens</i> (1.75)	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (1.42)		<i>Pseudomonas luteola</i> (1.75)	
<i>Staphylococcus auricularis</i> (1.42)		<i>Wautersia paucula</i> (1.75)	
<i>Streptococcus criceti</i> (1.42)			
<i>Streptococcus vestibularis</i> (1.42)			
<i>Aerococcus urinae</i> (1.13)			
<i>Staphylococcus hominis</i> (1.13)			
<i>Streptococcus uberis</i> (1.13)			
<i>Leuconostoc citreum</i> (0.85)			
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (0.85)			
<i>Lactococcus lactis</i> (0.56)			
<i>Kocuria varians/rosea</i> (0.28)			

GPC: Gram-positive cocci; ENT: Gram-negative rods from the *Enterobacteriaceae* family; NFR: non-fermenting Gram-negative rods; GNR: Gram-negatives rods.

## Author's personal copy

288

J.A. Resende et al. / Bioresource Technology 153 (2014) 284–291

(15.15%), *Enterococcus faecium* (12.12%), *Enterococcus casseliflavus/gallinarum* (12.12%) and *Kytococcus sedentarius* (12.12%). Out of the 34 Gram-negative rods, 82.35% were ENT, while 17.65% were NFR. For ENT, the most prevalent species were *Escherichia coli* (82.14%) and among the NFR, the most prevalent species were *Ralstonia pickettii* (50.00%) and *Alcaligenes faecalis* (33.33%).

The microbial identification of effluents samples is summarized in Table 2. CGP were the most observed with 28 different species identified, 25.21% CGP/C+ and 74.78% GPC/C-. The most prevalent were *Enterococcus faecium* (15.01%), *Enterococcus hirae* (12.18%) and *Streptococcus bovis* (7.65%). Similar to the influent samples, *Escherichia coli* (82.95%) was the most prevalent among the ENT, followed by *Morganella morganii* (6.81%) and *Citrobacter freundii* (2.84%). For NFR, 19 different species were observed, *A. faecalis* (17.58%) and *Pseudomonas alcaligenes* (17.58%) were most identified.

Enterococci and *Enterobacteriaceae* were the most identified microorganisms in all samples. It is known from previous studies that they are ubiquitous and potentially opportunistic pathogens. Add to that, they naturally occur in human and animal intestines and are recognized as being able to survive and to multiply under a wide range of stress conditions and hostile environments due to their high tolerance to variation of temperature and pH (Fisher and Philips, 2009; Costa et al., 2013). According to other previous studies, enterococci and *Enterobacteriaceae* populations seem to be predominant in mesophilic digesters of cattle manure (Bagge et al., 2005; Sawant et al., 2007), although the composition of microbial

communities in different systems may differ due to manure handling practices and content, and environmental conditions (Sahlström, 2003).

### 3.3. Antimicrobial susceptibility

Out of 660 isolates, 239 strains (36.21%) were resistant to at least one of the tested antimicrobials. The drug susceptibility patterns are reported in Tables 3 and 4. Considering the GPC/C+ in influent samples, the highest frequency of resistance was to penicillin (83.33%). Antimicrobial resistance levels higher than 8.00% were observed against rifampin, erythromycin and levofloxacin. In contrast, vancomycin, ampicillin-sulbactam, oxacillin and trimethoprim-sulfamethoxazole were the most effective antimicrobials, with sensitivity rates of 100.00%. For the GPC/C-, 9.52% of resistance to penicillin was observed, especially considering the enterococci strains whereas intermediate resistance was observed against rifampin (9.52%) and erythromycin (14.28%). Considering ENT bacteria, the highest resistance rate was observed against to ampicillin (21.42% of resistance and 14.28% intermediate resistance). Resistance was also observed against to ampicillin-sulbactam, gentamicin and trimethoprim-sulfamethoxazole (>10%). No antimicrobial resistance was observed against meropenem, levofloxacin and cefepime. Antimicrobial resistance was not observed among NFR strains recovered from influents samples.

With regards to bacteria isolated from effluent samples, among the 8 antibiotics tested for GPC/C+, resistance was not observed

**Table 3**  
Drug susceptibility patterns of bacteria recovered in influent samples from pilot-scale anaerobic digesters.

Microbial group and tested antimicrobial drugs	Minimum inhibitory concentrations ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			Susceptibility patterns <sup>a</sup> (%)			
	MIC <sub>50%</sub>	MIC <sub>90%</sub>	Range	S	IR	R	
GPC/C+ <sup>b</sup>	Rifampin	0.06	0.24	0.06–8.00	83.34	8.33	8.33
	Vancomycin	0.24	1.00	0.12–2.00	100.00	–	–
	Ampicillin-sulbactam	0.24	0.50	0.06–4.00	100.00	–	–
	Penicillin	0.50	2.00	0.06–16.00	16.67	–	83.33
	Erythromycin	0.24	0.50	0.06–16.00	75.01	16.66	8.33
	Oxacillin	0.24	0.24	0.06–0.24	100.00	–	–
	Levofloxacin	0.50	8.00	0.50–16.00	50.01	16.66	33.33
	Trimethoprim-sulfamethoxazole	0.30	2.40	0.30–19.00	100.00	–	–
GPC/C- <sup>c</sup>	Rifampin	1.00	1.00	0.06–2.00	90.48	9.52	–
	Vancomycin	2.00	2.00	0.06–4.00	100.00	–	–
	Penicillin	0.25	1.00	0.06–32.00	90.48	–	9.52
	Erythromycin	0.06	1.00	0.06–16.00	80.96	14.28	4.76
	Levofloxacin	1.00	2.00	0.24–2.00	100.00	–	–
ENT <sup>d</sup>	Meropenem	0.06	0.06	0.06–1.00	100.00	–	–
	Gentamicin	1.00	64.00	0.25–128.00	82.15	–	17.85
	Amikacin	2.00	4.00	1.00–32.00	96.43	3.57	–
	Levofloxacin	0.06	0.24	0.06–1.00	100.00	–	–
	Trimethoprim-sulfamethoxazole	0.06	76.00	0.03–76.00	82.15	–	17.85
	Cefepime	0.06	0.12	0.06–1.00	100.00	–	–
	Piperacillin-tazobactam	2.00	4.00	1.00–32.00	96.43	3.57	–
	Chloramphenicol	4.00	8.00	4.00–32.00	96.43	–	3.57
	Ampicillin-sulbactam	4.00	64.00	1.00–128.00	78.58	7.14	14.28
	Ampicillin	8.00	32.00	2.00–512.00	64.30	14.28	21.42
NFR <sup>e</sup>	Meropenem	0.25	0.25	0.06–0.25	100.00	–	–
	Gentamicin	0.25	0.25	0.12–0.25	100.00	–	–
	Amikacin	0.50	1.00	0.25–2.00	100.00	–	–
	Levofloxacin	0.06	0.12	0.06–0.12	100.00	–	–
	Trimethoprim-sulfamethoxazole	2.40	4.80	0.60–38.00	100.00	–	–
	Cefepime	0.50	0.50	0.12–4.00	100.00	–	–
	Piperacillin-tazobactam	1.00	1.00	1.00–8.00	100.00	–	–
	Chloramphenicol	4.00	8.00	4.00–8.00	100.00	–	–

<sup>a</sup> S: sensitivity; IR: intermediate resistance; R: resistance.

<sup>b</sup> GPC/C+: Gram-positive cocci/Catalase-positive (n = 12).

<sup>c</sup> GPC/C-: Gram-positive cocci/Catalase-negative (n = 21).

<sup>d</sup> ENT: Gram-negative rods from the *Enterobacteriaceae* family (n = 28).

<sup>e</sup> NFR: non-fermenting Gram-negative rods (n = 6).

**Table 4**  
Drug susceptibility patterns of bacteria recovered in effluent samples from pilot-scale anaerobic digesters.

Microbial group and tested antimicrobial drugs		Minimum inhibitory concentrations ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			Susceptibility patterns <sup>a</sup> (%)			
		MIC <sub>50%</sub>	MIC <sub>90%</sub>	Range	S	IR	R	
GPC/C+ <sup>b</sup>	Rifampin	0.06	1.00	0.06–8.00	91.02	6.74	2.24	
	Vancomycin	0.24	2.00	0.06–2.00	100.00	–	–	
	Ampicillin-sulbactam	0.24	2.00	0.06–16.00	98.88	1.12	–	
	Penicillin	1.00	8.00	0.06–16.00	25.85	–	74.15	
	Erythromycin	0.24	2.00	0.06–32.00	70.79	19.10	10.11	
	Oxacillin	0.24	0.24	0.06–0.50	91.02	–	8.98	
	Levofloxacin	2.00	64.00	0.06–64.00	49.45	16.85	33.70	
	Trimethoprim-sulfamethoxazole	2.40	9.50	0.30–128.00	95.51	–	4.49	
GPC/C- <sup>c</sup>	Rifampin	0.12	4.00	0.06–8.00	91.67	6.82	1.52	
	Vancomycin	0.50	4.00	0.06–4.00	100.00	–	–	
	Penicillin	0.25	2.00	0.06–32.00	97.35	–	2.65	
	Erythromycin	0.06	1.00	0.06–16.00	85.23	12.50	2.27	
	Levofloxacin	1.00	2.00	0.06–4.00	96.59	3.41	–	
ENT <sup>d</sup> and others GNR	Meropenem	0.06	0.25	0.06–2.00	99.45	0.55	–	
	Gentamicin	1.00	1.00	0.06–128.00	99.45	–	0.55	
	Amikacin	4.00	4.00	0.25–32.00	99.45	0.55	–	
	Levofloxacin	0.06	0.12	0.06–1.00	100.00	–	–	
	Trimethoprim-sulfamethoxazole	0.06	4.80	0.06–38.00	100.00	–	–	
	Cefepime	0.06	0.12	0.06–8.00	100.00	–	–	
	Piperacillin-tazobactam	2.00	4.00	0.06–32.00	99.45	0.55	–	
	Chloramphenicol	4.00	8.00	0.06–32.00	92.90	4.37	2.73	
	Ampicillin-sulbactam	8.00	128.00	1.00–512.00	75.96	7.65	16.39	
	Ampicillin	8.00	64.00	0.06–1024.00	63.95	18.57	17.48	
	NFR <sup>e</sup>	Meropenem	0.06	0.50	0.06–8.00	96.50	–	3.50
		Gentamicin	0.25	4.00	0.06–64.00	96.50	–	3.50
		Amikacin	1.00	8.00	0.12–128.00	96.50	–	3.50
Levofloxacin		0.12	0.50	0.06–2.00	100.00	–	–	
Trimethoprim-sulfamethoxazole		9.50	38.00	0.6–304.00	91.33	–	8.77	
Cefepime		0.50	4.00	0.06–64.00	96.50	–	3.50	
Piperacillin-tazobactam		1.00	4.00	0.06–256.00	98.25	–	1.75	
Chloramphenicol		4.00	32	0.06–32.00	73.69	7.01	19.29	

<sup>a</sup> S: sensitivity; IR: intermediate resistance; R: resistance.

<sup>b</sup> GPC/C+: Gram-positive cocci/Catalase-positive ( $n = 89$ ).

<sup>c</sup> GPC/C-: Gram-positive cocci/Catalase-negative ( $n = 264$ ).

<sup>d</sup> ENT: Gram-negative rods from the *Enterobacteriaceae* family ( $n = 176$ ) and others GNR ( $n = 7$ ).

<sup>e</sup> NFR: non-fermenting Gram-negative rods ( $n = 57$ ).

against vancomycin. Penicillin was found to be the less effective drug (74.15% resistance), followed by levofloxacin (33.70% resistance) and erythromycin (10.11% resistance). In the GPC/C- group low resistance rates were observed against rifampin, penicillin and erythromycin. Considering the Gram negative bacteria, the ENT strains were resistant only against ampicillin and ampicillin-sulbactam (>10% resistance), whereas for the NFR strains, antimicrobial resistance was observed against almost all the tested drugs, especially chloramphenicol (19.29% resistance), with exception of levofloxacin, for which no resistance was observed.

The multiple antibiotic resistance (MAR) index is presented in Table 5. According to this parameter, 55.65% of the isolated bacteria is characterized as multi-resistant strains ( $\text{MAR} > 0.2$ ). The index ranged from 0.12 to 0.50 and 0.12 to 0.62 for GPC from influent and effluent samples respectively. Of the GPC/C+ isolated from the influent samples, 33.33% showed  $\text{MAR} > 0.2$ , whereas considering the effluent samples, 62.92% showed  $\text{MAR} > 0.2$ . For GPC/C-, 4.76% showed  $\text{MAR} > 0.2$  considering the isolates from influent, whereas 2.65% of the bacteria isolated from the effluent displayed  $\text{MAR} > 0.2$ .

**Table 5**  
Frequency of drug-resistant bacteria and multiple antibiotic resistance (MAR) index among microbial groups isolated from pilot-scale anaerobic digesters samples.

Samples	Microbial group	Frequency of resistance (%)	MAR (frequency of determination %)		
			<0.2	>0.2	Range
Influent	GPC/C+ <sup>a</sup>	83.33	50.00	33.33	0.12–0.50
	GPC/C- <sup>b</sup>	28.57	23.81	4.76	0.12–0.25
	ENT <sup>c</sup>	50.00	21.43	28.57	0.10–0.50
	NFR <sup>d</sup>	0	0	0	0
Effluent	GPC/C+	88.76	25.84	62.92	0.12–0.62
	GPC/C-	17.42	14.77	2.65	0.12–0.37
	ENT and others GNR <sup>e</sup>	37.15	10.92	26.23	0.10–0.30
	NFR	29.83	15.79	14.04	0.12–0.62

<sup>a</sup> GPC/C+: Gram-positive cocci/Catalase-positive.

<sup>b</sup> GPC/C-: Gram-positive cocci/Catalase-negative.

<sup>c</sup> ENT: Gram-negative rods from the *Enterobacteriaceae* family.

<sup>d</sup> NFR: non-fermenting Gram-negative rods.

<sup>e</sup> GNR: Gram-negatives rods.

With regards to ENT strains isolated from the influent samples, 28.57% showed MAR > 0.2, whereas for ENT and others GNR isolated from the effluent samples, 26.23% showed MAR > 0.2. For NFR strains isolated from the effluent samples MAR > 0.2 was observed for 14.04% of the isolated bacteria.

Considering the purpose of anaerobic digestion effluent usage as biofertilizer in agriculture, it is important to highlight that such effluents are suitable and accepted only if the sanitary safety is satisfactorily guaranteed. Regarding pathogens, the regulations for use of manure for agricultural purposes are based on three principles: (i) a requirement for treatment, to reduce the amount of pathogens, as anaerobic digestion; (ii) confirmation of treatment; and (iii) assurance of the microbiological quality of the manure (Venglovsky et al., 2006; Martensa and Böhm, 2009). The results obtained in this study, the mesophilic anaerobic digestion of dairy manure causes a reduction of various pathogens. Although, there is another aspect to the agricultural use of effluents biodigesters, the occurrence of resistant bacteria.

In this model, as a matter of concern, an important proportion of bacteria strains recovered from the influent samples exhibited resistant to different antibiotics, and practically the same pattern of resistance was detected in effluent samples. The data show several patterns of resistance from both commensal and opportunistic pathogens which may proliferate through the environment and allow the spread of resistance genes through bacterial genetic recombination with consequences to the human and animal antimicrobial chemotherapy (Walsh et al., 2012).

A few studies have reported the prevalence of antimicrobial resistance among bacteria isolated from effluents of anaerobic digesters. Among these, back in the 80's Abdul and Lloyd (1985) reported the occurrence of resistant *E. coli* strains in mesophilic digestion at 37 °C of pig waste. More recently, Beneragama et al. (2011) observed a persistence of drug-resistant bacteria in thermophilic co-digestion of dairy manure and waste milk at 55 °C until the end of the process. Beneragama et al. (2012) reported a survival of multidrug-resistant bacteria in mesophilic digestion at 37 °C of dairy manure and waste milk after 22 days of digestion, whereas no resistant-bacteria were observed after thermophilic digestion at 55 °C. These data may suggest that temperature is an important characteristic concerning drug-resistant bacteria persistence during anaerobic digestion, along with microbial completion and fermentation length.

The MAR index is widely used to refer multidrug resistant organisms in several environments. The index was introduced in 1983 and no suggestions are made regarding the minimum of antimicrobial agents in the test panel. More recently, new insights are being made regarding the definition of multidrug-resistant bacteria. For example, the definition of multidrug resistant bacteria in clinical field described by Magiorakos et al. (2012) consider oxacillin as a multiresistance marker among staphylococcal populations, when associated, especially to nosocomial environment. High frequency of MAR > 0.2 among the bacteria isolated in the effluent samples it is reasonable to state that as it is performed, the effluent of biodigesters may play an important role as environmental reservoir of antimicrobial resistance genes. The abundance of these multidrug-resistant bacteria may reflect a microbial adaptive response to the empirical use of antimicrobials as prophylactics or therapeutics in cattle farm (Costa et al., 2013). As an ecological consequence, the adaptive mechanisms to the selective pressure imposed by antimicrobials may co-select for bacterial strategies to survive under stress conditions (Diniz et al., 2004).

Parveen et al. (2006) demonstrates regional and seasonal differences in MAR profiles among livestock farms. However, sanitary risks may become higher when antibiotic-resistant microbes are persistent along potentially pathogenic bacteria, as some species isolated in this study. These bacteria are extremely efficient in

horizontal gene transfer and may contribute to the spread and maintenance of resistance genes among different bacterial populations. Considering the biofertilizer as a final product after anaerobic digestion of cattle manure, it is accepted that persistent antimicrobial-resistant bacteria may survive in the soil for up to one month after land application (Nicholson et al., 2005). In this regard, with the increasing interest for biogas production and use of effluents on arable land, becomes it import to consider the persistence of clinically important bacterial populations to sanitary safety and public health management (Bagge et al., 2005; Abubaker et al., 2012). Considering the nature of the cattle manure, it may be suggested that improvement by performing additional treatment before anaerobic digestion would interfere with initial load of methanogenic bacteria, reflecting on the biogas output, but this hypothesis was not evaluated in this study. By the other hand, it has already been reported a decay in potentially pathogenic and drug-resistant bacteria counts during thermophilic digestion (Beneragama et al., 2012). Anyway, considering the digestion at mesophilic range presented, additional steps such as effluent heating would aggregate economical costs in the final process. Other choices of post-treatment system (e.g. stabilization lagoons, ozone oxidation and anaerobic ammonium oxidation) are also suggested to efficiently remove the multidrug resistance bacteria (Berneta and Béline, 2009; Di Iaconi, 2012). Further prospective studies are needed to better discuss the extent of the antimicrobial resistance phenomena in cattle management and its consequence to the cattle manure recycling strategies with implications for human, animal and environmental health.

#### 4. Conclusion

The practice of spreading of effluents from biodigesters into land used for the agriculture production is widely used. However, the presence of antimicrobial-resistant bacteria or putative pathogenic microorganisms may lead to sanitary and ecological risks. Discussions are needed concerning the use of antimicrobial drugs in animal farms and surrounding environments. Environmental regulations should address the sanitary and microbiological safety concerning the use of effluents of ambient temperature biodigesters especially regarding the persistence of putative pathogens and antimicrobial resistant bacteria.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Marlice Teixeira Ribeiro, Júnior César Fernandes, Ernando Ferreira Motta for assistance with sample collection and analysis and all students who collaborated. This study was supported by Grants from Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Research Support Foundation of Minas Gerais (FAPEMIG), Coordination of Improvement of the Personnel of Higher Education (CAPES) and Embrapa Dairy Cattle.

#### References

- Abdul, P., Lloyd, D., 1985. The survival of antibiotic resistant and sensitive *Escherichia coli* strains during anaerobic digestion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 373–377.
- Abubaker, J., Risberg, K., Pell, M., 2012. Biogas residues as fertilisers – effects on wheat growth and soil microbial activities. *Appl. Energ.* 99, 126–134.
- APHA, 2005. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 21st ed. American Water Works Association.
- Alvarez, R., Villca, S., Lidén, G., 2006. Biogas production from llama and cow manure at high altitude. *Biomass Bioenerg.* 30, 66–75.
- Bagge, E., Sahlström, L., Albiñ, A., 2005. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Res.* 39, 4879–4886.
- Beneragama, N., Yusuke, M., Yamashiro, T., Iwasaki, M., Adekunle, L.S., Umetsu, K., 2011. The survival of cefazolin resistant bacteria in thermophilic co-digestion of dairy manure and waste milk. *J. Agric. Sci. Technol.*, 1181–1186.

- Beneragama, N., Iwasaki, M., Lateef, S.A., Yamashiro, T., Ihara, I., Umetsu, K., 2012. The survival of multidrug-resistant bacteria in thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion of dairy manure and waste milk. *Anim. Sci. J.* <http://dx.doi.org/10.1111/asj.12017>.
- Berneta, N., Béline, F., 2009. Challenges and innovations on biological treatment of livestock effluents. *Bioresour. Technol.* 100, 5431–5436.
- Chae, K.J., Jang, A., Yim, S.K., Kim, L.S., 2008. The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. *Bioresour. Technol.* 99, 1–6.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22nd informational supplement. Document M100-S22. CLSI, Wayne, PA.
- Costa, P.M., Loureiro, L., Matos, A.J.F., 2013. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 10, 278–294.
- Di Iaconi, C., 2012. Biological treatment and ozone oxidation: integration or coupling? *Bioresour. Technol.* 106, 63–68.
- Diniz, C.G., Farias, L.M., Carvalho, M.A.R., Rocha, E.R., Smith, C.J., 2004. Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 100–108.
- Dungan, R.S., Klein, M., Leytem, A.B., 2012. Quantification of bacterial indicators and zoonotic pathogens in dairy wastewater ponds. *Appl. Environ. Microb.* 78, 8089–8095.
- Fisher, K., Phillips, C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155, 1749–1757.
- Heuer, H., Schmitt, H., Smalla, K., 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 236–243.
- Holm-Nielsen, J.B., Seadi, T.A., Oleskowicz-Popiel, P., 2009. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresour. Technol.* 100, 5478–5484.
- Karim, K., Klasson, K.T., Hoffmann, R., Drescher, S.R., DePaoli, D.W., Al-Dahhan, M.H., 2005. Anaerobic digestion of animal waste: effect of mixing. *Bioresour. Technol.* 96, 1607–1612.
- Krumperman, P.H., 1983. Multiple antibiotic resistance indexing *Escherichia coli* to identify risk sources of faecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 165–170.
- Kunz, A., Miele, M., Steinmetz, R.L.R., 2009. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. *Bioresour. Technol.* 100, 5485–5489.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281.
- Martens, W., Böhm, R., 2009. Overview of the ability of different treatment methods for liquid and solid manure to inactivate pathogens. *Bioresour. Technol.* 100, 5374–5378.
- Munir, M., Xagorarakis, I., 2011. Levels of antibiotic resistance genes in manure, biosolids, and fertilized soil. *J. Environ. Qual.* 40, 248–255.
- Nicholson, F.A., Groves, S.J., Chambers, B.J., 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresour. Technol.* 96, 135–143.
- Pandey, P.K., Soupir, M.L., 2011. *Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. *AMB Express* 1, 18. <http://dx.doi.org/10.1186/2191-0855-1-18>.
- Parveen, S., Lukasik, J., Scott, T.M., Tamplin, M.L., Portier, K.M., Sheperd, S., Braun, K., Farrah, S.R., 2006. Geographical variation in antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from swine, poultry, beef and dairy cattle farm water retention ponds in Florida. *J. Appl. Microbiol.* 100, 50–57.
- Rico, J.L., Gardia, H., Rico, C., Tejero, I., 2007. Characterization of solid and liquid fractions of dairy manure with regard to their component distribution and methane production. *Bioresour. Technol.* 98, 971–979.
- Sahlström, L., 2003. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresour. Technol.* 87, 161–166.
- Saunders, O., Harrison, J., Fortuna, A.M., Whitefield, E., Bary, A., 2012. Effect of anaerobic digestion and application method on the presence and survivability of *E. coli* and fecal coliforms in dairy waste applied to soil. *Water, Air, Soil Pollut.* 223, 1055–1063.
- Sawant, A.A., Hegde, N.V., Straley, B.A., Donaldson, S.C., Love, B.C., Knabel, S.J., Jayarao, B., 2007. Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 156–163.
- Smith, S.R., Lang, N.L., Cheung, K.H.M., Spanoudaki, K., 2005. Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. *Waste Manage.* 25, 417–425.
- Thames, C.H., Pruden, A., James, R.E., Ray, P.P., Knowlton, K.F., 2012. Excretion of antibiotic resistance genes by dairy calves fed milk replacers with varying doses of antibiotics. *Front Microbiol.* 3, 139.
- Venglovsky, J., Martinez, J., Placha, I., 2006. Hygienic and ecological risks connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture. *Livest. Sci.* 102, 197–203.
- Venglovsky, J., Sasakova, N., Placha, I., 2009. Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresour. Technol.* 100, 5386–5391.
- Walczak, J.J., Xu, S., 2011. Manure as a source of antibiotic-resistant *Escherichia coli* and enterococci: a case study of a Wisconsin, USA Family Dairy Farm. *Water, Air, Soil Pollut.* 219, 579–589.
- Walsh, J.J., Rousk, J., Edwards-Jones, G., Jones, D.L., Prysor Williams, A., 2012. Fungal and bacterial growth following the application of slurry and anaerobic digestate of livestock manure to temperate pasture soils. *Biol. Fert. Soils* 48, 889–897.

## APÊNDICE B. Outras atividades acadêmico-científicas desenvolvidas no período mai/2011 – dez/2013.

### Artigos publicados:

- Juliana Alves Resende, Vânia Lúcia da Silva, Cláudia Oliveira Fontes, Job Alves Souza-Filho, Tamara Lopes de Oliveira, Cintia Marques Coelho, Dioneia Evangelista César, Claudio Galuppo Diniz. **Multidrug-Resistance and Toxic Metal Tolerance of Medically Important Bacteria Isolated from an Aquaculture System. *Microbes and Environments*, v.27, p.449 - 455, 2012.**
- Cláudia Oliveira Fontes, Vânia Lúcia da Silva, Mayara Rodrigues Brandão Paiva, Rafaela Alvim Garcia, Juliana Alves Resende, Alessandra Barbosa Ferreira-Machado, Claudio Galuppo Diniz **Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Virulence Characteristics of mecA-Encoding Coagulase-Negative *Staphylococci* Isolated from Soft Cheese in Brazil. *Journal of Food Science.* , v.00, p.n/a - n/a, 2013.**
- Juliana Alves Resende, Dioneia Evangelista César, Vânia Lúcia da Silva, Cláudia Oliveira Fontes, Alessandro Del'Duca, Cintia Marques Coelho, Claudio Galuppo Diniz. **Seasonal dynamics of microbial community in an aquaculture system for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research (Online)*, 2013. doi:10.1111/are.12281.**

### Estágio no exterior

- Período sanduíche: Setembro/2012 a Setembro/2013 em *Institut National de la Recherche Agronomique*, Narbonne/França (Orientador : Dr. Jean-Jacques Godon)

### Publicação de trabalhos em eventos científicos:

#### Internacionais

- **RESENDE, J. A., SILVA, V. L., OTENIO, M. H., GODON, J. J., DINIZ, C. G.** Prevalence and survival of drug-resistance pathogens in anaerobic digestion treatment of cattle manure In: 13th World Congress on Anaerobic Digestion, 2013, Santiago de Compostela. **13th World Congress on Anaerobic Digestion.** , 2013.
- REIS, C. B., LOPES, R.P.X, SILVA, R.C.B., **RESENDE, J. A.**, RIBEIRO, M.T., FERNANDES, J.C., CARNEIRO, J.C., OTENIO, M. H. Estudo da microbiota e identificação de Microrganismo potencialmente celulolíticos e/ou xilanolíticos em Sistema de manejo de dejetos da bovinocultura leiteira In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos-SP. **XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia - Programa e Resumos.** , 2012.
- **RESENDE, J. A., OLIVEIRA, T. L. R., FORTUNATO, S. O., REIS, C. B., MARANGON, P. B., OTENIO, M. H., SILVA, V. L., DINIZ, C. G.** Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bastonetes Gram negativos de interesse em saúde humana isolados em biodigestores para produção de biogás a partir de dejetos de bovinos leiteiros In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia,

2012, Santos-SP. **XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia - Programa e Resumos.** , 2012.

- **RESENDE, J. A.**, OLIVEIRA, T. L. R., FORTUNATO, S. O., CAMPOS, M. B., COELHO, C. M., CESAR, D. E., SILVA, V. L., DINIZ, C. G. Antimicrobial and toxic metals susceptibility patterns of clinically relevant enterobacteria isolated from aquaculture systems In: 111<sup>o</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology, 2011, New Orleans, Louisiana. **American Society for Microbiology.** , 2011.

### Nacionais

- **RESENDE, J. A.**, OLIVEIRA, T. L. R., FORTUNATO, S. O., OTENIO, M. H., SILVA, V. L., DINIZ, C. G. Avaliação quantitativa de grupos representativos de bactérias patogênicas putativas humanas e produção de biogás a partir da biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros In: 49a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2012, Brasília – DF. **Anais da 49a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia.** , 2012.
- REIS, C. B., CARMO, A. L. M., SILVA, R.C.B, **RESENDE, J. A.**, RIBEIRO, M.T., OTENIO, M. H. Estudo da microbiota e identificação de microrganismo potencialmente celulolíticos e/ou xilanolíticos em sistema de manejo de dejetos da bovinocultura leiteira In: 49a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2012, Brasília – DF. **Anais da 49a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia.** , 2012.
- **RESENDE, J. A.**, OLIVEIRA, T. L. R., CESAR, D. E., DEL'DUCA, A., COELHO, C. M., SILVA, V. L., DINIZ, C. G. Avaliação da comunidade bacteriana presente em sistemas de cultivo de tilápias (*Oreochromis niloticus*) In: 26<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu. **26<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Microbiologia,** 2011.

### Participação em eventos

- 13th World Congress on Anaerobic Digestion. Prevalence and survival of drug-resistance pathogens in anaerobic digestion treatment of cattle manure. 2013. (Congresso).
- 49a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Avaliação quantitativa de grupos representativos de bactérias patogênicas putativas humanas e produção de biogás a partir da biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros. 2012. (Congresso).
- 26<sup>o</sup> Congresso de Microbiologia - CBM. Avaliação da comunidade bacteriana presente em sistemas de cultivo de tilápias (*Oreochromis niloticus*). 2011. (Congresso).
- Produção de energia elétrica a partir de biogás. 2011. (Encontro).

### Atividade docentes:

- Professora colaboradora no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF, no período de maio/2011 a setembro/2012 e

setembro/2013 a dezembro/2013. Disciplinas ministradas a turma da Farmácia (Bacteriologia).

### **Orientação de alunos de pós-graduação *latu sensu* –Especialização:**

- Fabiane Beatriz Rodrigues da Silva. **Análise da frequência e do perfil de susceptibilidade dos agentes causadores de infecções do trato urinário em pacientes hospitalares e comunitários.** 2012. Monografia (Análises Clínicas) - Universidade Federal de Juiz de Fora. Orientadora.

### **Participação na orientação de trabalhos de conclusão de curso de graduação**

- Participação na orientação do Trabalho de conclusão de Curso de Tamara Lopes de Oliveira. (Graduação em Farmácia). Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF. 2012

### **Participação em bancas de trabalhos de conclusão de curso de graduação**

- Participação em banca de Pauline Breguez Marangon. Geração de biogás a partir da biodigestão anaeróbia como alternativa sustentável de energia e minimização dos impactos ambientais provenientes da bovinocultura leiteira (Graduação em Ciência Biológicas). Centro de ensino Superior – CES. 2013.
- Participação em banca de Pedro Pôssa de Castro. Prospecção de linhagens de cocos Gram-positivos produtores de substâncias antagonistas (Graduação em Farmácia). Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF. 2013.

### **Participação na orientação de alunos de graduação (Iniciação científica)**

- Participação na orientação dos trabalhos de iniciação científica de Tamara Lopes de Oliveira. 2011 – 2012.
- Participação na orientação dos trabalhos de iniciação científica de Samuel de Oliveira Fortunato. 2011 – 2012.
- Participação na orientação dos trabalhos de iniciação científica de Camila Branda dos Reis. 2011 – 2012.
- Participação na orientação dos trabalhos de iniciação científica de Pauline Breguez Marangon. 2011 – 2012.
- Participação na orientação dos trabalhos de iniciação científica de Cristina Evaristo. 2011 – 2012.



**APÊNDICE C.** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de CGP/C+ (n = 12) recuperados das amostras dos afluentes de biodigestores em escala-piloto operados a temperatura ambiente , durante as estações verão e inverno.

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)								Índice MAR
		RIF	VAN	AMS	PEN	ERI	OXA	LEV	STX	
17	<i>Staphylococcus capitis</i>	1	0,24	1	2	1	0,24	0,5	19	0,125
18	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,12	0,5	0,12	0,06	0,25	0,06	2	0,3	0
177	<i>Aerococcus viridans</i>	2	1	0,06	0,24	0,06	0,12	1	4,8	0
192	<i>Kytococcus sedentarius</i>	0,06	0,24	0,5	0,5	0,5	0,24	0,5	0,3	0,125
193	<i>Micrococcus species</i>	0,12	0,24	4	16	0,24	0,24	0,5	2,4	0,125
195	<i>Kytococcus sedentarius</i>	0,12	0,24	0,5	4	0,24	0,24	0,5	0,3	0,125
196	<i>Kytococcus sedentarius</i>	0,06	0,5	0,06	0,5	0,06	0,24	0,5	0,3	0,125
817	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,06	1	0,06	1	0,5	0,24	2	0,6	0,125
818	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,06	0,5	0,24	2	1	0,24	8	1,2	0,25
819	<i>Kytococcus sedentarius</i>	0,06	1	0,5	0,5	0,24	0,12	8	0,3	0,25
972	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,24	0,12	0,6	1	0,24	0,06	8	0,5	0,25
997	<i>Staphylococcus capitis</i>	8	2	0,24	16	16	0,24	16	9,5	0,5

Legenda: Antimicrobianos testados: RIF – rifamicina, VAN – vancomicina, AMS - ampicilina/sulbactam, PEN – penicilina, ERI – eritromicina, OXA – oxacilina, LEV – Levofloxacino, STX – Sulfametoxazol/trimetoprim.

**APÊNDICE D.** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de CGP/C- (n = 21) recuperados das amostras dos afluentes de biodigestores em escala-piloto operados a temperatura ambiente , durante as estações verão e inverno.

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)					Índice MAR
		RIF	VAN	PEN	ERI	LEV	
6	<i>Enterococcus faecium</i>	1	4	0,06	0,06	2	0
7	<i>Enterococcus hirae</i>	1	4	0,06	0,06	2	0
8	<i>Enterococcus hirae</i>	0,12	0,24	16	0,24	1	0,125
9	<i>Enterococcus hirae</i>	2	2	32	16	0,24	0,25
177	<i>Aerococcus viridans</i>	2	1	0,24	0,06	1	0,125
178	<i>Enterococcus faecium</i>	1	2	1	0,5	2	0
179	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,06	1	0,06	0,5	0
180	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,06	1	0,06	0,5	0
181	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1	0,06	0,24	0,06	0,5	0
820	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,12	2	0,25	1	2	0,125
821	<i>Leuconostoc citreum</i>	1	2	1	0,06	2	0
822	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,12	2	0,25	1	2	0,125
823	<i>Enterococcus faecium</i>	1	2	0,5	0,06	0,5	0
932	<i>Enterococcus avium</i>	0,06	0,24	0,06	0,06	1	0
969	<i>Enterococcus avium</i>	0,06	0,12	0,12	0,06	1	0
976	<i>Aerococcus viridans</i>	1	2	0,5	0,25	2	0
977	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,12	0,12	0,25	0,25	2	0
979	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	1	2	0,5	0,06	2	0
980	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,06	0,12	0,06	1	0,5	0,125
981	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0,12	0,12	0,06	0,5	0
982	<i>Enterococcus faecium</i>	0,12	2	0,12	0,06	2	0

Legenda: Antimicrobianos testados: RIF – rifamicina, VAN – vancomicina, PEN – penicilina, ERI – eritromicina, LEV – Levofloxacino.

**APÊNDICE E.** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de ENT (n = 28) recuperadas das amostras dos afluentes de biodigestores em escala-piloto operados a temperatura ambiente, durante as estações verão e inverno.

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)										Índice MAR
		MER	GEN	AMI	LEV	STX	CPM	PTZ	CLO	AMS	AMP	
1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,06	1	2	0,06	76	0,06	2	4	4	32	0,2
2	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,06	76	0,06	1	4	4	4	0,1
3	<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,06	0,5	1	0,06	76	0,06	1	4	1	2	0,1
4	<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,06	0,5	1	0,12	76	0,06	1	8	4	8	0,1
5	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,25	1	0,06	76	0,06	1	8	4	8	0,1
10	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,06	128	1	0,24	0,6	0,12	16	32	64	128	0,4
11	<i>Escherichia coli</i>	0,06	128	1	0,24	0,3	0,06	4	4	8	16	0,2
12	<i>Escherichia coli</i>	0,06	64	1	0,24	0,3	0,12	8	4	128	32	0,3
13	<i>Escherichia coli</i>	0,06	64	1	1	38	0,12	4	4	128	32	0,3
16	<i>Salmonella choleraesuis spp.</i>	1	64	32	1	4,8	1	32	4	64	512	0,5
163	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	2	0,06	2,4	0,06	1	4	4	8	0
165	<i>Escherichia coli</i>	0,25	0,5	1	0,06	38	0,06	1	4	4	8	0
202	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	2	0,06	0,6	0,12	4	4	8	16	0,1
810	<i>Escherichia coli</i>	0,25	1	4	0,06	2,4	1	4	8	8	8	0
812	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	4	4	0
813	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	4	4	0
814	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	4	4	4	4	0
816	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	4	4	0
827	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	4	4	4	8	0
828	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	4	4	4	8	0
830	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,06	0,3	0,12	4	4	16	16	0,2
832	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	1	0,06	0,6	0,12	1	8	16	16	0,2
983	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	4	4	0
984	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	4	8	0
985	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,3	0,06	4	4	4	4	0
986	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	8	32	0,1
987	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	4	4	4	4	0
988	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	4	4	0

Legenda: Antimicrobianos testados: MER- Meropenem, GEN – gentamicina, AMI – Amicacina, LEV – Levofloxacino, STX – Sulfametoxazol/trimetoprim, CPM – cefepime, PTZ - piperacilina/tazobactam, CLO – Cloranfenicol, AMS - ampicilina/sulbactam, AMP – ampicilina.

**APÊNDICE F.** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de BGN NF (n = 6) recuperados das amostras dos afluentes de biodigestores em escala-piloto operados a temperatura ambiente, durante as estações verão e inverno.

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)								Índice MAR
		MER	GEN	AMI	LEV	STX	CPM	PTZ	CLO	
164	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,06	0,12	1	0,06	4,8	0,25	1	4	0
166	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,25	0,25	0,5	0,12	2,4	0,12	1	4	0
167	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,06	0,25	0,5	0,12	38	0,5	1	8	0
811	<i>Burkholderia cepacia</i>	0,25	0,12	2	0,06	2,4	4	8	8	0
904	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,25	0,25	0,5	0,06	0,6	0,5	1	4	0
906	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,25	0,25	0,25	0,06	0,6	0,5	1	4	0

Legenda: Antimicrobianos testados: MER- Meropenem, GEN – gentamicina, AMI – Amicacina, STX – Sulfametoxazol/trimetoprim, CPM – cefepime, PTZ - piperacilina/tazobactam, CLO – Cloranfenicol.

**APÊNDICE G.** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de CGP/C+ (n = 89) recuperados das amostras dos efluentes de biodigestores em escala-piloto operados a temperatura ambiente , durante as estações verão e inverno.

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)								Índice MAR
		RIF	VAN	AMS	PEN	ERI	OXA	LEV	STX	
34	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,06	0,24	0,24	1	0,25	0,24	0,24	2,4	0,125
35	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,06	0,24	0,24	1	0,06	0,24	0,12	2,4	0,125
36	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,06	0,24	0,24	1	0,12	0,24	0,24	2,4	0,125
37	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,06	0,12	0,06	0,06	0,06	0,12	0,24	0,3	0
38	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,06	0,24	0,24	1	0,06	0,24	0,24	2,4	0,125
39	<i>Micrococcus luteus</i>	0,06	0,12	0,24	0,5	0,25	0,24	2	0,6	0,25
40	<i>Staphylococcus auricularis</i>	0,06	0,12	0,24	0,5	0,06	0,24	2	2,4	0,25
82	<i>Staphylococcus auricularis</i>	0,06	0,5	0,12	0,25	0,06	0,24	0,06	0,3	0,125
83	<i>Staphylococcus auricularis</i>	0,12	0,5	0,24	0,5	1	0,24	0,24	9,5	0,25
85	<i>Kytococcus sedentarius</i>	8	0,06	0,24	0,24	16	0,24	0,12	2,4	0,25
87	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,06	2	0,06	0,06	2	0,24	0,12	2,4	0,125
126	<i>Micrococcus luteus</i>	0,06	0,5	0,06	0,5	0,5	0,12	0,24	2,4	0,125
289	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,24	0,24	1	2	0,12	0,12	2	9,5	0,25
292	<i>Staphylococcus auricularis</i>	0,06	1	0,5	1	1	0,12	0,5	0,3	0,25
293	<i>Staphylococcus lentus</i>	0,12	0,24	0,5	0,5	0,06	0,5	0,24	0,3	0,125
294	<i>Staphylococcus auricularis</i>	0,06	0,24	0,12	0,25	0,25	0,24	2	4,8	0,25
345	<i>Kytococcus sedentarius</i>	0,06	0,24	1	4	1	0,12	0,06	38	0,25
346	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,06	2	0,5	2	16	0,24	0,5	0,6	0,25
347	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,06	0,5	1	0,5	1	0,24	2	0,6	0,375
348	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,06	0,5	1	0,06	0,06	0,24	0,06	0,6	0
349	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,06	0,24	4	8	2	0,24	2	4,8	0,125
350	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,06	0,24	0,5	4	0,48	0,24	0,24	4,8	0,125
390	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,12	0,24	2	16	1	0,5	0,5	38	0,375
391	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,24	0,5	2	1	0,12	0,24	0,5	2,4	0,125
392	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,06	0,5	0,24	0,25	0,25	0,12	0,24	2,4	0,125
393	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,06	2	2	8	16	0,5	0,24	0,6	0,375
394	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,06	1	0,24	2	0,25	0,12	2	2,4	0,25
398	<i>Kytococcus sedentarius</i>	0,06	2	0,5	2	16	0,12	0,5	0,6	0,25
399	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	1	2	0,5	8	2	0,5	0,12	1,2	0,375
401	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,24	2	16	8	2	0,24	0,12	1,2	0,375
448	<i>Micrococcus luteus</i>	0,06	0,24	0,5	2	0,5	0,24	0,5	1,2	0,125
449	<i>Micrococcus luteus</i>	0,06	0,24	0,24	1	0,06	0,24	0,5	1,2	0,125
450	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,06	0,24	0,06	0,24	0,24	0,12	0,06	1,2	0
564	<i>Kytococcus sedentarius</i>	0,12	0,24	1	2	0,5	0,12	0,5	0,3	0,125
567	<i>Staphylococcus lentus</i>	0,24	0,24	0,24	0,24	0,06	0,24	1	0,6	0
399	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	1	2	0,5	8	2	0,5	0,12	1,2	0,375
448	<i>Micrococcus luteus</i>	0,06	0,24	0,5	2	0,5	0,24	0,5	1,2	0,125
449	<i>Micrococcus luteus</i>	0,06	0,24	0,24	1	0,06	0,24	0,5	1,2	0,125
450	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,06	0,24	0,06	0,24	0,24	0,12	0,06	1,2	0
564	<i>Kytococcus sedentarius</i>	0,12	0,24	1	2	0,5	0,12	0,5	0,3	0,125
567	<i>Staphylococcus lentus</i>	0,24	0,24	0,24	0,24	0,06	0,24	1	0,6	0
569	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,12	1	0,5	1	32	0,24	0,5	0,6	0,25
571	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,24	1	2	4	8	0,24	0,5	0,6	0,25
628	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,12	2	0,5	8	16	0,24	0,12	1,2	0,25
629	<i>Staphylococcus lentus</i>	0,06	2	0,06	0,24	0,06	0,24	0,5	1,2	0
664	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,06	0,24	2	1	16	0,5	0,5	0,3	0,375
665	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,06	0,24	0,12	0,06	0,12	0,24	0,06	4,8	0
666	<i>Staphylococcus lentus</i>	0,06	0,24	1	4	1	0,24	0,5	1,2	0,25
714	<i>Staphylococcus hominis</i>	0,06	0,24	1	2	0,12	0,24	0,24	1,2	0,125
716	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,06	1	0,24	0,5	1	0,24	2	2,4	0,375
805	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,06	0,24	0,06	0,12	0,06	0,24	2	0,6	0,125

## APÊNDICE G. continuação...

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)								Índice MAR
		RIF	VAN	AMS	PEN	ERI	OXA	LEV	STX	
863	<i>Kytococcus sedentarius</i>	1	0,06	2	16	1	0,06	64	76	0,5
864	<i>Kytococcus sedentarius</i>	1	0,06	2	16	1	0,06	64	76	0,5
867	<i>Kytococcus sedentarius</i>	0,24	0,06	2	8	0,24	0,06	64	9,5	0,25
868	<i>Micrococcus luteus</i>	0,06	1	2	8	0,24	0,24	64	9,5	0,25
879	<i>Kytococcus sedentarius</i>	2	1	0,06	0,12	0,5	0,24	64	9,5	0,25
880	<i>Kytococcus sedentarius</i>	2	1	0,06	0,12	0,5	0,24	64	4,8	0,25
912	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,06	1	0,5	0,24	0,06	0,12	2	0,3	0,125
913	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,06	1	0,5	1	0,24	0,06	8	0,3	0,25
935	<i>Kytococcus sedentarius</i>	1	1	0,06	0,12	1	0,12	64	9,5	0,25
936	<i>Staphylococcus capitis</i>	8	2	0,24	2	16	0,5	64	9,5	0,625
937	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,5	1	0,06	0,12	0,5	0,24	64	2,4	0,125
938	<i>Staphylococcus hominis</i>	2	1	0,06	0,24	0,5	0,24	8	1,2	0,25
998	<i>Pediococcus species</i>	0,12	0,12	0,24	1	0,24	0,24	2	1,2	0,25
1003	<i>Micrococcus luteus</i>	0,06	0,12	0,24	1	0,24	0,24	8	1,2	0,25
1004	<i>Kytococcus sedentarius</i>	0,06	0,06	0,24	1	0,24	0,24	1	1,2	0
1083	<i>Kocuria varians/rosea</i>	0,06	0,12	0,24	0,12	0,06	0,06	8	9,5	0,125
1085	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,06	0,12	0,06	0,06	0,06	0,06	1	0,3	0
1189	<i>Kytococcus sedentarius</i>	2	2	0,06	0,12	0,5	0,24	64	1,2	0,25
1193	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,5	0,06	0,06	0,06	0,12	0,24	1	1,2	0
1297	<i>Staphylococcus lentus</i>	0,24	0,24	1	1	0,24	0,24	16	2,4	0,25
1299	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,24	0,06	2	8	0,24	0,24	8	0,3	0,25
1300	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,5	0,12	2	8	0,24	0,24	2	0,6	0,25
1302	<i>Staphylococcus capitis</i>	1	0,12	1	4	0,24	0,06	8	1,2	0,25
1314	<i>Kytococcus sedentarius</i>	2	1	0,06	0,12	0,5	0,24	64	2,4	0,25
1315	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	1	0,06	0,12	0,5	0,24	64	2,4	0,25
1340	<i>Micrococcus luteus</i>	0,12	0,12	0,06	16	0,06	0,24	64	76	0,5
1345	<i>Micrococcus luteus</i>	0,5	0,06	1	8	0,5	0,06	16	4,8	0,25
1396	<i>Staphylococcus hominis</i>	0,5	0,06	1	1	0,24	0,24	1	0,6	0,125
1400	<i>Kytococcus sedentarius</i>	0,06	0,06	1	16	1	0,24	8	128	0,5
1401	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,06	0,12	0,06	0,06	0,06	0,06	2	9,5	0,125
1402	<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,24	0,06	0,5	2	0,12	0,12	2	9,5	0,25
1405	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,06	0,24	0,06	2	0,24	0,24	64	9,5	0,25
1407	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,12	0,24	0,06	2	0,24	0,24	64	9,5	0,25
1477	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,06	0,24	0,06	1	0,24	0,24	64	9,5	0,25
1482	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,06	0,24	0,24	1	0,12	0,12	16	9,5	0,25
1483	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,06	0,24	0,24	1	0,12	0,06	16	9,5	0,25
1560	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,06	0,24	0,24	2	0,24	0,24	64	9,5	0,25
1562	<i>Staphylococcus lentus</i>	0,06	0,06	0,5	1	0,12	0,24	2	0,6	0,25
1629	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,06	0,24	0,24	1	0,24	0,24	64	9,5	0,25
1632	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,06	0,24	0,24	1	0,24	0,12	64	9,5	0,25
1637	<i>Staphylococcus capitis</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	1	1,2	0
1670	<i>Staphylococcus hominis</i>	0,06	0,5	0,5	4	0,06	0,24	0,24	1,2	0,125
1732	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,5	2	0,6	16	2	0,5	1	1,2	0,375
1734	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	2	0,6	16	2	0,5	1	1,2	0,375

Legenda: Antimicrobianos testados: RIF – rifamicina, VAN – vancomicina, AMS - ampicilina/sulbactam, PEN – penicilina, ERI – eritromicina, OXA – oxacilina, LEV – Levofloxacino, STX – Sulfametoxazol/trimetoprim.

**APÊNDICE H.** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de CGP/C- (n = 264) recuperados das amostras dos efluentes de biodigestores em escala-piloto operados a temperatura ambiente , durante as estações verão e inverno.

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)					Índice MAR
		RIF	VAN	PEN	ERI	LEV	
41	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	2	0,24	8	0,06	1	0
43	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	1	4	0,12	0,06	1	0
44	<i>Enterococcus faecium</i>	2	1	1	0,06	1	0
45	<i>Enterococcus faecium</i>	1	2	1	0,5	2	0
46	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,12	0,12	0,06	0,06	0
47	<i>Enterococcus faecium</i>	1	2	0,24	0,5	2	0
76	<i>Enterococcus faecium</i>	0,5	2	1	0,06	2	0
77	<i>Aerococcus viridans</i>	0,06	0,12	0,06	0,06	0,12	0
78	<i>Aerococcus viridans</i>	0,06	0,12	0,06	0,06	0,06	0
80	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,12	0,06	0,06	0,12	0
107	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,12	0,06	0,06	0,06	0
108	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,12	2	0,06	0,12	0
110	<i>Enterococcus faecium</i>	0,5	2	1	2	2	0,125
111	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,12	0,12	0,06	0,06	0
112	<i>Enterococcus faecium</i>	0,5	2	0,24	0,06	1	0
114	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	2	0,12	0,06	0,12	0
115	<i>Enterococcus durans</i>	1	0,12	1	0,06	0,12	0
118	<i>Streptococcus bovis</i>	0,06	0,24	0,24	0,48	0,5	0
119	<i>Streptococcus bovis</i>	0,5	0,12	0,06	0,06	1	0
123	<i>Enterococcus hirae</i>	0,5	0,12	0,24	0,12	0,12	0
124	<i>Gemella morbillorum</i>	0,5	4	8	2	0,06	0,2
182	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	0,5	4	0,24	2	2	0,125
183	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	0,5	2	0,24	2	2	0,125
184	<i>Enterococcus hirae</i>	0,12	1	1	0,12	0,5	0
186	<i>Enterococcus faecium</i>	0,5	4	1	0,12	0,5	0
187	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,12	1	0,12	0,5	0
189	<i>Enterococcus faecium</i>	1	2	0,24	0,5	1	0
190	<i>Enterococcus faecium</i>	1	2	1	0,5	2	0
191	<i>Enterococcus faecium</i>	0,5	2	1	0,25	2	0
237	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,5	1	0,06	0,5	0
238	<i>Enterococcus hirae</i>	0,12	0,5	1	0,06	0,5	0
239	<i>Enterococcus hirae</i>	0,12	0,5	1	0,12	0,5	0
240	<i>Enterococcus hirae</i>	0,12	0,5	1	0,12	0,5	0
241	<i>Enterococcus hirae</i>	0,12	0,5	1	0,12	0,5	0
242	<i>Enterococcus hirae</i>	0,12	0,06	1	0,12	0,5	0
243	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,25	1	0,12	0,5	0
244	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,25	1	0,12	0,5	0
246	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,25	0,12	0,12	0,5	0
277	<i>Streptococcus bovis</i>	0,12	0,24	0,24	0,06	0,06	0
278	<i>Streptococcus equinus</i>	0,12	0,24	0,24	0,48	0,06	0
279	<i>Streptococcus equinus</i>	0,06	0,24	0,24	0,06	1	0
280	<i>Streptococcus equinus</i>	0,12	0,24	0,24	0,06	0,5	0
281	<i>Streptococcus bovis</i>	0,06	0,24	0,24	0,06	0,5	0
282	<i>Streptococcus bovis</i>	0,12	0,24	0,5	0,06	0,5	0
283	<i>Streptococcus bovis</i>	0,12	0,24	0,5	0,06	0,5	0
284	<i>Streptococcus bovis</i>	0,12	0,24	0,5	0,06	0,06	0
315	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,25	1	0,12	0,5	0
316	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,5	1	0,12	0,5	0
317	<i>Enterococcus hirae</i>	0,5	2	2	0,06	0,06	0
318	<i>Enterococcus hirae</i>	0,12	0,5	1	0,06	0,5	0
319	<i>Streptococcus bovis</i>	0,06	0,06	0,12	0,06	2	0
320	<i>Enterococcus hirae</i>	0,12	0,5	1	0,06	0,5	0

## APÊNDICE H. continuação...

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)					Índice MAR
		RIF	VAN	PEN	ERI	LEV	
321	<i>Enterococcus hirae</i>	0,12	0,06	1	0,06	0,5	0
322	<i>Aerococcus viridans</i>	0,06	0,06	1	0,06	0,5	0
323	<i>Enterococcus hirae</i>	0,12	0,06	1	0,06	0,5	0
324	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,25	1	0,12	0,5	0
336	<i>Streptococcus salivarius</i>	0,06	0,25	1	0,06	1	0
337	<i>Streptococcus bovis</i>	0,06	0,06	0,12	0,06	1	0
338	<i>Streptococcus bovis</i>	0,12	0,24	0,5	0,06	0,24	0
339	<i>Aerococcus viridans</i>	0,06	0,06	0,12	0,06	1	0
340	<i>Streptococcus salivarius</i>	0,06	0,06	0,12	0,06	0,5	0
341	<i>Streptococcus bovis</i>	0,06	0,24	0,12	0,06	0,06	0
342	<i>Streptococcus vestibularis</i>	0,06	0,5	0,5	0,06	1	0
343	<i>Streptococcus vestibularis</i>	0,12	0,24	0,5	0,06	0,06	0
344	<i>Streptococcus vestibularis</i>	0,06	0,24	0,5	0,06	0,06	0
344	<i>Streptococcus equinus</i>	0,06	0,06	0,12	0,06	0,5	0
352	<i>Aerococcus viridans</i>	0,06	0,06	0,24	0,06	0,5	0
358	<i>Streptococcus vestibularis</i>	0,24	4	8	2	2	0,125
365	<i>Streptococcus vestibularis</i>	0,06	0,06	0,12	0,06	0,5	0
385	<i>Enterococcus avium</i>	0,5	4	0,5	0,06	4	0,125
386	<i>Enterococcus avium</i>	0,5	2	0,5	0,5	0,5	0
388	<i>Enterococcus avium</i>	0,5	4	0,5	0,06	4	0,125
389	<i>Enterococcus avium</i>	0,5	2	0,24	0,06	1	0
407	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,06	0,24	0,06	1	0
437	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,25	1	0,06	0,5	0
438	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	4	1	0,06	1	0
439	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	4	0,5	0,06	1	0
440	<i>Enterococcus faecium</i>	0,5	2	1	2	2	0,125
441	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,06	2	0,5	0,06	1	0
442	<i>Enterococcus faecium</i>	0,5	4	1	0,06	4	0,125
443	<i>Enterococcus faecium</i>	0,5	2	1	2	1	0,125
447	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,12	0,24	0,06	1	0
489	<i>Enterococcus faecium</i>	0,5	2	1	2	1	0,125
490	<i>Enterococcus raffinosus</i>	0,5	2	0,24	0,06	1	0
491	<i>Enterococcus raffinosus</i>	0,06	2	0,24	0,06	1	0
492	<i>Enterococcus raffinosus</i>	0,06	1	0,24	0,06	1	0
493	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,5	0,24	0,06	0,06	0
494	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,06	4	0,24	0,06	1	0
495	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,06	4	0,24	0,06	1	0
496	<i>Enterococcus hirae</i>	0,12	0,5	0,24	0,06	0,5	0
506	<i>Streptococcus equinus</i>	0,06	4	1	0,06	1	0
507	<i>Streptococcus equinus</i>	0,06	0,12	0,06	0,06	1	0
530	<i>Streptococcus salivarius</i>	0,06	1	0,24	0,06	0,5	0
572	<i>Enterococcus raffinosus</i>	0,06	1	0,5	16	0,12	0,4
573	<i>Enterococcus hirae</i>	0,5	4	0,24	0,06	1	0
589	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	1	0,24	0,06	1	0
590	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	1	0,24	0,06	1	0
591	<i>Aerococcus viridans</i>	0,5	4	0,24	0,06	2	0
592	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,5	4	0,24	0,06	1	0
593	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,5	4	0,24	0,06	1	0
594	<i>Enterococcus hirae</i>	0,5	2	0,24	0,06	4	0,125
595	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,5	4	0,5	0,06	1	0
653	<i>Enterococcus hirae</i>	0,5	0,5	0,5	0,06	0,5	0
654	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,06	1	0,24	0,06	0,06	0
655	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,06	0,5	0,5	0,06	1	0
656	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,06	0,5	0,5	0,06	1	0
657	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	1	4	0,24	0,12	2	0



## APÊNDICE H. continuação...

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)					Índice MAR
		RIF	VAN	PEN	ERI	LEV	
658	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,5	0,24	0,06	0,5	0
659	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	4	0,06	0,06	2	0
660	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,06	0,5	0,24	0,06	2	0
661	<i>Enterococcus faecium</i>	0,5	2	0,06	0,06	1	0
662	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,5	0,5	0,06	1	0
663	<i>Enterococcus avium</i>	0,06	2	0,24	0,24	0,5	0
719	<i>Enterococcus faecium</i>	0,12	2	2	1	2	0,125
720	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,5	0,5	0,06	0,5	0
721	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,5	1	0,25	0,5	0
722	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,5	1	0,25	0,5	0
723	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,06	2	0,5	0,5	0,5	0
724	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,5	1	0,25	0,5	0
725	<i>Enterococcus faecium</i>	1	1	0,06	0,06	2	0
726	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,12	0,5	0,25	0,5	0
770	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	2	0,5	0,25	0,5	0
772	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,12	0,5	0,06	0,5	0
773	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,5	0,06	0,06	0,5	0
774	<i>Enterococcus faecium</i>	1	2	0,5	0,06	2	0
775	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,5	0,06	0,12	0,5	0
776	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,5	1	0,12	0,5	0
777	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	2	2	1	2	0,125
778	<i>Pediococcus pentosacens</i>	0,24	0,5	0,5	1	0,5	0,125
779	<i>Enterococcus raffinosus</i>	0,24	2	1	1	2	0,125
849	<i>Enterococcus hirae</i>	0,24	0,5	0,5	1	2	0,125
850	<i>Enterococcus hirae</i>	1	2	0,06	0,25	0,5	0
851	<i>Enterococcus faecium</i>	0,24	2	0,12	1	2	0,125
853	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,12	2	0,25	1	0,5	0,125
855	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,06	0,5	0,5	0,06	0,5	0
856	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,24	0,5	0,5	0,25	2	0
920	<i>Enterococcus hirae</i>	0,12	0,5	0,5	0,25	0,5	0
921	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,5	0,5	1	2	0,125
922	<i>Enterococcus hirae</i>	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0
923	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,12	2	0,25	0,25	0,5	0
927	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,06	0,5	2	1	2	0,125
929	<i>Enterococcus durans</i>	0,12	2	0,5	1	2	0,125
930	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,5	0,06	0,25	1	0
931	<i>Enterococcus faecium</i>	0,12	2	0,5	0,06	2	0
1005	<i>Streptococcus bovis</i>	0,06	0,12	0,06	0,5	2	0
1006	<i>Enterococcus faecium</i>	1	2	0,12	0,06	2	0
1008	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,24	0,25	0,06	2	0
1009	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	2	0
1013	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,12	4	32	2	4	0,375
1014	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,06	0,5	16	0,5	2	0,125
1015	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,12	16	0,5	4	0,25
1016	<i>Enterococcus faecium</i>	0,24	4	32	2	4	0,375
1018	<i>Enterococcus faecium</i>	0,24	2	32	2	4	0,375
1077	<i>Aerococcus viridans</i>	0,06	0,12	0,12	16	1	0,125
1081	<i>Aerococcus viridans</i>	0,06	0,12	0,06	16	2	0,125
1096	<i>Enterococcus faecium</i>	1	2	0,5	0,06	2	0
1098	<i>Enterococcus avium</i>	0,12	2	0,5	0,06	2	0
1099	<i>Enterococcus avium</i>	0,5	2	2	0,06	2	0
1100	<i>Enterococcus faecium</i>	0,5	2	2	1	2	0,125
1101	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,06	2	0,5	1	0,5	0,125
1102	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,24	2	2	1	2	0,125

## APÊNDICE H. continuação...

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)					Índice MAR
		RIF	VAN	PEN	ERI	LEV	
1103	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,06	0,5	0,12	0,12	2	0
1127	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	1	0,24	0,12	0,06	1	0
1127	<i>Streptococcus bovis</i>	2	0,12	0,12	0,06	1	0
1128	<i>Streptococcus equinus</i>	0,06	0,12	0,06	0,06	2	0
1129	<i>Streptococcus uberis</i>	2	0,12	0,12	0,06	0,5	0
1129	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0,24	0,12	0,06	2	0
1130	<i>Streptococcus uberis</i>	2	0,12	0,12	0,06	0,5	0
1331	<i>Aerococcus urinae</i>	0,5	0,12	0,12	0,06	1	0
1334	<i>Enterococcus avium</i>	0,06	0,12	0,12	1	0,25	0,125
1335	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	2	4	0,25	0,06	2	0
1336	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	2	4	0,25	0,06	2	0
1337	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,12	2	0,25	1	2	0,125
1338	<i>Enterococcus avium</i>	1	2	0,25	0,06	2	0
1397	<i>Aerococcus viridans</i>	0,24	0,12	0,12	0,06	0,5	0
1404	<i>Aerococcus viridans</i>	0,24	0,12	0,06	0,06	0,5	0
1408	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,12	2	0,25	0,06	1	0
1409	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,12	4	0,25	0,06	1	0
1413	<i>Enterococcus faecium</i>	1	0,12	0,12	0,5	1	0
1415	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,06	2	0,5	0,06	2	0
1416	<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0,06	0,12	0,12	0,06	0,25	0
1417	<i>Enterococcus faecium</i>	0,06	0,5	0,5	0,12	1	0
1418	<i>Enterococcus durans</i>	0,06	2	0,25	1	2	0,125
1419	<i>Aerococcus urinae</i>	0,06	2	0,25	1	2	0,125
1430	<i>Aerococcus urinae</i>	0,06	0,5	0,06	0,06	2	0
1478	<i>Aerococcus viridans</i>	0,06	0,12	0,24	1	0,5	0,125
1479	<i>Aerococcus viridans</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,5	0
1481	<i>Aerococcus viridans</i>	0,24	0,06	0,12	0,06	0,5	0
1486	<i>Enterococcus durans</i>	2	4	0,25	0,06	2	0
1487	<i>Enterococcus durans</i>	1	2	0,25	0,06	2	0
1488	<i>Enterococcus durans</i>	0,06	0,5	0,06	0,12	0,25	0
1489	<i>Enterococcus durans</i>	2	4	1	0,06	2	0
1490	<i>Enterococcus avium</i>	0,06	0,12	0,06	0,06	0,25	0
1504	<i>Leuconostoc citreum</i>	0,06	0,5	0,06	0,06	1	0
1505	<i>Leuconostoc citreum</i>	0,06	0,5	0,06	0,06	2	0
1506	<i>Streptococcus bovis</i>	0,06	0,5	0,06	0,06	2	0
1507	<i>Streptococcus bovis</i>	0,06	0,5	0,06	0,06	1	0
1510	<i>Streptococcus salivarius</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0
1548	<i>Aerococcus viridans</i>	0,06	0,06	1	0,06	1	0
1549	<i>Enterococcus avium</i>	1	0,06	1	0,12	1	0
1551	<i>Aerococcus viridans</i>	0,5	0,06	1	0,12	1	0
1552	<i>Enterococcus avium</i>	0,06	0,06	0,24	0,12	1	0
1553	<i>Enterococcus avium</i>	0,12	0,5	4	0,5	0,24	0
1554	<i>Streptococcus bovis</i>	2	4	8	16	2	0,125
1555	<i>Enterococcus avium</i>	0,12	4	8	2	2	0,125
1556	<i>Enterococcus avium</i>	4	4	16	16	0,24	0,6
1561	<i>Aerococcus viridans</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,5	0
1564	<i>Aerococcus viridans</i>	0,06	0,06	0,12	0,12	0,5	0
1619	<i>Enterococcus avium</i>	0,06	1	4	2	0,24	0,2

## APÊNDICE H. continuação...

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)					Índice MAR
		RIF	VAN	PEN	ERI	LEV	
1621	<i>Enterococcus avium</i>	4	4	4	0,06	1	0
1641	<i>Streptococcus bovis</i>	0,06	0,24	4	0,12	1	0
1656	<i>Streptococcus bovis</i>	0,06	0,5	0,24	0,06	0,5	0
1658	<i>Leuconostoc citreum</i>	0,06	0,5	0,24	0,06	1	0
1660	<i>Streptococcus bovis</i>	0,06	0,5	0,24	0,06	0,5	0
1661	<i>Aerococcus viridans</i>	0,12	0,5	0,24	0,06	0,5	0
1692	<i>Enterococcus avium</i>	1	4	1	0,06	0,5	0
1693	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,5	32	0,12	4	0,25
1694	<i>Enterococcus hirae</i>	0,12	0,5	8	0,12	0,5	0
1695	<i>Enterococcus hirae</i>	0,24	0,5	8	0,12	1	0
1720	<i>Streptococcus bovis</i>	0,06	0,5	0,24	0,06	1	0
1724	<i>Streptococcus bovis</i>	0,06	0,5	0,5	0,06	2	0
1737	<i>Streptococcus bovis</i>	0,12	0,5	0,5	0,06	2	0
1753	<i>Enterococcus avium</i>	0,24	0,5	0,5	0,12	0,5	0
1755	<i>Aerococcus urinae</i>	0,24	4	4	0,06	1	0
1756	<i>Enterococcus hirae</i>	1	4	2	0,06	2	0
1757	<i>Enterococcus hirae</i>	0,24	1	4	0,06	0,5	0
1758	<i>Enterococcus hirae</i>	0,06	0,5	4	2	0,5	0,125
1760	<i>Streptococcus salivarius</i>	0,06	0,5	0,24	0,06	1	0
1761	<i>Enterococcus avium</i>	8	0,5	8	0,12	0,5	0
1765	<i>Streptococcus bovis</i>	0,06	0,5	0,5	0,06	2	0
1766	<i>Streptococcus uberis</i>	4	0,5	8	0,12	1	0
1767	<i>Streptococcus bovis</i>	0,06	0,5	0,5	0,06	1	0
1768	<i>Streptococcus bovis</i>	0,12	0,5	0,5	0,06	2	0
1770	<i>Streptococcus criceti</i>	0,12	0,5	0,5	0,06	1	0
1793	<i>Streptococcus equinus</i>	0,06	0,5	0,5	0,06	1	0
1797	<i>Streptococcus bovis</i>	0,12	0,5	0,5	0,06	1	0

**APÊNDICE I.** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de ENT (n = 176) recuperados das amostras dos efluentes de biodigestores em escala-piloto operados a temperatura ambiente, durante as estações verão e inverno.

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)										Índice MAR
		MER	GEN	AMI	LEV	STX	CPM	PTZ	CLO	AMS	AMP	
28	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,06	0,25	0,06	1,2	0,06	1	4	4	8	0
31	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,12	38	0,06	1	4	4	8	0
72	<i>Escherichia coli</i>	0,25	1	2	0,06	9,5	0,06	1	1	4	4	0
75	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	1	0,06	9,5	0,06	1	1	4	8	0
97	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	1	0,06	9,5	0,06	1	8	4	8	0
98	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,5	9,5	0,06	1	8	4	8	0
105	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,06	38	0,06	1	4	4	8	0
249	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	1	0,06	2,4	0,06	1	4	4	8	0
250	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	2	0,06	2,4	0,06	1	4	4	8	0
253	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,06	19	0,06	0,12	0,06	4	8	0
257	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	1	0,06	0,3	0,06	1	4	8	16	0,1
259	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	2	0,06	4,8	0,06	1	4	4	8	0
261	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	2	0,06	4,8	0,06	1	4	4	8	0
263	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,06	0,3	0,06	4	4	8	16	0,1
266	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	2	0,06	0,3	0,12	4	32	8	16	0,2
267	<i>Escherichia coli</i>	0,5	0,5	2	0,06	0,3	0,12	32	4	>64	256	0,3
268	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,06	1	2	0,06	38	0,06	1	0,5	128	>1024	0,2
273	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,06	0,5	2	0,06	4,8	0,06	1	0,5	128	512	0,2
305	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	2	0,06	2,4	0,06	1	4	4	8	0
309	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,06	2,4	0,06	1	8	4	8	0
310	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,06	9,5	0,06	1	8	4	8	0
325	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,06	2	4	0,06	4,8	0,06	0,06	0,5	128	256	0,2
326	<i>Morganella morganii</i>	0,25	0,5	2	0,06	1,2	0,06	2	8	>64	64	0,2
330	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,06	0,5	2	1	1,2	0,12	8	0,48	>64	256	0,2
331	<i>Morganella morganii</i>	0,25	0,5	2	0,06	0,6	0,12	4	8	>64	64	0,2
333	<i>Morganella morganii</i>	0,25	0,5	2	0,06	1,2	0,06	4	16	>64	64	0,3
376	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,25	1	0,06	4,8	0,06	1	8	4	8	0
383	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	4	0,06	2,4	0,06	1	4	4	4	0
428	<i>Escherichia coli</i>	0,5	0,5	2	0,06	1,2	0,06	1	8	4	4	0
463	<i>Salmonella choleraesuis</i>	0,06	0,5	2	0,06	4,8	0,06	1	8	8	256	0,1
481	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	2	0,06	4,8	0,06	1	8	4	8	0
500	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	4	0,06	0,3	0,12	4	4	16	16	0,2
502	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,25	4	0,06	4,8	0,06	1	4	8	16	0,1
504	<i>Morganella morganii</i>	0,12	0,5	1	0,06	1,2	0,12	1	16	>64	32	0,3
533	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,25	0,5	0,06	4,8	0,25	1	8	4	8	0
535	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	2	0,06	4,8	0,06	1	8	4	8	0
538	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	0,5	0,06	4,8	0,06	1	8	4	8	0
539	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,25	1	0,06	2,4	0,06	1	4	4	16	0,1
556	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,5	1	0,5	0,06	38	0,06	0,25	8	38	256	0,2
558	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	1	1	0,25	38	0,06	1	1	512	>1024	0,2
559	<i>Morganella morganii</i>	0,25	0,5	1	0,12	0,3	0,06	2	4	>64	32	0,2
560	<i>Serratia marcescens</i>	0,06	1	4	0,24	4,8	0,12	4	16	64	32	0,3
562	<i>Escherichia coli</i>	0,5	0,5	0,48	0,06	0,3	0,12	4	4	>64	256	0,2

## APÊNDICE I. continuação...

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)										Índice MAR
		MER	GEN	AMI	LEV	STX	CPM	PTZ	CLO	AMP	AMP	
578	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	2	0,25	4,8	0,06	1	4	4	8	0
579	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	1	0,06	4,8	0,06	1	4	4	8	0
581	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,25	1	0,06	4,8	0,06	1	4	4	4	0
598	<i>Morganella morganii</i>	0,25	1	2	0,06	0,6	0,06	2	4	>64	64	0,2
601	<i>Morganella morganii</i>	0,25	128	2	0,06	0,6	0,06	2	4	>64	64	0,3
604	<i>Morganella morganii</i>	0,25	0,5	1	0,12	0,6	0,06	1	16	>64	64	0,3
648	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,25	0,5	0,06	4,8	0,06	1	4	8	16	0,1
649	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	4	0,06	2,4	0,06	1	1	8	8	0
651	<i>Raoultella terrigena</i>	0,06	0,25	1	0,06	9,5	0,06	1	1	4	8	0
702	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0,5	1	0,06	0,6	0,06	8	4	>64	256	0,2
741	<i>Morganella morganii</i>	0,25	0,5	1	0,06	0,3	0,06	2	4	>64	64	0,2
761	<i>Serratia marcescens</i>	0,06	1	4	0,25	38	8	1	16	4	16	0,2
766	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,25	0,5	0,06	9,5	0,06	1	4	4	8	0
768	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,25	0,5	0,06	9,5	0,06	1	4	4	8	0
791	<i>Morganella morganii</i>	0,25	2	4	0,25	9,5	0,06	0,25	4	64	512	0,2
793	<i>Morganella morganii</i>	0,06	1	4	0,5	9,5	0,06	0,25	32	64	512	0,3
795	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,25	1	0,06	2,4	0,06	0,5	32	128	512	0,3
840	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	8	8	0
841	<i>Escherichia coli</i>	0,25	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	4	4	0
842	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	8	8	0
843	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	4	4	0
845	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	4	4	0
846	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	4	4	8	8	0
846	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	1	0,06	0,3	0,12	4	8	8	16	0,1
869	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	4	4	0
871	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	2	0,06	0,3	0,06	1	8	8	16	0,1
873	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	4	4	4	8	0
893	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,3	0,06	1	4	4	4	0
895	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	2	0,12	0,3	0,06	4	8	8	16	0,1
905	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	2	0,06	0,6	0,06	2	4	4	4	0
909	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	4	4	0
911	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	8	8	0
942	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	4	4	0
943	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	0,25	0,06	0,6	0,06	2	4	4	4	0
944	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	2	0,06	0,3	0,12	4	8	16	16	0,2
947	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	2	0,06	0,6	0,06	1	8	8	16	0,1
948	<i>Morganella morganii</i>	0,12	1	4	0,06	0,3	0,06	1	4	>64	32	0,2
956	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,3	0,06	2	4	4	4	0
957	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,3	0,06	2	4	8	8	0
958	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	2,4	0,06	2	4	8	8	0
961	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	2,4	0,06	2	4	4	4	0
962	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	4,8	0,06	2	4	8	8	0
963	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	4	8	0
964	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	4	4	0
965	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	8	8	0
966	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	8	8	0

## APÊNDICE I. continuação...

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)										Índice MAR
		MER	GEN	AMI	LEV	STX	CPM	PTZ	CLO	AMP	AMP	
1049	<i>Providencia stuartii</i>	0,25	0,5	0,48	0,06	0,3	0,06	1	32	64	128	0,3
1086	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	4	4	0
1087	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	4	4	16	16	0,2
1088	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	4	4	8	8	0
1089	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	8	8	0
1090	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	4	4	16	16	0,2
1093	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	4	4	0
1094	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	0,25	0,06	0,6	0,06	1	4	4	4	0
1095	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	8	8	0
1117	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,3	0,06	1	4	4	4	0
1118	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	4	4	0
1120	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	4	4	0
1161	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	4	4	0
1171	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	2	2	0
1176	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	8	0,06	0,3	0,06	4	4	4	16	0,1
1243	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	1	4	8	8	0
1244	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	2	4	8	8	0
1245	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	1	4	4	4	0
1246	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	1	4	4	4	0
1248	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	2	4	32	64	0,2
1249	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,3	0,06	4	4	8	8	0
1250	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	2	4	8	8	0
1251	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	2	4	8	8	0
1252	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	2	4	8	8	0
1253	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	1	4	4	4	0
1254	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	2	4	8	16	0,1
1321	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	1	4	8	8	0
1324	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	2	4	8	8	0
1253	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	1	4	4	4	0
1254	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	2	4	8	16	0,1
1321	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	1	4	8	8	0
1324	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	2	4	8	8	0
1328	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	1	4	4	4	0
1384	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	2	4	8	8	0
1386	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,3	0,06	1	4	8	8	0
1388	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	2	4	8	8	0
1389	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	1	4	4	4	0
1391	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,3	0,06	2	4	8	16	0,1
1392	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,06	0,06	2	4	8	8	0
1393	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,3	0,06	2	4	8	16	0,1
1423	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,3	0,06	2	4	4	4	0
1425	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,3	0,06	1	4	4	4	0
1462	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,3	0,06	2	4	4	4	0
1463	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,3	0,06	2	4	4	4	0
1464	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,3	0,06	1	4	4	4	0
1466	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,3	0,06	2	4	8	8	0
1467	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	8	8	0
1468	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	4	0,06	0,3	0,06	2	4	8	4	0
1469	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	2	0,06	0,3	0,06	1	4	2	2	0
1470	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	8	8	0
1471	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	4	4	0
1472	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	4	0,06	0,6	0,06	1	4	4	4	0
1473	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	4	0,06	0,6	0,06	1	4	2	2	0
1523	<i>Pantoe spp.</i>	0,06	0,5	2	0,06	0,3	0,12	4	8	16	16	0

## APÊNDICE I. continuação...

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)										Índice MAR
		MER	GEN	AMI	LEV	STX	CPM	PTZ	CLO	AMP	AMP	
1049	<i>Providencia stuartii</i>	0,25	0,5	0,48	0,06	0,3	0,06	1	32	64	128	0,3
1086	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	4	4	0
1087	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	4	4	16	16	0,2
1524	<i>Providencia stuartii</i>	0,25	1	4	0,06	0,6	0,12	4	4	1	8	0
1526	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	2	0,06	0,6	0,06	1	8	64	128	0,2
1527	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,06	0,3	0,12	1	4	8	8	0
1529	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	2	0,06	0,3	0,12	4	4	8	8	0
1530	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	1	0,06	0,3	0,06	2	4	8	8	0
1532	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,06	0,3	0,06	4	8	4	8	0
1535	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	1	2	0
1536	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	2	2	0
1537	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,06	4	0,06	0,6	0,06	2	4	4	8	0
1538	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	1	2	0
1541	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	2	2	0
1542	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	4	4	2	4	0
1544	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	4	0,06	0,6	0,06	1	4	2	2	0
1545	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	2	2	0
1546	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	4	4	0
1587	<i>Raoultella terrigena</i>	0,06	0,5	1	0,06	0,3	0,12	4	8	8	8	0
1588	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,06	0,3	0,06	1	8	16	16	0,2
1589	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,06	0,6	0,12	4	32	8	8	0,1
1590	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	32	0,06	0,6	0,12	4	4	16	16	0,3
1591	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,06	0,3	0,12	4	16	8	16	0,2
1592	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	2	0,06	0,3	0,12	1	4	8	16	0,1
1593	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,06	0,6	0,12	4	8	16	16	0,2
1604	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	4	4	0
1606	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	4	2	2	0
1609	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	2	8	2	4	0
1611	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	2	2	0
1612	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	1	4	2	2	0
1613	<i>Enterobacter asburiae</i>	0,06	0,5	2	0,06	0,3	0,06	2	4	32	128	0,2
1614	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	4	4	16	32	0,2
1617	<i>Escherichia coli</i>	0,5	1	2	0,12	4,8	8	16	4	8	8	0
1643	<i>Enterobacter asburiae</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	0,06	4	4	32	128	0,2
1644	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	1	0,06	0,3	0,12	1	4	16	16	0,2
1645	<i>Escherichia coli</i>	0,12	1	1	0,24	0,3	0,12	4	4	1	16	0,1
1648	<i>Providencia alcalifaciens/rustigianii</i>	0,06	1	0,4	1	0,3	0,06	1	4	8	16	0,1
1651	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,24	8	0,06	0,3	0,06	4	8	16	16	0,2
1687	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	2	0,06	0,3	0,06	4	8	8	16	0,1
1690	<i>Escherichia coli</i>	0,06	1	4	0,06	0,6	1	0,24	1	8	8	0
1691	<i>Citrobacter freundii</i>	0,06	2	2	0,12	0,3	0,12	4	4	1	16	0,1
1730	<i>Citrobacter freundii</i>	0,06	1	2	0,12	0,3	0,12	4	16	16	16	0,3
1731	<i>Citrobacter freundii</i>	0,06	1	2	0,12	0,3	0,12	4	16	16	16	0,3
1787	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,12	1	2	0,12	0,3	0,12	1	4	>64	32	0,2
1788	<i>Citrobacter freundii</i>	0,06	0,5	2	0,06	0,3	0,12	2	8	32	32	0,2
1789	<i>Citrobacter freundii</i>	0,06	1	2	0,06	0,3	0,06	2	4	16	16	0,2
1792	<i>Escherichia coli</i>	0,06	0,5	0,4	0,06	0,3	0,06	2	0,06	1	0,06	0

Legenda: Antimicrobianos testados: MER- Meropenem, GEN – gentamicina, AMI – Amicacina, LEV – Levofloxacino, STX – Sulfametoxazol/trimetoprim, CPM – cefepime, PTZ - piperacilina/tazobactam, CLO – Cloranfenicol, AMS - ampicilina/sulbactam, AMP – ampicilina.

**APÊNDICE J.** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de BGN NF (n = 57) recuperados das amostras dos efluentes de biodigestores em escala-piloto operados a temperatura ambiente, durante as estações verão e inverno.

Código	Identificação	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)								Índice MAR
		MER	GEN	AMI	LEV	STX	CPM	PTZ	CLO	
24	<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>	0,06	0,5	1	0,06	9,5	0,5	1	1	0
25	<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>	0,06	0,25	1	0,06	4,8	4	8	4	0
26	<i>Burkholderia cepacia</i>	0,06	0,25	1	0,06	1,2	4	4	1	0
27	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0,5	4	4	0,5	1,2	0,5	1	16	0,125
29	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,06	0,06	0,25	0,06	38	0,25	1	8	0
30	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0,06	2	8	0,12	9,5	32	8	32	0,25
32	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	8	16	64	0,5	9,5	0,25	1	4	0,375
33	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,06	0,12	0,12	0,5	9,5	0,25	1	4	0
67	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8	64	128	2	38	64	256	8	0,625
68	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,06	0,25	1	0,06	9,5	0,5	1	8	0
69	<i>Burkholderia cepacia</i>	0,06	0,25	1	0,12	9,5	0,5	1	4	0
70	<i>Wautersia paucula</i>	0,06	2	8	0,5	9,5	0,5	1	4	0
74	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,25	0,12	0,5	0,06	9,5	0,25	1	8	0
99	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0,06	0,06	0,25	0,06	2,4	0,25	1	0,5	0
101	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0,06	1	8	0,06	9,5	0,5	0,5	0,5	0
102	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,06	0,06	0,12	0,06	9,5	0,12	0,5	1	0
103	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0,06	0,25	2	0,06	9,5	0,06	0,06	0,5	0
104	<i>Burkholderia cepacia</i>	0,06	0,25	1	0,06	38	0,25	1	4	0
168	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0,06	4	8	0,06	2,4	8	1	4	0
172	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,06	0,25	1	0,06	9,5	0,25	1	4	0
174	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0,06	0,12	0,12	0,06	4,8	0,25	1	1	0
175	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,06	0,12	0,12	0,06	9,5	0,25	0,06	1	0
247	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0,06	2	8	0,06	4,8	0,5	0,06	0,25	0
251	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0,06	1	4	0,06	2,4	0,06	0,06	0,06	0
252	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,06	0,12	2	0,06	2,4	0,06	0,12	0,06	0
254	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,06	0,5	2	0,12	1,2	0,06	1	4	0
255	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,06	0,12	2	0,06	19	0,12	0,06	4	0
306	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0,06	4	8	0,06	2,4	0,5	0,06	0,5	0
311	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0,06	0,12	1	0,12	1,2	0,5	1	32	0,125
312	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0,06	0,12	0,25	0,12	2,4	0,12	0,12	4	0
313	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	0,06	0,12	1	0,06	1,2	0,12	0,12	0,06	0
379	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,06	0,25	1	0,12	4,8	0,12	1	8	0
380	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,06	0,12	0,5	0,06	4	0,25	1	4	0
381	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	0,06	0,12	0,12	0,06	9,5	0,06	0,06	4	0
384	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,06	0,12	0,12	0,06	9,5	0,06	0,06	1	0
432	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	2	4	0,5	4,8	8	1	8	0
434	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,06	0,12	1	0,25	4,8	0,5	1	8	0
480	<i>Pseudomonas putida</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	304	2	4	32	0,25
483	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,25	0,5	1	0,5	304	2	8	32	0,25
484	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,5	2	4	0,12	9,5	8	4	4	0
485	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	0,25	0,5	0,5	304	4	4	32	0,25
486	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,06	1	1	0,25	4,8	2	1	1	0
487	<i>Pseudomonas luteola</i>	0,06	0,25	2	0,25	304	0,06	1	16	0,25
488	<i>Pseudomonas putida</i>	1	0,25	0,5	0,5	304	2	4	32	0,25
532	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,06	0,25	0,5	0,12	38	0,25	1	4	0
534	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,25	0,25	0,5	0,25	4,8	0,5	1	4	0
582	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0,06	0,25	1	0,12	4,8	0,25	1	32	0,125
642	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,06	4	4	0,5	38	2	1	32	0,125
645	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,06	4	4	0,25	38	2	2	32	0,125
646	<i>Burkholderia cepacia</i>	0,06	0,25	0,5	0,06	4,8	0,5	1	4	0
650	<i>Alcaligenes piechaudii</i>	0,06	0,25	1	0,06	9,5	0,12	0,25	16	0,125
709	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,06	4	4	0,5	38	0,06	2	32	0,125
1170	<i>Burkholderia cepacia</i>	0,06	1	0,25	0,25	0,6	1	1	4	0
1610	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,5	0,5	0,25	0,06	0,6	1	4	4	0
1615	<i>Moraxella osloensis</i>	0,5	0,25	0,5	0,25	19	1	4	32	0,125
1616	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	0,5	0,25	0,5	0,12	4,8	8	16	4	0
1740	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	1	2	1	38	1	32	16	0,125

Legenda: Antimicrobianos testados: MER- Meropenem, GEN – gentamicina, AMI – Amicacina, STX – Sulfametoxazol/trimetoprim, CPM – cefepime, PTZ - piperacilina/tazobactam, CLO – Cloranfenicol