

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CODIGESTÃO DE DEJETOS DE BOVINOS LEITEIROS  
NA PROMOÇÃO DA SAÚDE ÚNICA**

**Paula Maria Pilotto Branco**  
**Médica Veterinária**

**2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CODIGESTÃO DE DEJETOS DE BOVINOS LEITEIROS  
NA PROMOÇÃO DA SAÚDE ÚNICA**

**Paula Maria Pilotto Branco**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral**

**Tese apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias –  
Unesp, Câmpus de Jaboticabal,  
como parte das exigências para a  
obtenção do título de Doutora em  
Medicina Veterinária (Medicina  
Veterinária Preventiva)**

**2017**

B816c Branco, Paula Maria Pilotto  
Codigestão de dejetos bovinos leiteiros na promoção da saúde  
única / Paula Maria Pilotto Branco. -- Jaboticabal, 2017  
xvii, 56 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017  
Orientador: Luiz Augusto do Amaral  
Banca examinadora: Max Ternero Cangani, Juliana Bega  
Junqueira, Karina Paes Bürger, Angela Cleusa de Fátima Banzatto de  
Carvalho  
Bibliografia

1. Caldo de cana-de-açúcar. 2. *Escherichia coli*. 3. Helmintos. I.  
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.9:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CODIGESTÃO DE DEJETOS DE BOVINOS LEITEIROS NA PROMOÇÃO DA SAÚDE ÚNICA

AUTORA: PAULA MARIA PILOTTO BRANCO

ORIENTADOR: LUIZ AUGUSTO DO AMARAL


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV/UNESP/Jaboticabal



Prof. Dr. MAX TERNERO GANGANI  
Instituto Federal Catarinense / Camboriú/SC



Profa. Dra. JULIANA BEGA JUNQUEIRA  
Zootecnista Autônoma / Jaboticabal/SP



Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV/UNESP/Jaboticabal



Profa. Dra. ANGELA CLEUSA DE FÁTIMA BANZATTO DE CARVALHO  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV/UNESP/Jaboticabal

Jaboticabal, 20 de abril de 2017.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Paula Maria Pilotto Branco** – nascida no dia 10 de Junho de 1986, no Município de Campo Grande – Mato Grosso do Sul, filha de Eni Garcia de Freitas e Mario Cesar Pilotto Branco. Ingressou em 2006 no curso de graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Câmpus de Campo Grande, e concluiu o curso no ano de 2010. No mesmo ano realizou o estágio obrigatório no Departamento de Engenharia Rural da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, sob supervisão do Prof. Dr. Jorge de Lucas Júnior. Em 2011 foi aprovada no curso de Mestrado do Programa de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Jorge de Lucas Júnior, com bolsa concedida pelo CNPq. Obteve o título de Mestre em Zootecnia em Julho de 2013. Em Agosto de 2013 iniciou o curso de Doutorado do Programa de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Câmpus Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, com bolsa concedida pela CAPES.

*Dedico,*  
*Ao meu pai, Mário Pilotto, e meu irmão, Paulo*  
*García, por todo apoio e incentivo.*  
*A minha avó, Fausta Ferreira, maior exemplo*  
*de luta e força à nossa família.*  
*As minhas estrelas mais lindas, minha mãe, Eni*  
*García, e meu avô, Orozímbo García, por*  
*continuarem acompanhando e guiando meus*  
*passos. Saudades eternas!*

## **AGRADECIMENTOS**

A conclusão de mais uma etapa na vida acadêmica não teria sido possível sem a colaboração, incentivo e empenho de diversas pessoas. Por isso, quero expressar minha imensa gratidão a cada um que de alguma forma contribuiu para essa conquista.

Em especial, ao Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, meu querido orientador e companheiro de trabalho. A ele não há agradecimentos suficientes, que expressem minha gratidão. A quem sou extremamente grata por ter me dado a oportunidade de integrar o seu grupo de orientados, por compartilhar seus conhecimentos e experiências de vida. Obrigada não apenas pela orientação, mas sobretudo pela compreensão e amizade.

Ao Prof. Dr. Jorge de Lucas Júnior, quem abriu as portas dessa Faculdade para mim na ocasião do estágio obrigatório, por me orientar no Mestrado e pelas colaborações no Doutorado.

Aos integrantes da banca de qualificação, Prof. Dr. Luís Antônio Mathias e Profa. Dra. Karina Paes Bürger, e de defesa, Profa. Dra. Angela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho, Profa. Dra. Karina Paes Bürger, Prof. Dr. Max Ternero Cangani e Dra. Juliana Bega Junqueira, pelas contribuições para a elaboração da tese.

Aos demais professores da graduação na FAMEZ/UFMS e da pós-graduação na FCAV/UNESP, que contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal.

Aos funcionários dos Deptos. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal e Engenharia Agrícola, que além do apoio no trabalho me deram a honra de partilhar da sua amizade.

Aos amigos que fiz ao longo desses anos em Jaboticabal, Aline, Max, Juliana, Maria Fernanda, Lívia e Ricardo. Obrigada principalmente pelo apoio nos momentos difíceis, com vocês eles se tornaram mais leves.

Ao meu namorado, Leandro Brito, por estar ao meu lado desde o início dessa caminhada, por aceitar e apoiar minhas escolhas.

A CAPES pela bolsa concedida e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xvi</b>
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	<b>18</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
1 Produção de dejetos na bovinocultura leiteira.....	<b>19</b>
1.1 Impactos ambientais gerados pelos dejetos – no solo, água e ar.....	<b>20</b>
2 Biodigestão anaeróbia.....	<b>22</b>
2.1 Codigestão.....	<b>23</b>
2.1.1 Caldo de cana-de-açúcar.....	<b>24</b>
3 Biorremediadores.....	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO 2 – AÇÃO DA ADIÇÃO DE CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA DINÂMICA DA POPULAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> E PRESENÇA DE <i>E. COLI</i> SHIGATOXIGÊNICAS, DURANTE O PROCESSO DE CODIGESTÃO ANAERÓBIA</b> .....	<b>33</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>33</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>34</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>47</b>

<b>CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO DE BIOGÁS E REDUÇÃO DE OVOS DE HELMINTOS PELA CODIGESTÃO ANAERÓBIA DE DEJETOS BOVINOS LEITEIROS COM E SEM ADIÇÃO DE CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR E BIORREMEDIADOR.....</b>	<b>53</b>
RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
<b>CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>72</b>

## CODIGESTÃO DE DEJETOS DE BOVINOS LEITEIROS NA PROMOÇÃO DA SAÚDE ÚNICA

**RESUMO** - Os objetivos do estudo foram avaliar a qualidade do efluente quanto a dinâmica da população de *Escherichia coli*, presença de *E. coli* shigatoxigênicas e eliminação de ovos de helmintos. Além de avaliar a produção e os potenciais de produção de biogás pelo processo de codigestão anaeróbia dos dejetos de bovinos leiteiros com e sem adição de 7% de caldo de cana-de-açúcar e biorremediador. Para o ensaio 1, foram utilizados dez biodigestores bateladas divididos em dois tratamentos, dejetos sem caldo de cana-de-açúcar (DSC) e dejetos com caldo (DCC), com tempo de retenção hidráulica (TRH) foi de 90 dias. O ensaio 2, foi realizado concomitante ao primeiro, com a mesma distribuição de tratamentos, para o monitoramento periódico da dinâmica da população *E. coli* e presença *E. coli* shigatoxigênicas, do pH e da acidez volátil. Para tanto, foram abastecidos mais 36 biodigestores bateladas, construídos de garrafas de material plástico de um litro, sendo analisadas duas repetições por tratamento a cada dez dias. As reduções das populações de *E. coli* foram significativas no DSC (60 dias) e no DCC (20 dias). Para *E. coli* shigatoxigênicas ocorreu em um período mais curto, 40 dias no DSC e menos de 10 dias no DCC. Posteriormente, foram realizados mais dois ensaios para avaliar a produção e potencial de produção de biogás e contagem de ovos de helmintos. Foram utilizados 20 biodigestores bateladas, com tempo de retenção hidráulica (TRH) de 90 dias, para cada ensaio. Os tratamentos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x2 representados pelo biorremediador (com e sem adição) e caldo (com e sem adição). Os tratamentos que tiveram adição de caldo de cana-de-açúcar apresentaram menores médias de produção de biogás, quando comparado aos tratamentos que não tiveram a sua inclusão. Ainda com relação a qualidade do efluente, houve redução de 100% de ovos de helmintos para todos os tratamentos. Portanto, os ensaios demonstraram que a dose de caldo de cana utilizada (7%), mostrou-se muito relevante sob o ponto de vista de sanitização, com a potencialização da redução e inativação da população de *E. coli* e *E. coli* shigatoxigênicas (*stx2* e *eae*) em dejetos de bovinos leiteiros. Entretanto, levou a instabilidade do processo de codigestão anaeróbia para produção de biogás. O período de 90 dias de codigestão anaeróbia foi eficaz na eliminação de ovos nematoides gastrointestinais, em todos os substratos analisados.

**Palavras-chave:** Caldo de cana-de-açúcar, *Escherichia coli*, Helmintos, Produção de biogás, Tratamento de dejetos

## ANAEROBIC CODIGESTION OF THE DAIRY CATTLE WASTE TO IMPROVE ONE HEALTH

**ABSTRACT** - The objectives of the study were to evaluate the effluent quality in a dynamic situation of the *Escherichia coli* population, the presence of *E. coli shigatoxigenic* and the elimination of helminth eggs. In addition, evaluating the production and potential of biogas production by the process of anaerobic codigestion of the waste of dairy cattle with and without addition of 7% of sugarcane broth and bioremediator. For test 1, ten batch biodigesters were divided in two treatments, with no sugarcane broth (W) and waste with sugarcane broth (WWSC), with hydraulic retention time (HRT) of 90 days. Experiment 2 was carried out concomitantly with the first one, it had the same distribution of treatments, to realize the periodic monitoring of dynamic population of *E. coli* and presence of *E. coli shigatoxigenic*, pH and volatile acidity. To this end, 36 batch biodigesters were used, consisting of bottles of one liter plastic material, and two replicates per treatment were analyzed every ten days. Reductions of *E. coli* populations were significant in W (60 days) and in WWSC (20 days). For *E. coli shigatoxigenic* occurred in a shorter period, 40 days in W and less than 10 days in WWSC. Subsequently, two more tests were carried out to evaluate the production and potential of biogas production and helminths egg counting. 20 batch biodigesters with 90 days hydraulic retention time (HRT) were used for each test. The treatments were distributed in a completely randomized design, in a 2x2 factorial arrangement represented by the bioremediator (with and without addition) and broth (with and without addition). The treatments that had sugarcane broth addition had lower biogas production averages when compared to the treatments that did not have sugarcane broth inclusion. Still referring to the effluent quality, there was a reduction of 100% of helminth eggs for all treatments. Therefore, the experiments showed that the dose of sugarcane broth used (7%) was very relevant from the point of view of sanitization, with the potentiation of the reduction and inactivation of the *E. coli* and shigatoxigenic *E. coli* populations (*stx<sub>2</sub>* and *eae*) in dairy cattle waste. However, it led to the instability of the anaerobic codigestion process for biogas production. The 90 days period of anaerobic codigestion was effective in the elimination of gastrointestinal nematode eggs in all substrates analyzed.

**Keywords:** Sugarcane broth, *Escherichia coli*, Helminths, Biogas production, Waste treatment

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGV: Ácidos graxos voláteis  
AV: Acidez volátil  
CH<sub>4</sub>: Metano  
cm: Centímetro  
CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono  
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados  
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica  
FDN: Fibra em detergente neutro  
g: Grama  
g<sup>-1</sup>: Por grama  
GEEs: Gases de efeito estufa  
HC: Colite hemorrágica  
HCl: Ácido clorídrico  
HUS: Síndrome hemolítico-urêmico  
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
KCl: Cloreto de potássio  
Kg: Kilograma  
L: Litro  
LDT: Limite de detecção da técnica  
MCT: Ministério da Ciência e Tecnologia  
MCTI: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação  
MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio  
mg L<sup>-1</sup>: Miligrama por litro  
mL: Mililitro  
mM: Milimol  
MS: Matéria seca  
N<sub>2</sub>O: Óxido nitroso

NMP: Número mais provável  
Ovos g<sup>-1</sup> ST: Ovos por grama de sólidos totais  
pb: Pares de base  
PCR: Reação em cadeia da polimerase  
pH: Potencial hidrogeniônico  
pmol: Picomoles  
Ps: Peso seco  
Pu: Peso úmido  
SDA: Secretaria de defesa agropecuária  
ST: Sólidos totais  
STEC: *Escherichia coli* shigatoxigenica  
SV: Sólidos voláteis  
Ton: Toneladas  
TRH: Tempo de retenção hidráulica  
UFC: Unidade formadora de colônias  
UFC mL<sup>-1</sup>: Unidade formadora de colônia por mililitro  
USEPA: United States Environmental Protection Agency  
UV: Ultravioleta  
µL: Microlitro

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO 2. AÇÃO DA ADIÇÃO DE CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA DINÂMICA DA POPULAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> E PRESENÇA DE <i>E. COLI</i> SHIGATOXIGÊNICAS, DURANTE O PROCESSO DE CODIGESTÃO ANAERÓBIA.....</b>	<b>33</b>
FIGURA 1. Planta baixa (a), vista lateral (b) e corte transversal (c) dos biodigestores de bancada (cm).....	38
FIGURA 2. Dinâmica das populações de <i>E. coli</i> (UFC mL <sup>-1</sup> ) e variação do potencial hidrogeniônico (pH), para dejetos sem caldo (DSC) e dejetos com caldo (DCC), durante o período de 90 dias.....	41
FIGURA 3. Dinâmica das populações de <i>E. coli</i> (UFC mL <sup>-1</sup> ) e variação das concentrações de ácidos voláteis (AV mg L <sup>-1</sup> ), para dejetos sem caldo (DSC) e dejetos com caldo (DCC), durante o período de 90 dias.....	42
FIGURA 4. Produtos da amplificação dos genes <i>stx</i> <sub>2</sub> e <i>eae</i> com 807 e 570 pb, respectivamente. 1T0 a 1T90 (DSC) e 2T0 a 2T90 (DCC) durante os 90 dias de experimento. PM: padrão de tamanho molecular 1Kb plus (Invitrogen).....	44
<b>CAPÍTULO 3. PRODUÇÃO DE BIOGÁS E REDUÇÃO DE OVOS DE HELMINTOS PELA CODIGESTÃO ANAERÓBIA DE DEJETOS BOVINOS LEITEIROS COM E SEM ADIÇÃO DE CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR E BIORREMEDIADOR.....</b>	<b>53</b>
FIGURA 1. Planta baixa (a), vista lateral (b) e corte transversal (c) dos biodigestores de bancada (cm).....	58
FIGURAS 2. Interação dos fatores biorremediador vs caldo para as variáveis ST adc e red.....	61

FIGURAS 3.	Interação dos fatores biorremediador vs caldo para as	
a, b	variáveis SV adc e red.....	62
FIGURAS 4.	Interação dos fatores biorremediador vs caldo para as	
a, b	variáveis Pot prod ST adc <sup>-1</sup> e red <sup>-1</sup> .....	64

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>CAPÍTULO 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>18</b>
TABELA 1. Composição bromatológica da cana-de-açúcar ( <i>Saccharum officinarum</i> ), em porcentagem da matéria seca.....	24
<b>CAPÍTULO 2 AÇÃO DA ADIÇÃO DE CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA DINÂMICA DA POPULAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> E NA PRESENÇA DE <i>E. COLI</i> SHIGATOXIGÊNICAS, DURANTE O PROCESSO DE CODIGESTÃO ANAERÓBIA.....</b>	<b>33</b>
TABELA 1. Componentes dos substratos utilizados para o abastecimento e composição química dos diferentes tratamentos dos biodigestores bateladas.....	38
TABELA 2. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizados para a identificação dos genes <i>stx</i> <sub>1</sub> , <i>stx</i> <sub>2</sub> e <i>eae</i> .....	39
TABELA 3. Dinâmica da população de <i>E. coli</i> (UFC), potencial hidrogeniônico (pH) e acidez volátil (AV), durante 90 dias de experimento.....	40
<b>CAPÍTULO 3 PRODUÇÃO DE BIOGÁS E REDUÇÃO DE OVOS DE HELMINTOS PELA CODIGESTÃO ANAERÓBIA DE DEJETOS BOVINOS LEITEIROS COM E SEM ADIÇÃO DE CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR E BIORREMEDIADOR.....</b>	<b>53</b>
TABELA 1. Componentes dos substratos utilizados para o abastecimento e composição química dos diferentes tratamentos dos biodigestores bateladas.....	58
TABELA 2. Componentes dos substratos utilizados para o abastecimento dos diferentes tratamentos dos biodigestores bateladas.....	60

TABELA 3.	Variáveis sólido total e volátil adicionados e reduzidos em função dos fatores biorremediador (bio) vs caldo.....	61
TABELA 4.	Percentual de redução para ST e SV, para todos os tratamentos.....	62
TABELA 5.	Variáveis de produção e potencial de produção de biogás em função dos fatores biorremediador vs caldo....	63
TABELA 6.	Variação da contagem de ovos de helmintos, nos diferentes tratamentos, para o abastecimento dos biodigestores bateladas.....	65

## CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

### INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas questões ligadas à escassez de suprimentos necessários à vida tem se tornado cada vez mais presentes nos debates políticos e econômicos, entre elas está a possível falta de alimentos. Segundo a FAO (2015) cerca de 805 milhões de pessoas no mundo não têm alimento suficiente para levar uma vida saudável e ativa. Essa realidade, acrescida dos eventos climáticos, do crescimento populacional e econômico esperado em diversas regiões do mundo fazem retornar o debate sobre a incapacidade de oferta de alimentos.

Diante desse cenário, a necessidade por alimento demanda intensificação na produção, o que gera problemas sanitários provenientes dos dejetos. A sua deposição inadequada no ambiente tem reflexos na saúde única, ou seja, na saúde humana, animal e ambiental.

Os ruminantes, em especial os bovinos, são os principais reservatórios de *Escherichia coli* shigatoxigênicas (STEC), eliminando-as por meio de suas fezes, que de maneira direta ou indireta contribuem para a intensificação dos agravos à saúde pública, tendo em vista o seu alto grau de infectividade para os seres humanos.

Vale ressaltar, que as fezes desses animais também podem ser um meio de disseminação de parasitas, como os nematódeos, dando a possibilidade da continuação do ciclo biológico ao serem descartados no solo, afetando assim a saúde animal. Destaca-se ainda os transtornos ambientais, como a emissão de gases de efeito estufa, principalmente o gás carbônico e o metano, por meio da fermentação e decomposição da matéria orgânica presente nos dejetos.

Embora diversos estudos (HORANA et al., 2004; LANG; SMITH, 2008; PANDEY; SOUPIR, 2011; MANYI-LOH et al., 2014) comprovem a eficiência do processo de biodigestão anaeróbia quanto à redução de micro-organismos indicadores de poluição fecal, pouco se sabe sobre o potencial de contaminação ambiental por agentes patogênicos pós-tratamento.

Com a finalidade de auxiliar na biodegradação dos resíduos, pode-se utilizar a associação com outros substratos, como o caldo de cana-de-açúcar, então

denominada codigestão. Esse tipo de tecnologia tem por finalidade acelerar o processo de degradação e, ainda, pode ser uma alternativa viável em função das suas propriedades aditivas. Outra prática a ser considerada é a biorremediação, que consiste em um processo de aceleração da transformação dos poluentes em produtos menos tóxicos.

Sendo assim, compreende-se que ao investigar o potencial de redução de micro-organismos indicadores é fundamental que seja analisada também a presença de genes patogênicos de *E. coli*. Não menos importante é o estudo da codigestão entre o dejetos e o caldo de cana-de-açúcar, associados aos biorremediadores. Diante deste cenário, o objetivo do presente estudo foi analisar a influência da codigestão no tratamento de dejetos de bovinos leiteiros, quanto ao seu impacto na saúde única.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **1 Produção de dejetos na bovinocultura leiteira**

O aumento da demanda por alimentos e a evolução tecnológica na produção agropecuária (BALBINO et al., 2011) fez com que o confinamento de animais surgisse como uma alternativa para aumentar a produtividade para suprir a necessidade de alimentos em grande escala (PERISSINOTTO et al. 2009).

A produção agropecuária de maneira intensa, além de apresentar características positivas sob os pontos de vista econômico e operacional (BORDIN et al., 2005), merece especial atenção às severas consequências para o ambiente e para sobrevivência do ser humano (SILVEIRA; SILVEIRA, 2015).

O rebanho leiteiro do Brasil é composto de 40.770.339 animais (ANUALPEC, 2016) e de acordo a Embrapa (2008) 3% desse total são criados em regime de confinamento. Entretanto, vale ressaltar que esses tipos de sistemas de produção animal são responsáveis pela descarga de grande volume de dejetos de forma concentrada no ambiente, o que corresponde a 3,67 Kg MS/cabeça/dia para bovinos de leite e 3,24 Kg MS/cabeça/dia para bovinos de corte (MCT, 2000). Segundo Generoso (2001) a produção de dejetos representa 8 a 11% do peso do animal.

O Plano Nacional de Resíduos Sólidos (IBGE, 2011), acerca da geração de resíduos da atividade de bovinocultura de leite, apresentou um levantamento no total de 316.909.675 Ton por ano de dejetos, uma vez que uma vaca leiteira de peso médio de 400 kg produz, diariamente, de 28 a 32 Kg de fezes e de 38 a 50 Kg fezes com urina (MATOS, 2005).

Portanto, a bovinocultura de leite é uma importante via de contaminação do ambiente, tendo em vista a elevada quantidade de dejetos produzidos pela criação desses animais, mesmo quando não confinados, em função da retenção de animais em estábulos para ordenha e lavagem de equipamentos utilizados (POHLMANN, 2000).

### **1.1 Impactos ambientais gerados pelos dejetos – solo, água e ar**

O esgotamento dos recursos naturais, das reservas de água doce, a degradação e contaminação dos solos e a poluição do ar por gases nocivos ao ambiente e indutores do efeito estufa são os principais impactos ambientais observados pela descarga de dejetos oriundos da criação de animais, descartados sem prévio tratamento (SILVEIRA; SILVEIRA, 2015).

Os esterco animais podem conter  $10^{10}$  micro-organismos  $g^{-1}$  (MATOS, 2010), além da emissão de poluentes para atmosfera, como  $CH_4$  e  $CO_2$ , pela fermentação da matéria orgânica (SANTOS; LIMA, 2016). Por isso, muita atenção passou a ser dada às necessidades de desenvolvimento tecnológico, com vistas à deposição dos resíduos gerados por animais de forma a causar o mínimo impacto sobre o ambiente (MATOS, 2010).

Patógenos fecais podem chegar no ambiente por meio da deposição direta de fezes no solo ou por meio de escoamento superficial de material fecal depositado em solos, especialmente depois de fortes chuvas (THURSTON-ENRIQUEZ; GILLEY; EGHBALL, 2005). Dentre os patógenos de importância, cabe ressaltar as *Escherichia coli* produtoras de shigatoxinas (STEC) que são colonizadoras naturais no intestino de bovinos saudáveis, sendo as fezes a principal via de eliminação, portanto são disseminadas no ambiente por meio da defecação ou após a aplicação de efluentes no solo (FREMAUX; PRIGENT-COMBARET; VERNOSY-ROZAND, 2008).

A sobrevivência de STEC em dejetos bovinos, solo, plantas e água é discutida com o objetivo de obter-se novos conhecimentos sobre os fatores bióticos e abióticos que podem afetar a sua sobrevivência ou mitigar a sua disseminação no meio. A capacidade de persistir em ambientes de produção de gado contribui para contaminação ambiental e a reinfecção dos bovinos, assim como para a infecção humana. Em consequência, as estratégias eficazes de controle devem ser consideradas em explorações bovina, de modo a limitar a disseminação de STEC para o ambiente (FREMAUX; PRIGENT-COMBARET; VERNZOZY-ROZAND, 2008).

Os veículos de transmissão de STEC, mais abordados, incluem produtos alimentares contaminados, especialmente de origem bovina, tais como produtos lácteos e carne mal cozida que foram diretamente contaminados pelas fezes durante os processos de ordenha ou de abate, respectivamente. Além disso, frutas e verduras cruas, que foram indiretamente contaminados via água de irrigação ou por meio do solo tratado com efluentes agrícolas, são também um importante veículo de contaminação (HILBORN et al., 1999).

Assim como nas fezes bovinas, STEC tem uma grande capacidade de sobreviver por longos períodos no solo e na água. Destacam-se *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e cepas shigatoxigênicas (STEC) isoladas de infecções humanas, dada a sua importância zoonótica. Esses micro-organismos podem causar um largo espectro de doenças humanas que vão desde diarreia sem complicações a colite hemorrágica (hc) e síndrome hemolítico-urêmico (hus) (RILEY et al., 1983; O'BRIEN; KAPER, 1998).

Vários sorogrupos têm sido associados com doenças humanas (O26, O55, O91, O103, O11 e O145), mas o sorotipo mais frequente em surtos em todo o mundo é a *E. coli* O157:H7. Um estudo *in vitro* demonstrou que após a aplicação de esterco inoculado com *E. coli* O157:H7, os organismos permaneceram viáveis no solo por até 99 dias (BOLTON et al., 1999). Outro estudo mostrou que a *E. coli* O157:H7 foi capaz de sobreviver por 13 semanas na água a 15°C (WANG; DOYLE, 1998).

Além das bactérias, as fezes podem ser o meio de disseminação de parasitas, que se utilizadas de forma inadequada, na adubação de forragens, possibilita a continuidade do ciclo biológico dos nematódeos (DOWNEY; MOORE, 1977), principais parasitas gastrointestinais dos bovinos (FURLONG; PADILHA, 1996). Os

nematódeos depositam seus ovos no lumen do abomaso, onde se misturam com o conteúdo chegando ao meio exterior com as fezes (FURLONG; PADILHA, 1996).

Estudos recentes no Brasil tem demonstrado a presença de ovos e/ou larvas de helmintos em hortaliças diferentes em diferentes estados, como Rio Grande do Sul (ANTUNES et al., 2013), Goiás (MACIEL; GONÇALVES; MACHADO, 2014), Maranhão (OLIVEIRA et al., 2016). A principal forma de contaminação por parasitas em hortaliças dá-se, sobretudo, pelo uso de água contaminada por material fecal utilizada na irrigação assim como também na adubação do solo que muitas vezes também é feito por dejetos animais (GERMANO; GERMANO, 2011).

Outro impacto gerado pela produção animal é representado pela fermentação entérica nos ruminantes, sendo uma das principais fontes de emissão de CH<sub>4</sub> no país, com 56,4% no ano de 2010, sendo o rebanho bovino leiteiro responsável por 12% (MCTI, 2013).

Os bezerros e as vacas leiteiras são os que mais contribuem para as emissões de GEEs (GARCIA JUNIOR; PIRES; CUNHA, 2016), tendo em vista a grande necessidade de ingestão de matéria seca, para os bezerros na fase de crescimento, e no período de lactação para as vacas leiteiras (PRIMAVESI et al., 2004). Verifica-se que para a bovinocultura, os GEEs mais relevantes são CH<sub>4</sub> e óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), naturalmente produzidos pelo sistema digestivo dos animais, bem como pelo manejo dos seus dejetos (GARCIA JUNIOR; PIRES; CUNHA, 2016).

## **2 Biodigestão anaeróbia**

A biodigestão anaeróbia tem sido uma alternativa atraente para o tratamento de resíduos de animais (KINYUA; ROWSE; ERGAS, 2016), por ser um processo biológico natural, que consiste na degradação da matéria orgânica pela ação de uma cultura mista de micro-organismos na ausência de oxigênio (SANTOS; LIMA, 2016).

Os biodigestores anaeróbios tem demonstrado ser uma tecnologia promissora na redução da carga microbiana e de patógenos, para níveis recomendados e seguros à saúde pública (SAHLSTRÖM et al., 2008; PANDEY; SOUPIR, 2011; MANYI-LOH et al., 2014, ZHEN et al., 2017). Além disso, apresentam benefícios ambientais ocasionados pela redução na emissão de gases de efeito estufa (ORZI et al., 2010),

em função da capacidade de converter biologicamente a energia química dos dejetos (ZHEN et al., 2017), pela metabolização do carboidratos, lipídios e proteínas e, conseqüentemente, produzir metano (CH<sub>4</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (SANTOS; LIMA, 2016).

Diversos autores têm relatado a remoção de micro-organismos patogênicos, tanto sobre a redução da população de *E. coli* (PANDEY; SOUPIR, 2011; MANYI-LOH et al., 2014), como para remoção de ovos de helmintos (NÚÑEZ et al., 1987; FURLONG; PADILHA, 1996; AMARAL et al., 2004; QUADROS et al., 2010; CAÑON-FRANCO; HENAO-AGUDELO; PÉREZ-BEDOYA, 2012).

De acordo com Paula (2006), o biogás é a mistura gasosa (combustível), que pode ser aproveitado para uso doméstico em motores de combustão interna, sistema de geração de energia elétrica ou térmica (GUYOT, 1997). Entretanto, tem sido pesquisado a associação de dejetos, codigestão, com o objetivo de maximizar a produção de biogás (ORRICO et al., 2016; XAVIER; SANTOS; LUCAS JR., 2016) e diminuir o tempo de retenção dos substratos (ORRICO et al., 2016).

## 2.1 Codigestão

A codigestão é o consórcio de um resíduo orgânico com outros resíduos que podem ser ricos em carboidratos ou micro-organismos, como caldo de cana, vinhaça, esterco bovino, de galinha, entre outros. Sendo este termo usado para descrever o tratamento combinado de resíduos com várias características complementares, esta é uma das principais vantagens da tecnologia anaeróbia (FERNÁNDEZ; SÁNCHEZ; FONT, 2005).

Muitas pesquisas, que tratam de codigestão têm sido focadas na busca de sinergia ou antagonismo entre os substratos codigeridos. Por exemplo, a otimização da relação carbono e nitrogênio quando a codigestão de resíduos urbanos e lodo de esgoto são apontados como benéfica para produção de metano (FERNÁNDEZ; SÁNCHEZ; FONT, 2005).

Este processo é capaz de aumentar a produção de biogás, pois fornece um balanceamento mais adequado de nutrientes aos micro-organismos da biodigestão anaeróbia, reduz o efeito de compostos tóxicos de um ou outro resíduo e melhora a

capacidade tampão do meio (ALVAREZ; LIDÉN, 2009; HOLM-NIELSEN; AL SEADI; OLESKOWICZ-POPIEL, 2009).

### 2.1.1 Caldo de cana-de-açúcar

Várias características justificam a utilização da cana-de-açúcar para diversos fins, como o alto teor de sacarose, o moderado teor de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), a alta produção de matéria seca por unidade de área mesmo com baixa frequência de cortes (Tabela 1), a simplicidade do cultivo agrônômico, a relativa resistência a pragas e doenças, a facilidade de compra e venda, o caráter semiperene, além de ser uma cultura tradicional entre os produtores rurais brasileiros (VALADARES FILHO; MAGALHÃES; ROCHA Jr., 2006).

Tabela 1. Composição bromatológica da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), em porcentagem da matéria seca.

<b>Nutrientes</b>	<b>% matéria seca</b>
Matéria Seca	28,45
Proteína Bruta	2,74
Extratato Etéreo	1,55
Material Mineral	3,10
Carboidratos Totais	92,76
Carboidratos Solúveis	42,83
Fibra em detergente neutro	57,68
Fibra em detergente ácido	34,02
Hemicelulose	21,22
Lignina	7,75
Nutrientes digestíveis totais	62,70

Fonte: Valadares Filho; Magalhães; Rocha Jr., 2006

A cana-de-açúcar é uma planta composta, em média, de 65 a 75% de água e seu principal componente é a sacarose, que corresponde de 70 a 91% das substâncias sólidas solúveis (UMEBARA, 2010). O elevado teor de sacarose contido no caldo de cana-de-açúcar (SILVA NETO et al., 2014) é de fundamental importância, pois ele é um indicativo da quantidade de carbono contida no líquido (COLEN, 2003).

O caldo de cana-de-açúcar por suas propriedades, pode ser utilizado na biodigestão anaeróbia, já que dispõe de elevadas quantidades de carboidratos prontamente solúveis. Dessa forma, pode proporcionar maior multiplicação microbiana inicial, estabelecimento de maior população de micro-organismos, maior

degradação da matéria orgânica do substrato e, conseqüentemente, maior produção de biogás (XAVIER; SANTOS; LUCAS JÚNIOR, 2016).

### **3 Biorremediadores**

A biorremediação é um processo no qual organismos vivos, micro-organismos ou suas enzimas, são utilizados tecnologicamente para remover (remediar) ou reduzir poluentes no ambiente. O processo metabólico que tem se mostrado mais apto em biodegradar moléculas xenobióticas (moléculas estranhas ao ambiente natural) recalcitrantes (moléculas de difícil degradação) nos processos de biorremediação, é o microbiano, uma vez que os micro-organismos desempenham a tarefa de reciclar a maior parte das moléculas da biosfera, participando dos principais ciclos biogeoquímicos (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

Segundo Yakubu (2007), o termo biorremediação pode ser definido como um processo biotecnológico no qual se utiliza o metabolismo de micro-organismos para a eliminação rápida de poluentes, com o objetivo de reduzir sua concentração a níveis aceitáveis, transformando-os em compostos de baixa toxicidade. A Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) define biorremediação como “o processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de micro-organismos para degradar substâncias toxicamente perigosas, transformando-as em substâncias inócuas”.

A estrutura química dos poluentes orgânicos influencia a metabolização destes por micro-organismos, especialmente com respeito às taxas e à extensão da biodegradação. Alguns compostos orgânicos são rapidamente biodegradados, enquanto outros são recalcitrantes (não biodegradáveis) (ATLAS, 1981). Se as enzimas que catabolizam a degradação de compostos naturais apresentam baixa especificidade pelo seu substrato, os xenobióticos com estrutura química semelhante a estes compostos naturais podem ser reconhecidos pelo sistema ativo da enzima e, assim, aproveitados pelo micro-organismo como fonte de nutrientes e energia (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

Assim, a degradação do poluente é baseada em processos nos quais ocorrem reações bioquímicas mediadas por micro-organismos. Em geral, um composto orgânico, quando é oxidado, perde elétrons para um aceptor final de elétrons, que é

reduzido (ganha elétrons). O oxigênio atua comumente como acceptor final de elétrons, sendo que a oxidação de compostos orgânicos com a redução do oxigênio molecular é chamada de respiração aeróbia heterotrófica. No entanto, quando o oxigênio não está presente, os micro-organismos podem usar compostos orgânicos ou íons inorgânicos como aceptores finais de elétrons, condições estas chamadas de anaeróbias. A biodegradação anaeróbia pode ocorrer por desnitrificação, redução do ferro, redução do sulfato ou condições metanogênicas (CORDAZZO, 2000).

## REFERÊNCIAS

ALVAREZ, R.; LIDÉN, G. Low temperature anaerobic digestion of mixtures of llama, cow and sheep manure for improved methane production. **Biomass Bioenerg.**, v. 33, n. 3, p. 527-533, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.08.012>>

AMARAL, C. M. C.; AMARAL, L. A.; LUCAS JÚNIOR, J.; NASCIMENTO, A. A.; FERREIRA, D. S.; MACHADO, M. R. F. Biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros submetidos a diferentes tempos de retenção hidráulica. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1897-1902, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000600035> >

ANTUNES, L.; VIEIRA, J. N.; PEREIRA, C. P.; BASTOS, C. G. G.; NAGEL, A. S.; VILLELA, M. M. Parasitos em hortaliças comercializadas no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Cienc. Med. Biol.**, v. 12, n. 1, p. 45-49, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v12i1.6543>>

ANUALPEC - ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA. **Agra FNP Pesquisas Ltda.** 272p. São Paulo. 2016.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiol. Rev.**, v. 45, n. 1, p. 180-209, 1981.

BALBINO, L. C.; CORDEIRO, L. A. M.; SILVA, V. P.; MORAES, A.; MARTÍNEZ, G. B.; ALVARENGA, R. C.; KICHEL, A. N.; FONTANELI, R. S.; SANTOS, H. P.; FRANCHINI, J. C.; GALERANI, P. R. Evolução tecnológica e arranjos produtivos de sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta no Brasil. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 46, n. 10, p. 1-12, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011001000001>>

BOLTON, D. J., BYRNE, C. M., SHERIDAN, J. J., MCDOWELL, D. A., BLAIR, I. S., The survival characteristics of a non-toxigenic strain of *Escherichia coli* O157:H7. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, n. 3, p. 407-411, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00677.x>>

BORDIN, R. A.; PEREIRA, C. A. D.; EBOLI, M.; ARTILHEIRO, R.; FREITAS, C. A produção de dejetos e o impacto ambiental da suinocultura. **Rev. Cienc. Vet.**, v. 3, p. 1- 4, 2005.

CAÑON-FRANCO, W. A.; HENAO-AGUDELO, R. A.; PÉREZ-BEDOYA, J. L. Recovery of gastrointestinal swine parasites in anaerobic biodigester systems. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 249-253, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612012000300013> >

COLEN, F. **Potencial energético do caldo de cana-de-açúcar como substrato em reator UASB.** 2003. 85 f. Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

CORDAZZO, J. **Modelagem e simulação numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em águas subterrâneas**. 120 f. 2000. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DOWNEY, N. E.; MOORE, J. F. Trichostrongylid contamination of pasture fertilized with cattle slurry. **Vet. Rec.**, v. 101, n. 24, p. 487-488, 1977.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA E AGROPECUÁRIA. **Avaliação Biológica de Viroses em Plantas Matrizes e Mudas de Batata-doce (Ipomoea batatas)**. Circular técnica. Pelotas-RS Outubro, 2008. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/30878/1/Circular-75.pdf>>

FAO - **State of Food Insecurity in the World**. FAO. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/publications/sofi/en>>

FERNÁNDEZ, A.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X. Anaerobic co-digestion of a simulated organic fraction of municipal solid wastes and fats of animal and vegetable origin. **Biochem. Eng. J.**, v. 26, n. 1, p. 22-28, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2005.02.018>>

FREMAUX, B.; PRIGENT-COMBARET, C.; VERNOZY-ROZAND, C. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: An updated review. **Vet. Microbiol.**, v. 132, n. 1-2 p. 1–18, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.05.015>>

FURLONG, J.; PADILHA, T. Viabilidade de ovos de nematódeos gastrintestinais de bovinos após passagem em biodigestor anaeróbio. **Cienc. Rural**, v. 26, n. 2, p. 269-271, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781996000200017>>

GARCIA JUNIOR, L. C.; PIRES, M. V., CUNHA, D. A. Biodigestores para a mitigação das emissões de gases de efeito estufa pela bovinocultura na região sudeste, Brasil. **REA**, v. 14, n. 1-2-3, p. 139-165, 2016.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnol. Cienc. Desenvol.**, v. 8, n. 34, p. 36-43, 2005.

GENEROSO, F. B. **Quantificação e caracterização de dejetos produzidos em propriedade com exploração leiteira para uso em biodigestores e reciclagem de nutrientes**. 66p. (Trabalho apresentado para obtenção de graduação em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 4ª ed. São Paulo: Manole; 2011.

GUYOT, G. **Climatologie de L'environnement**: de la plante aux écosystèmes. [S.l.]: Ed. Masson, 1997. 505p.

HILBORN, E. D.; MERMIN, J. H.; MSHAR, P. A.; HADLER, J. L.; VOETSCH, A.; WOJTKUNSKI, C.; SWARTZ, M.; MSHAR, R.; LAMBERT-FAIR, M.A., FARRAR, J. A.; GLYNN, M. K.; SLUTSKER, L. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. **Arch. Intern. Med.** v. 159, n. 15, p. 1758-1764, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1001/archinte.159.15.1758>>

HOLM-NIELSEN, J. B.; AL SEADI, T.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. **Bioresour. Technol.**, v. 100, n. 22, p. 5478-5484, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.046>>

HORANA, N. L.; FLETCHER, L.; BETMALA, S. M.; WILKSB, S. A.; KEEVILB, C. W. Die-off of enteric bacterial pathogens during mesophilic anaerobic digestion. **Water Res.**, v. 38, n. 5, p. 1113-1120, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.004>>

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. v. 39. Brasil, 2011. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2011/ppm2011.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf)>.

KINYUA, M. N.; ROWSE, L. E.; ERGAS, S. J. Review of small-scale tubular anaerobic digesters treating livestock waste in the developing world. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, v. 58, p. 896-910, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.324>>

LANG, N. L.; SMITH, S. R. Time and temperature inactivation kinetics of enteric bacteria relevant to sewage sludge treatment processes for agricultural use. **Water Res.**, v. 42, n. 8-9, p. 2229-2241, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2007.12.001>>

MACIEL, D. F.; GONÇALVES, R. G.; MACHADO, E. R. Ocorrência de parasitos intestinais em hortaliças comercializadas em feiras no Distrito Federal, Brasil. **Rev. Patol. Trop.**, v. 43, n. 3, p. 351-359, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5216/rpt.v43i3.32216>>

MANYI-LOH, C. E.; MAMPHWELI, S. N.; MEYER, E. L.; OKOH, A. I.; MAKAKA, G.; SIMON, M. Inactivation of Selected Bacterial Pathogens in Dairy Cattle Manure by Mesophilic Anaerobic Digestion (Balloon Type Digester). **Int. J. Environ. Res. Public Health.**, v. 11, n. 7, p. 7184-7194, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijerph110707184>>

MATOS, A. T. **Poluição ambiental. Impactos no meio físico**. 1ª edição. Viçosa, MG: ed. UFV, 2010.

MATOS, A. T. **Tratamento de resíduos agroindustriais. Fundação Nacional do Meio Ambiente.** 2005. 34p. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dec/simea/apresentacoes/CursoMatosFEAM2005.pdf>>.

MCT - MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2000 *apud* PEDREIRA, M. S.; PRIMAVESI, O. **Nutrição de Ruminantes**, Jaboticabal: Funep, 2006.

MCTI - MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. **Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil.** Brasília: MCTI, 2013.

NÚÑEZ, S. F.; URRUTIA, S. F.; URCELAY, V. S.; OVIEDO, H. P. Microbiological and parasitological study in swine manure treated by anaerobic biodigestion. **Av. Cs. Vet.** v. 2, n. 1, p. 37-41, 1987.

O'BRIEN, A. D.; KAPER, J. B. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today and tomorrow. In: Kaper, J.B., O'-Brien, A.D. (Eds.), **Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing E. coli Strains.** ASM Press, Washington, D.C., 1998.

OLIVEIRA, D. M.; NOVAES, B. C. B.; LUCENA, V. B.; SOUZA, T. S.; BARROS, N. C. L.; DIAS, S. S.; SILVA, D. L.; CORREA, R. S. Perfil parasitológico do cheiro verde comercializado em feiras livres de Imperatriz – MA. **Bio. Amaz.**, v. 6, n. 2, p. 123-126, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v6n2p123-126>>

ORRICO, A. C. A.; LOPES, W. R. T.; MANARELLI, D. M.; ORRICO JÚNIOR, M. A. P.; SUNADA, N. S. Codigestão anaeróbia dos dejetos de bovinos leiteiros e óleo de descarte. **Eng. Agric.**, Jaboticabal, v. 36, n. 3, p. 537-545, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1809-4430>>

ORZI, V.; CADENA, E.; D'IMPORZANO, G.; ARTOLA, A.; DAVOLI, E., CRIVELLI, M.; ADANI, F. Potential odour emission measurement in organic fraction of municipal solid waste during anaerobic digestion: relationship with process and biological stability parameters. **Bioresour. Technol.**, v. 101, n. 19, p. 7330–7337, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.098>>

PANDEY, P. K.; SOUPIR, M. L. *Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. **AMB Express**, v. 1, n. 18, p. 1-10, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/2191-0855-1-18>>

PAULA, A. N. **Biogás: O combustível do futuro.** Dissertação (Mestrado em Fontes Alternativas de Energia) – Departamento de Engenharia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

PERISSINOTTO, M.; MOURA, D. J.; CRUZ, V. F.; SOUZA, S. R. L.; LIMA, K. A. O.; MENDES, A. S. Conforto térmico de bovinos leiteiros confinados em clima subtropical e mediterrâneo pela análise de parâmetros fisiológicos utilizando a teoria dos conjuntos fuzzy. **Cienc. Rural**, v. 39, n. 5, p. 1492-1498, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009005000094>>

POHLMANN, M. **Levantamento de técnicas de manejo de resíduos da bovinocultura leiteira no Estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola. Campinas, SP, 2000.

PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R. T. S.; PEDREIRA, M. S.; LIMA, M. A.; BERCHIELLI, T. T.; BARBOSA, P. F. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 39, n. 3, p. 277-283, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2004000300011>>

QUADROS, D. G.; OLIVER, A. P. M.; REGIS, U.; VALLADARES, R.; SOUZA, P. H. F.; FERREIRA, E. J. Biodigestão anaeróbia de dejetos de caprinos e ovinos em reator contínuo de PVC flexível. **Rev. Bras. Eng. Agríc Ambient.**, Campina Grande, v. 14, n. 3, p. 326–332, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662010000300014>>

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J.G., DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, n. 12, p. 681–685, 1983. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198303243081203>>

SANTOS, R. B; LIMA, A. K. C. Análise comparativa do biogás: processo em biodigestores e de aterro sanitário. **Rev. Eletr. Energ.**, v. 6, n. 1, p. 48-57, 2016.

SAHLSTRÖM, L., BAGGE, E., EMMOTH, E., HOLMQVIST, A., DANIELSSON-THAM, M. L., ALBIHN, A. A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. **Bioresour. Technol.**, v. 99, n. 16, p. 7859–7865, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.071>>

SILVA NETO, H. F.; PAULI, F. A.; TASSO JÚNIOR, L. C.; MARQUES, M. O. Porcentagem de sacarose aparente e potencial produtivo de açúcar em cultivares de cana. **Sci. Agropecu.**, v. 5, n. 1, p. 53-58, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.01.06>>

SILVEIRA, E. O.; SILVEIRA, F. B. F. Uma nova agricultura para um novo ambiente. **Rev. Eletr. Ciênc. Desenvolv.**, v. 1, n. 1, 2015.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A.; GILLEY, J. E.; EGHBALL, B. Microbial quality of runoff following land application of cattle manure and swine slurry. **J. Water Health**, v. 3, n. 2, p. 157–171, 2005.

WANG, G., DOYLE, M. P. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. **J. Food Prot.**, v. 61, n. 6, p. 662– 667, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-61.6.662>>

UMEBARA, T. **Microfiltração de caldo de cana: caracterização do caldo permeado e retentado**. 2010. 100 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

VALADARES FILHO, S. C.; MAGALHÃES K. A.; ROCHA Jr., V. R. et al. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. 2.ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 239p.

XAVIER, C. A. N.; SANTOS, T. M. B.; LUCAS JÚNIOR, J. Digestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros: efeito da dieta e da adição de caldo de cana-de-açúcar. **Arch. Zootec.**, v. 65, n. 250, p. 131-138, 2016.

YAKUBU, M. B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. **Afr. J. Biotechnol.**, Nigeria, v. 6, n. 24, p. 2735-2739, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJB2007.000-2437>>

ZHEN, G.; LU, X.; KATO, H.; ZHAO, Y.; LI, Y. Overview of pretreatment strategies for enhancing sewage sludge disintegration and subsequent anaerobic digestion: Current advances, full-scale application and future perspectives. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, v. 69, p. 559-577, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.187>>

## **CAPÍTULO 2 - Ação da adição de caldo de cana-de-açúcar na dinâmica da população de *Escherichia coli* e presença de *E. coli* shigatoxigênica, durante o processo de codigestão anaeróbia**

**Resumo** - O estudo teve como objetivo avaliar a ação da adição de caldo de cana-de-açúcar sobre a dinâmica da população de *Escherichia coli* e presença de *E. coli* shigatogixênicas, no processo de codigestão anaeróbia mesofílica de dejetos de bovinos leiteiros. Foram utilizados dez biodigestores bateladas divididos em dois tratamentos, dejetos sem caldo de cana-de-açúcar (DSC) e dejetos com caldo (DCC), com tempo de retenção hidráulica (TRH) de 90 dias. Para o monitoramento periódico da dinâmica da população *E. coli* e presença de *E. coli* shigatoxigenicas, do pH e da acidez volátil, realizados a cada dez dias, foram abastecidos mais 36 biodigestores bateladas, construídos de garrafas de material plástico de um litro, sendo 18 unidades para cada tratamento. A redução das populações de *E. coli* no decorrer do tempo foi significativa no DSC (60 dias) e no DCC (20 dias). A inativação de *E. coli* shigatoxigênicas ocorreu em um período mais curto, 40 dias no DSC e menos de 10 dias no DCC. Foram obtidas diferenças significativas entre os tratamentos para os valores de pH que foram menores e as concentrações de ácidos voláteis que foram maiores com adição de caldo e contribuíram para a inativação mais rápida da *E. coli* e *E.coli* shigatoxigênicas. A dose de caldo de cana utilizada (7%) mostrou-se muito interessante sob o ponto de vista de sanitização, com a redução na população de *E. coli* e inativação de *E. coli* shigatoxigênicas em dejetos de bovinos leiteiros.

**Palavras-chave:** Bovinocultura de leite, Micro-organismos patogênicos, Sustentabilidade ambiental, Tratamento de dejetos

**Action of the addition of sugarcane broth in the dynamics of population of *Escherichia coli* and presence of *E. coli* shigatoxigenics, during anaerobic codigestion process**

**ABSTRACT** - The objective of this study was to evaluate the action of the addition of sugar cane broth on the population dynamics of *Escherichia coli* and the presence of *E. coli* shigatoxigenics, in the process of anaerobic digestion mesophilic of the dairy cattle waste. Ten batch type biodigesters were used divided in two treatments, waste without sugar cane broth (W) and waste with sugar cane broth (WWSC), with the hydraulic retention time (HRT) of 90 days. For monitoring the population and presence of microorganisms, pH and volatile acidity, tests were carried out every ten days, 36 batch biodigesters were used, they were made of 1 L plastic bottles, 18 of them for each treatment. Reductions of *E. coli* populations over time were significant in W (60 days) and in WWSC (20 days). The inactivation *E. coli* shigatoxigenics occurred in a shorter period, 40 days in W and less than ten days in WWSC. Significant differences were obtained between treatments for pH values that were lower and concentrations of volatiles acids that were higher with the addition of sugarcane broth and led to a faster inactivation of *E. coli* and *E. coli* shigatoxigenics. The amount of sugarcane broth used (7%) was very interesting from a sanitation point of view, with a reduction in the *E. coli* population and inactivation of *E. coli* shigatoxigenics in dairy cattle waste.

**Keywords:** Dairy Cattle, Environmental Sustainability, Pathogenic microorganisms, Waste treatment

## Introdução

A prática da utilização de esterco animal no solo com a finalidade de adubação de culturas existe há mais de 4.000 anos, e esta prática continua sendo usada a fim de reduzir os custos de adubação, em países em desenvolvimento e desenvolvidos (WHO, 2010; USEPA, 2010).

Entretanto, a deposição de dejetos *in natura* no solo pode transferir micro-organismos patogênicos para cadeia alimentar (NICHOLSON; GROVES; CHAMBERS, 2005) e contaminar os recursos hídricos (AVERY; MOORE; HUTCHISON, 2004), visto que o esterco bovino pode conter mais de 150 patógenos colocando em risco a saúde humana, animal e ambiental (GERBA; SMITH, 2005).

Barbarick e Ippolito (2007) demonstraram a contaminação de poços rasos e nascentes de água pela percolação de bactérias oriundas de esterco depositado no solo. Outros estudos sobre a contaminação microbiana em córregos próximos a fazendas leiteiras evidenciaram a importância desse escoamento na contaminação de corpos d'água (USEPA, 1993; BIBBY; VIAU; PECCIA, 2011).

Em Ontário no Canadá um surto de gastroenterite afetou mais de 2.300 pessoas e sete morreram quando o suprimento de água foi contaminado por micro-organismos patogênicos oriundos de esterco animal de uma fazenda próxima, após período de intensa chuva (CLIVER; MOE, 2004; POURCHER et al., 2005).

*Escherichia coli* é tipicamente ambiental e considerada, mundialmente, indicadora de poluição fecal, entretanto algumas estirpes adquiriram genes que as tornaram capazes de causar doenças intestinais ou extraintestinais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Existem inúmeros patótipos de *E. coli*, classificados de acordo com seus fatores de virulência, mecanismos de ação e promoção da enfermidade. Dentre eles estão as estirpes shigatoxigênicas (STEC) que produzem pelo menos um tipo de shigatoxina (*stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub>) (GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Os ruminantes, especialmente os bovinos, são importantes reservatórios dessas bactérias e grande parte das infecções humanas são causadas por alimentos e água contaminadas com fezes desses animais (GYLES, 2007; PERERA et al., 2015). A ocorrência de STEC no Brasil foi revisada por Caldorin et al. (2013) que observaram a variação de 5,2 a 82% nas fezes bovinas de gado de leite.

O contato de pessoas com ambiente contaminado por fezes bovinas pode ser via de transmissão da enfermidade como citado por Mukherjee et al. (2006), onde uma criança se infectou com *E. coli* O157:H7 pelo contato com gramado adubado com dejetos bovinos. A mesma cepa isolada da criança foi recuperada no solo do gramado por até 70 dias.

Além dos benefícios ambientais ocasionados pela redução na emissão de gases de efeito estufa (ORZI et al., 2010), a utilização do processo de biodigestão anaeróbia como forma de tratamento dos dejetos animais, tem se mostrado um grande aliado na redução do impacto gerado pelos micro-organismos patogênicos (SAHLSTRÖM et al., 2008).

A esse respeito, Horana et al. (2004) e Lang e Smith (2008) obtiveram, no processo de biodigestão mesofílica, a redução na população de *E. coli* > 2,0 log e de 1 a 2 log, respectivamente. Biswas, Pandey e Farver (2016) verificaram que *E. coli* sobreviveu por mais tempo em condições anaeróbias que *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*. Assim, a ausência de *E. coli* dá segurança que patógenos devem também estar ausentes, qualificando-a como bom indicador de risco de transmissão de enfermidades por via indireta, em especial pela rota fecal-oral, o que ratifica a utilização de *E. coli* como indicador de presença de risco à saúde.

Com o objetivo de maximizar a produção de biogás (ORRICO et al., 2016; XAVIER; SANTOS; LUCAS JR., 2016) e também diminuir o tempo de retenção dos substratos (ORRICO et al., 2016), alguns autores têm pesquisado a codigestão, associação dos dejetos com outros resíduos, dentre eles, o caldo de cana-de-açúcar (XAVIER; SANTOS; LUCAS JR., 2016). Por outro lado, sabe-se que o caldo de cana-de-açúcar proporciona um meio mais ácido, o que pode favorecer a inativação de bactérias (SUNG; LIU, 2003).

Segundo Sung e Liu (2003), as altas concentrações de ácidos graxos voláteis combinadas com pH ácido têm sido descritas na literatura como responsáveis pela redução de patógenos em processo de biodigestão mesofílica. Essa colocação é ratificada por Sahlström (2003) e Kunte, Yeole e Ranade (2004) quando citam que a redução de bactérias durante a digestão anaeróbia ocorre, parcialmente, em função dos altos níveis de ácidos voláteis e da queda do pH durante a digestão, condições essas que são tóxicas para uma série de bactérias.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação da adição de caldo de cana-de-açúcar no processo de codigestão anaeróbia mesofílica de dejetos de bovinos leiteiros sobre a dinâmica da população de *Escherichia coli* e presença de estirpes shigatoxigênicas no dejetos desses animais.

## **Material e métodos**

O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Os biodigestores foram instalados no Departamento de Engenharia Rural, nos Laboratórios de Biomassa I e II, e abastecidos com dejetos de bovinos leiteiros obtidos no setor de Bovinocultura Leiteira do Departamento de Zootecnia. As análises microbiológicas foram realizadas no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, todos situados na mesma instituição.

O estudo foi dividido em dois tratamentos com cinco repetições cada, designados da seguinte maneira, dejetos de bovino de leite (DSC) e dejetos com caldo de cana-de-açúcar (DCC). O tempo de retenção hidráulica (TRH) foi de 90 dias, os biodigestores foram abertos apenas ao final do período. O monitoramento periódico da dinâmica da população de *E. coli*, presença de *E. coli* shigatoxigênica, pH e acidez volátil foram realizados a cada dez dias. Para tanto, foram abastecidos mais 36 biodigestores bateladas, construídos em escala menor, utilizando garrafas de material plástico, com capacidade de um litro, sendo 18 unidades para cada tratamento.

Os biodigestores bateladas de bancada (Figura 1) são constituídos, basicamente, por três cilindros retos de PVC com diâmetros de sete e meio, dez e 15 cm, acoplados a um cap, com capacidade média aproximada de dois litros de substrato em fermentação. Os cilindros de sete e meio e 15 cm encontram-se inseridos um no interior do outro, de tal 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 de água”), atingindo profundidade de 50 cm. O cilindro de diâmetro intermediário tem uma das extremidades vedada com um cap, que contém um registro para descarga do biogás, e permanece inserido no selo de água, para propiciar condições anaeróbias e armazenar o gás produzido.

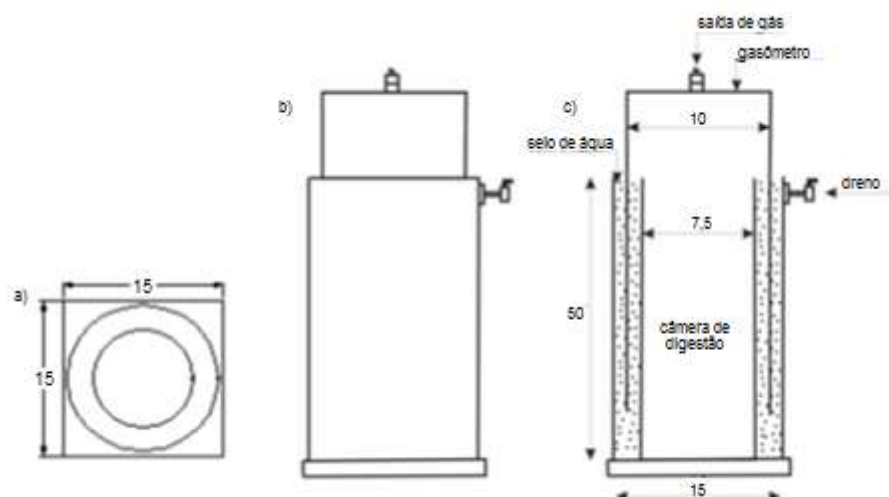


FIGURA 1. Planta baixa (a), vista lateral (b) e corte transversal (c) dos biodigestores de bancada (cm) (ORRICO JR.; AMORIM; LUCAS JR., 2004).

Para o preparo do substrato da carga inicial, de todos os biodigestores bateladas e os biodigestores construídos em escala menor, foram pesados e homogeneizados os dejetos frescos, água e caldo de cana-de-açúcar. Os substratos foram calculados para conter 6 % de sólidos totais (ST) e 7% de caldo de cana-de-açúcar. As proporções utilizadas para o abastecimento de cada tratamento e suas respectivas repetições estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes dos substratos utilizados para o abastecimento e composição química dos diferentes tratamentos dos biodigestores bateladas.

	Água (L)	Dej. Bov. leite (Kg)	Caldo (L)	pH	Sólidos totais (%)	Sólidos voláteis (%)
DSC	32,4	16,2	-	6,21	5,18	4,22
DCC	28,998	16,2	3,402	6,07	5,36	4,26

DSC= Dejeito sem caldo, DCC= Dejeito com caldo.

Para análise microbiológica foi feita a contagem de *E. coli* em placas. As amostras foram diluídas em água peptonada a 0,1%, utilizando-se 1 mL da amostra em 9 mL do diluente (APHA, 2001). Foram depositadas 0,1 mL das diluições em placa de Petri contendo Violet Red Bile Agar with MUG e distribuídas na superfície do meio com auxílio de alça Drigalski. Posteriormente as placas foram incubadas invertidas a 35°C por 24 horas e consideradas positivas as colônias vermelhas com fluorescência sob a ação de luz ultravioleta (UV).

De acordo com Sutton (2011), quando nenhuma colônia foi detectada na placa, considerou-se a contagem menor que o limite de detecção da técnica (LDT), e então o respectivo TRH foi considerado como o tempo de sobrevivência da *Escherichia coli*. Para o presente estudo o limite de detecção foi de  $10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>.

As leituras de pH dos afluentes e dos efluentes foram determinadas segundo metodologia descrita por APHA (2012). A determinação de ácidos foi realizada por titulometria, conforme descrito por Dilallo e Albertson (1961).

A identificação de *E. coli* shigatoxigênicas foi realizada em amostras dos afluentes dos dois tratamentos, sem caldo e com caldo, e nas amostras dos efluentes obtidos nos períodos intermediários (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 dias) e final do processo de biodigestão anaeróbia com 90 dias. As identificações foram realizadas em duplicata para cada amostra. Para tanto, foram identificados por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) a presença dos genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> e *eae*, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 2) (CHINA; PIRSON; MAINIL, 1996).

Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizados para a identificação dos genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> e *eae*.

Oligonucleotídeos	Sequências	Tamanho do fragmento (pb)
<i>stx</i> <sub>1</sub> Foward	5' AGAGCGATGTTACGGTTTG 3'	388
<i>stx</i> <sub>1</sub> Reverse	5' TTGCCCCCAGAGTGGATG 3'	
<i>stx</i> <sub>2</sub> Foward	5' TGGGTTTTTCTTCGGTATC 3'	807
<i>stx</i> <sub>2</sub> Reverse	5' GACATTCTGGTTGACTCTCTT 3'	
<i>eae</i> Foward	5' AGGCTTCGTCACAGTTG 3'	570
<i>eae</i> Reverse	5' CCATCGTCACCAGAGGA 3'	

pb: pares de base

A extração de DNA das culturas bacterianas totais em caldo BHI foi realizada pelo método da fervura que consiste em aquecer a suspensão de células a 100°C a fim de que estas sofram lise térmica. As reações para amplificação de cada gene foram compostas por tampão 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP's, 1 U de Taq DNA polimerase, 5 pmol de cada primer, 2 µL de DNA genômico e água pura estéril para 20 µL. As reações ocorreram em um termociclador programado para realizar um ciclo a 95°C por 3 min; 35 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 30s; e um ciclo final de 10 min a 72°C. Como controle positivo das reações foi utilizado o DNA da estirpe de *E. coli* EcL 6611 e como controle negativo, um tubo de *mix* dos reagentes sem DNA. Os produtos de PCR foram visualizados por

eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TBE (Ácido bórico 89 mM; Tris 89 mM e EDTA 2,5 mM) 1X.

Os dados da dinâmica da população de *E. coli* e tempo foram comparados pela análise de regressão. Para a comparação dos valores de pH, nos tratamentos DSC e DCC, foi utilizado o teste de Wilcoxon. Para concentração de ácidos voláteis foi realizado o teste t pareado para comparação de médias (SIQUEIRA; TIBÚRCIO, 2011).

## Resultados e discussão

O tempo de sobrevivência da *E. coli* foi de 20 dias quando adicionado o caldo de cana ao material a ser digerido. No DSC, pode-se observar que aos 60, 70 e 80 dias não foi detectada nenhuma colônia de *E. coli*. Entretanto, esse micro-organismo voltou a ser detectado aos 90 dias do processo de codigestão, embora em menor número quando comparado ao dia do abastecimento (Tabela 3).

Tabela 3. Dinâmica da população de *E. coli* (UFC), potencial hidrogeniônico (pH) e acidez volátil (AV), durante 90 dias de experimento.

TRH	DSC			DCC		
	UFC mL <sup>-1</sup>	pH	AV mg L <sup>-1</sup>	UFC mL <sup>-1</sup>	pH	AV mg L <sup>-1</sup>
T0	6,50E+05	6,21	3060	8,80E+05	6,07	2712
T10	1,45E+04	5,35	4416	2,02E+04	4,68	5328
T20	3,35E+03	5,86	2232	< LDT	4,60	5052
T30	1,38E+04	6,82	2214	< LDT	4,59	6180
T40	1,17E+04	6,84	2520	< LDT	4,69	5340
T50	1,74E+04	6,68	1908	< LDT	4,85	6000
T60	< LDT*	6,91	1710	< LDT	4,91	5652
T70	< LDT	6,77	1200	< LDT	4,65	6972
T80	< LDT	6,90	1674	< LDT	4,80	4404
T90	4,20E+02	6,68	2406	< LDT	4,64	8424
Média	-	6,50	2334	-	4,85	5606

\* Limite de detecção da técnica. TRH: tempo de retenção hidráulica. DSC: dejetto sem caldo. DCC: dejetto com caldo. UFC: unidade formadora de colônia. pH: potencial hidrogeniônico. AV: ácidos voláteis.

A inviabilidade da detecção do micro-organismo, pode ter ocorrido em função do limite de detecção da técnica, mesmo que ele ainda estivesse ativo. O

recrescimento de *E.coli* após o processo de biodigestão anaeróbia também foi verificado por Bagge, Sahlström e Albihn (2005).

Ainda na Tabela 3, foram obtidas diferenças significativas entre DSC e DCC para os valores de ácidos voláteis ( $p=0,0005174$ ) e pH ( $p=0,001953$ ), que contribuíram para a rápida inativação da *E. coli* no processo com adição do caldo. A redução das populações de *E. coli* no decorrer do tempo foi significativa para DSC ( $p=0,0006575$ ) e DCC ( $p=0,002578$ ).

A amplitude de variação do pH dos efluentes dos biodigestores bateladas no tratamento DSC durante o processo foi de 5,35 a 6,91 (Tabela 3 e Figura 2). Os menores valores foram obtidos até 20 dias de codigestão, aumentando no decorrer do tempo, o que indica que, embora muitos ácidos tenham sido formados, eles foram consumidos ao longo do processo. Quando houve adição de caldo de cana-de-açúcar, DCC, os valores variaram de 4,64 a 4,91. No DSC, após os 20 dias todos valores estiveram dentro da faixa considerada ideal, que varia de 6,6 a 7,4 para a digestão anaeróbia descrita por Chernicharo (1997). Para DCC, todos os valores se apresentaram sempre fora dessa faixa.

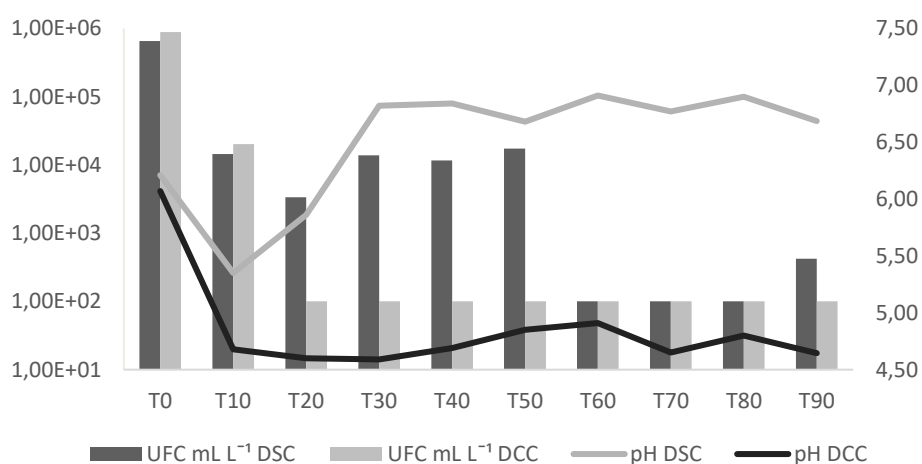


Figura 2. Dinâmica das populações de *E. coli* (UFC mL<sup>-1</sup>) e variação do potencial hidrogeniônico (pH), para dejetos sem caldo (DSC) e dejetos com caldo (DCC), durante o período de 90 dias.

Com relação a amplitude de variação da acidez volátil (AV) dos efluentes dos biodigestores bateladas, no DSC durante o processo foi de 1200 a 4416 mg L<sup>-1</sup>. Para o DCC foi possível observar a elevação da acidez do meio, com variação entre 2712 e 8424 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 3 e Figura 3). Após 10 dias de operação, dos biodigestores que

tiveram a adição de caldo de cana-de-açúcar, ficou demonstrado que com o decorrer do tempo a elevada acidez do meio teve influência direta na inativação das bactérias (Figura 3).

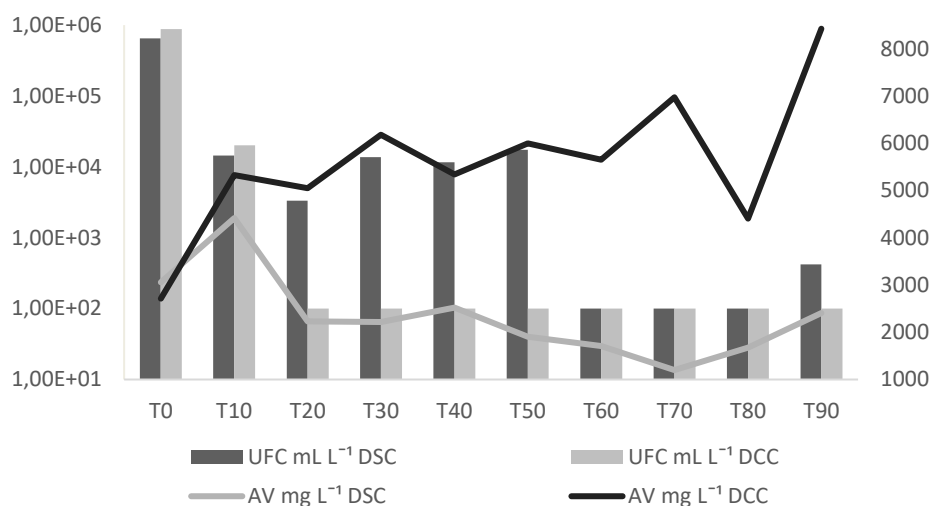


Figura 3. Dinâmica das populações de *E. coli* (UFC mL<sup>-1</sup>) e variação das concentrações de ácidos voláteis (AV mg L<sup>-1</sup>), para dejetos sem caldo (DSC) e dejetos com caldo (DCC), durante o período de 90 dias.

Vale ressaltar que as reduções de 3 log obtidas aos 60 e aos 20 dias de retenção (Tabela 3), no DSC e DCC, respectivamente, têm importância na minimização do risco de disseminação de patógenos no solo caso o efluente seja utilizado para adubação, uma vez que são geradas grandes quantidades de resíduos (HUTCHISON et al., 2004).

As reduções das populações de *E. coli*, obtidas no presente estudo, foram superiores as encontradas por Lang e Smith (2008), que obtiveram diminuição equivalente a 1-2 log pelo tratamento de esgoto utilizando digestão anaeróbia mesofílica. Pandey e Soupir (2011) e Manyi-Loh et al. (2014) obtiveram redução na população de *E. coli* de 1 log em 7 a 8 dias e 1-2 log após 62 dias, respectivamente, no processo de biodigestão anaeróbia mesofílica de dejetos de gado leiteiro.

A queda do pH é fator importante na diminuição da população de microorganismos patogênicos no substrato submetido a biodigestão. Segundo Strauch (1986), 90% da redução na população de *Salmonella spp.* foi decorrente da redução do pH no meio, e essa queda foi influenciada pelos ácidos produzidos pelos microorganismos envolvidos no processo de biodigestão, que têm efeito tóxico sobre *Salmonella*. O autor ainda destaca que a amônia não foi responsável pelo decréscimo

da bactéria, pois ela é formada em meio com pH entre 8,0 e 9,0 que é o caso do presente estudo. Moura (2012) afirma que em meios ácidos a atividade enzimática das bactérias é anulada, e em meio significativamente alcalino a fermentação produz anidrido sulfuroso e hidrogênio.

Apesar de o caldo de cana-de-açúcar poder ser utilizado como substrato em biodigestores, com o objetivo principal de incrementar a produção de CH<sub>4</sub>, na prática poderia ocasionar formação rápida de ácidos e diminuição brusca do pH devido ao fornecimento de carboidratos prontamente solúveis (XAVIER; SANTOS; LUCAS JR., 2016). Dessa forma, pode-se observar que também ocorre influência na sanitização das excretas, caso a finalidade seja de utilizá-las como adubo, já que o processo proporciona a utilização em menos tempo e com menor risco à saúde pública, saúde animal e ambiental.

Abdul e Lloyd (1985) verificaram, durante digestão anaeróbia, que a sobrevivência bacteriana teve correlação negativa com a quantidade de ácidos voláteis e positiva com os valores de pH. Segundo Henry et al. (1983), a toxicidade dos ácidos voláteis às bactérias varia com os valores de pH, e observaram que a toxicidade desses ácidos sobre *Salmonella typhimurium* foi muito maior em pH 4,0 do que em pH 5,0 ou superior.

Ratificando a colocação desses autores, Kunte et al. (1998), ao pesquisarem *in vitro* o efeito de ácidos voláteis na sobrevivência de *Salmonella typhi* em fezes bovinas durante a biodigestão anaeróbia, verificaram que altos valores de ácidos em combinação com pH ácido causaram maior grau de inativação desse micro-organismo. Segundo Sahlström (2003) e Kunte, Yeole e Ranade (2004) altos níveis de ácidos voláteis e pH ácido durante a biodigestão são condições tóxicas para muitos micro-organismos.

Os afluentes do DSC e DCC apresentaram amplificação para os genes *stx*<sub>2</sub> e *eae*. No tratamento DSC, a presença de *E. coli* shigatoxigênicas foi detectada no efluente até 40 dias e no DCC apenas no afluente. Em ambos os tratamentos, após os 90 dias de codigestão, *E. coli* do grupo STEC não foram detectadas (Figura 4).

Quando comparado com a redução da população de *E. coli*, 60 dias no DSC e 20 dias no DCC (Tabela 3), a inativação de *E. coli* shigatoxigênicas ocorreu em um período mais curto. O que demonstra que as *E. coli* comensais continuaram ativas por

um período maior. Gonçalves e Marin (2007) também verificaram o maior tempo de sobrevivência de *E. coli*, 120 dias, quando comparado com *E. coli* shigatoxigênicas, que variou de 4 a 30 dias, em tratamento anaeróbico de dejetos bovinos leiteiros.

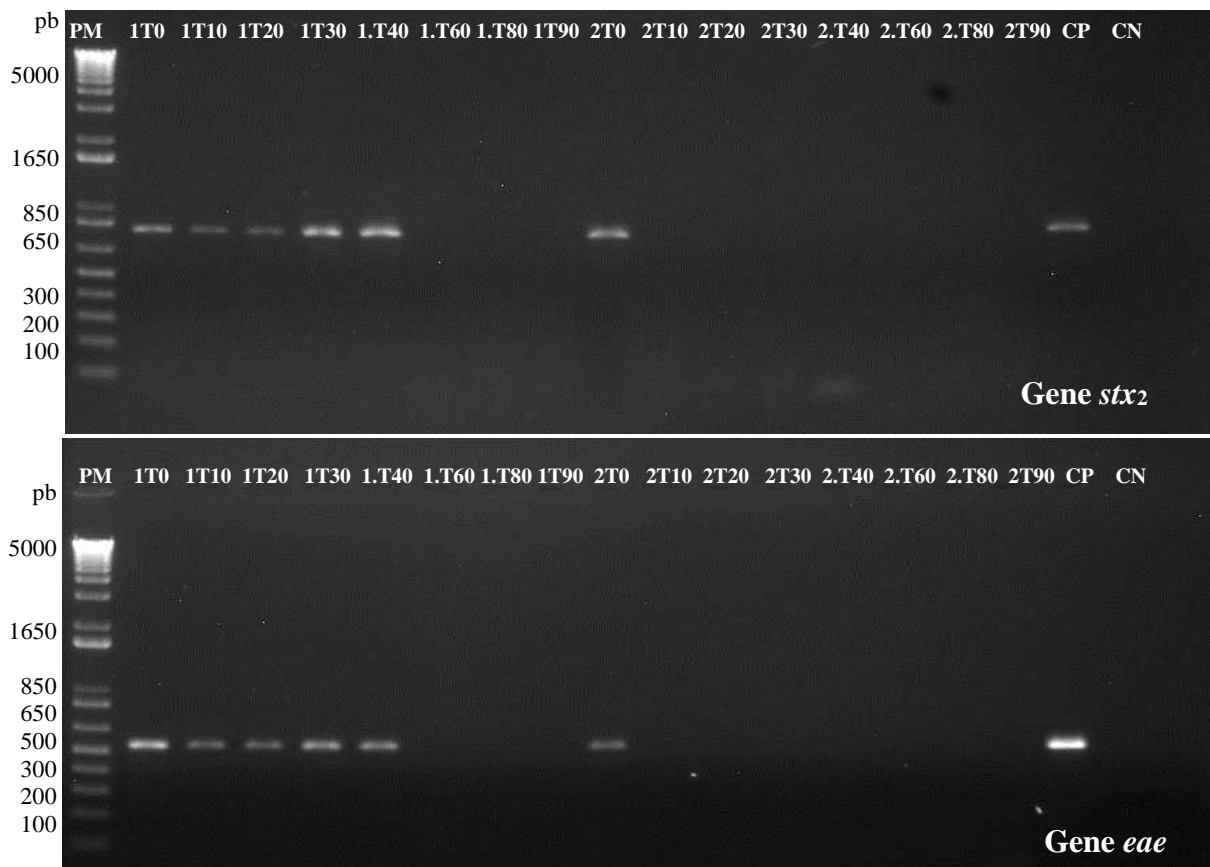


Figura 4. Produtos da amplificação dos genes *stx*<sub>2</sub> e *eae* com 807 e 570 pb, respectivamente. 1T0 a 1T90 (DSC) e 2T0 a 2T90 (DCC) durante os 90 dias de experimento. PM: padrão de tamanho molecular 1Kb plus (Invitrogen). CP: controle positivo. CN: controle negativo.

Kudva, Blanch e Hovde (1998) demonstraram que a 23 °C uma estirpe toxina negativa de *E. coli* O157:H7 sobreviveu por mais tempo do que estirpe toxina positiva. Segundo Van Elsas et al. (2011) essa diferença no tempo de sobrevivência pode estar relacionada ao fato de que as *E. coli* patogênicas para produzirem toxinas requerem mais energia e isso compromete a capacidade de sobrevivência dessas estirpes.

Não foi detectado a presença do gene *stx*<sub>1</sub>, para ambos os tratamentos. Embora Andrade et al. (2012) tenham demonstrado maior prevalência do gene *stx*<sub>1</sub> do que para o *stx*<sub>2</sub> em bezerro leiteiro no Estado de Minas Gerais, o mesmo não foi verificado por Carvalho et al. (2012), Vicente et al. (2010) e Irino et al. (2005) que, assim como

neste estudo, observaram maior prevalência na ocorrência do gene *stx*<sub>2</sub> em relação ao gene *stx*<sub>1</sub> em fezes de bovinos leiteiros.

*Escherichia coli* shigatoxigênicas sobrevivem por períodos consideráveis em fezes animais e podem assim contaminar o solo. Fukushima, Hoshina e Gomyoda (1999) e Duffy (2003) verificaram a sobrevivência dos sorotipos O157:H7 por períodos de 49 a 126 dias, O26:H11 por 112 dias e para o sorogrupo O111 esse tempo foi de 70 dias. Ao chegar ao solo esses micro-organismos podem ficar viáveis por período suficiente para contaminar alimentos e a água. Mukherjee et al. (2006) constataram a sobrevivência desse micro-organismo por mais de 92 dias em solo de jardim e Islam et al. (2004) que verificaram a viabilidade por 154 a 217 dias em solos cultivados, ambos contaminados por fezes animais.

Segundo Fremaux, Prigent-Combaret e Vernozy-Rozand (2008) a digestão anaeróbia representa uma ferramenta importante para sanitização de efluentes, pois é uma estratégia ecológica e reduz significativamente *Escherichia coli* patogênicas, não tem alto custo e é facilmente aplicável no meio rural.

A Instrução Normativa SDA n°27 de 2006, da Secretaria de Defesa Agropecuária, que regulamenta alguns critérios para produção, importação e comercialização de biofertilizantes, determina o número máximo de coliformes termotolerantes de 1000 NMP g<sup>-1</sup> de MS. Os resultados no tratamento DCC enquadraram-se dentro dos critérios estabelecidos, o mesmo não foi observado para o tratamento DSC.

Entretanto, a legislação brasileira é falha no que diz respeito quanto aos critérios para utilização de biofertilizantes para adubação de solo. Portanto, utilizou-se como parâmetro a resolução CONAMA n°375 de 2006, que define os critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário. Nesse caso, os efluentes dos tratamentos DSC e DCC, no que se refere a população de *E. coli*, seriam classificados como sendo classe B. O que implica em suas utilizações restritas ao cultivo de café, silvicultura, culturas para produção de fibras e óleos, com a aplicação mecanizada, em sulcos ou covas, seguida de incorporação.

Dessa forma, fica claro que o tratamento com adição de caldo de cana-de-açúcar se enquadrou nos critérios como biofertilizante. Portanto, viabiliza sua

utilização na forma de adubação, entretanto quando não ocorre a sua adição, sugere-se que seja feito um tratamento de polimento desse efluente.

Portanto, a sanitização do dejetos bovino tem como um dos objetivos principais a sua utilização na adubação orgânica, em função da sua relevância sob os aspectos de saúde humana, saúde animal e ambiental. Entretanto, não existe documentação científica de episódios de doenças causadas por exposição do meio a esterco tratado (BOFILL-MAS et al., 2006).

## **Conclusão**

A codigestão de dejetos bovino leiteiro com 7% de caldo de cana-de-açúcar, mostrou-se muito interessante sob o ponto de vista de sanitização, tendo sido enquadrado nos critérios estabelecidos para biofertilizante. Dessa forma, houve a potencialização da redução população de *E. coli* e inativação da *E. coli* shigatoxigênicas (*stx<sub>2</sub>* e *eae*), o que viabilizou a sua utilização na forma de adubação.

## REFERÊNCIAS

- ABDUL, P., LLOYD, D. Pathogen survival during anaerobic digestion: Fatty acids inhibit anaerobic growth of *Escherichia coli*. **Biotechnol. Lett.**, v. 7, n. 2, p. 125–128, 1985. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF01026683>>
- APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 2012. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22nd ed. APHA. Washington.
- APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 2001. Committee on Microbiological for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. APHA. Washington.
- ANDRADE, G. I.; COURA, F. M.; SANTOS, E. L. S.; FERREIRA, M. G.; GALINARI, G. C. F.; FACURY FILHO, E. J.; CARVALHO, A. U.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. **Trop. Anim. Health. Prod.**, v. 44, n. 7, p. 1783–1790, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11250-012-0139-8>>
- AVERY, S. M.; MOORE, A.; HUTCHISON, M. L. Fate of *Escherichia coli* originating from livestock feces deposited directly onto pasture. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 38, n. 5, p. 355–359, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01501.x>>
- BAGGE, E.; SAHLSTRÖM, L.; ALBIHN, A. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. **Water Res.**, v. 39, n. 20, p. 4879-4886, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2005.03.016>>
- BARBARICK, K. A.; IPPOLITO, J. A. Nutrient assessment of a dry land wheat agroecosystem after 12 years of biosolids applications. **Agron. J.**, v. 99, n. 3, p. 715-722, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2134/agronj2006.0221>>
- BIBBY, K.; VIAU, E.; PECCIA, J. Viral metagenome analysis to guide human pathogen monitoring in environmental samples. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 52, n. 4, p. 386–392, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03014.x>>
- BISWAS, S.; PANDEY, P. K.; FARVER, T. B. Assessing the impacts of temperature and storage on *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *L. monocytogenes* decay in dairy manure. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 39, n. 6, p. 901-913, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00449-016-1569-x>>
- BOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; ALLARD, A.; CALVO, M.; GIRONES, R. Quantitation and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 12, p. 7894–7896, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00965-06>>

CARVALHO, A. F.; MIYASHIRO, S.; NASSAR, A. F. C.; NODA, A.; GABRIEL, D. T.; BALDASSI, L. Caracterização molecular e fenotípica de estirpes de *Escherichia coli* produtoras de shiga-toxina (STEC) não-O157 de fezes e carcaças bovinas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 64, n. 4, p. 881-886, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352012000400014>>

CALDORIN, M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; PERESI, J. T. M.; ALVES, E. C. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **Bol. Epidemiol. Paul.**, São Paulo, v. 10, n. 110, p. 4-20, 2013.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios: princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: Polytécnica LTDA, 246p., 1997.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3462-3465, Set. 1996.

CLIVER, D. O.; MOE, C. L. Prospects of Waterborne Viral Zoonoses. In **Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control**. Cotruvo, J. A., Dufour, A., Rees, G., Bartram, J., Carr, R., Cliver, D. O., Craun, G. F., Fayer, R., Gannon, V. P. J., Eds.; WHO: London, UK, 2004.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente – Resolução nº 375, de 29 de agosto de 2006, “**Define critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências**”. Brasília, Brasil, 2006.

DILALLO, R.; ALBERTON, O. E. Volatile acids by direct titration. **J. Water. Pollut. Control. Fed.**, v. 33, n. 4, p. 356-356, Abr. 1961.

DUFFY, G. Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. **J. Appl. Microbiol.**, v. 94, n. 1, p. 94–103, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.94.s1.11.x>>

FREMAUX, B.; PRIGENT-COMBARET, C.; VERNOZY-ROZAND, C. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: An updated review. **Vet. Microbiol.**, v. 132, n. 1-2, p. 1–18, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.05.015>>

FUKUSHIMA, H., HOSHINA, K., GOMYODA, M. Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine feces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 11, p. 5177–5181, 1999.

GERBA, C. P.; SMITH JR., J. E. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. **J. Environ. Qual.**, v. 34, n. 1, p. 42-48, 2005.

GONÇALVES, V. P.; MARIN, J. M. Fate of non O157 Shiga toxigenic *Escherichia coli* in composted cattle manure. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 825-831, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000400001>>

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4ed. New York: Wiley-Blackwell, 2010. p. 267-308.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. **J. Anim. Sci.**, v. 85, n. 13, p. 45-62, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2527/jas.2006-508>>

HENRY, D. P., FROST, A. J., SAMUEL, J. L., O'BOYLE, D. A., THOMSON, R.H. Factors affecting the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* in anaerobically fermented pig waste. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 55, n. 1, p. 89–95, 1983. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02651.x>>

HORANA, N. L.; FLETCHER, L.; BETMALA, S. M.; WILKSB, S. A.; KEEVILB, C. W. Die-off of enteric bacterial pathogens during mesophilic anaerobic digestion. **Water Res.**, v. 38, n. 5, p. 1113-1120, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.004>>

HUTCHISON, M. L., WALTERS, L. D., AVERY, S. M., SYNGE, B. A., MOORE, A. Levels of zoonotic agents in British livestock manures. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 39, n. 2, p. 207-214, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01564.x>>

IRINO, K.; KATO, M. A. M. F.; VAZ, T. M. I.; RAMOS, I. I.; SOUZA, M. A. C.; CRUZ, A. S.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; GUTH, B. E. C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 105, n. 1, p. 29-36, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.08.007>>

ISLAM, M., DOYLE, M.P., PHATAK, S.C., MILLNER, P., JIANG, X. Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **J. Food Protect.**, v. 67, n. 7, p. 1365–1370, 2004.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro818>>

KUDVA, I. T., BLANCH, K., HOVDE, C. J. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 9, p. 3166–3174, 1998.

KUNTE, D. P.; YEOLE, T. Y.; RANADE, D. R. Two-stage anaerobic digestion process for complete inactivation of enteric bacterial pathogens in human night soil. **Water Sci. Technol.**, v. 50, n. 6, p. 103–108, 2004.

KUNTE, D. P.; YEOLE, T. Y.; CHIPLONKAR, S. A.; RANADE, D. R. Inactivation of *Salmonella typhi* by high levels of volatile fatty acids during anaerobic digestion. **J. Appl. Microbiol.**, v. 84, n. 1, p. 138–142, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00335.x>>

LANG, N. L.; SMITH, S. R. Time and temperature inactivation kinetics of enteric bacteria relevant to sewage sludge treatment processes for agricultural use. **Water Res.**, v. 42, n. 8–9, p. 2229–2241, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2007.12.001>>

MANYI-LOH, C. E.; MAMPHWELI, S. N.; MEYER, E. L.; OKOH, A. I.; MAKAKA, G.; SIMON, M. Inactivation of Selected Bacterial Pathogens in Dairy Cattle Manure by Mesophilic Anaerobic Digestion (Balloon Type Digester). **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 11, n. 7, p. 7184-7194, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijerph110707184>>

MOURA, J. P. **Estudo de casos das rotas tecnológicas para produção de biogás e da influência da composição química de dejetos de matrizes suínas na qualidade do biogás gerada por biodigestor**. 2012. 122 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica), Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

MUKHERJEE, A.; CHO, S.; SCHEFTEL, J.; JAWAHIR, S.; SMITH, K.; DIEZ-GONZALES, F. Soil survival of *Escherichia coli* O157:H7 acquired by a child from garden soil recently fertilized with cattle manure. **J. Appl. Microbiol.**, v. 101, n. 2, p. 429-436, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02913.x>>

NICHOLSON, F. A.; GROVES, S. J.; CHAMBERS, B. J. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. **Bioresour. Technol.**, v. 96, n. 2, p. 135–143, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.030>>

ORRICO, A. C. A.; LOPES, W. R. T.; MANARELLI, D. M.; ORRICO JÚNIOR, M. A. P.; SUNADA, N. S. Codigestão anaeróbia dos dejetos de bovinos leiteiros e óleo de descarte. **Eng. Agric.**, Jaboticabal, v. 36, n. 3, p. 537-545, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1809-4430>>

ORRICO JÚNIOR, M. A. P.; AMORIM, A. C.; LUCAS JÚNIOR, J. Perda de nitrogênio e redução de carbono orgânico durante o processo de compostagem dos resíduos gerados na avicultura de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004.

ORZI, V.; CADENA, E.; D'IMPORZANO, G.; ARTOLA, A.; DAVOLI, E., CRIVELLI, M.; ADANI, F. Potential odour emission measurement in organic fraction of municipal solid waste during anaerobic digestion: relationship with process and biological stability parameters. **Bioresour. Technol.**, v. 101, n. 19, p. 7330–7337, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.098>>

PANDEY, P. K.; SOUPIR, M. L. *Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. **AMB Express**, v. 1, n. 18, p. 1-10, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/2191-0855-1-18>>

PERERA, A.; CLARKE, C. M.; DYKES, G. A.; FEGAN, N. Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* O157 and Non-O157 Isolates from Ruminant Feces in Malaysia. **Biomed Res. Int.**, v. 2015, p. 1-8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/382403>>

POURCHER, A.M.; MORAND, P.; PICARD-BONNAUD, F.; BILLAUDEL, S.; MONPOEHO, S.; FEDERIGHI, M.; MOGUEDET, G. Decrease of enteric microorganisms from rural sewage sludge during their composting in straw mixture. **J. Appl. Microbiol.**, v. 99, n. 3, p. 528–539, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02642.x>>

SAHLSTRÖM, L. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. **Bioresour. Technol.**, v. 87, n. 2, p. 161–166, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00168-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00168-2)>

SAHLSTRÖM, L., BAGGE, E., EMMOTH, E., HOLMQVIST, A., DANIELSSON-THAM, M. L., ALBIHN, A. A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. **Bioresour. Technol.**, v. 99, n. 16, p. 7859–7865, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.071>>

SDA – SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA – Instrução Normativa nº27, de 5 de junho de 2006. “**Limites máximos de contaminantes admitidos em fertilizantes orgânicos e condicionadores de solo**”. Brasília, Brasil, 2006.

SIQUEIRA, A. L.; TIBÚRCIO, J. D. **Estatística na área da saúde: conceitos, metodologia, aplicações e prática computacional**. 538p. Belo Horizonte: Coopmed, 2011.

STRAUCH, D. Animal hygiene and environmental hygiene. **Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. B.**, v. 183, n. 2-3, p. 258-273, 1986.

SUNG, S.; LIU, T. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. **Chemosphere**, v. 53, n. 1, p. 43-52, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00434-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00434-X)>

SUTTON, C. Accuracy of Plate Counts. **J. Val. Technol.**, v. 17, n. 3, p. 42-46, 2011.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2010. **Watershed assessment, Tracking & Environmental Results**. Washington, DC, U.S.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1993. **The Standards for the Use or Disposal of Sewage Sludge**; Final 40 CFR Part 503 Rules; EPA 822/Z-93/001; USEPA: Washington, DC, USA.

VAN ELSAS, J. D.; SEMENOV, A. V.; COSTA, R.; TREVORS, J. T. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. **ISME J.**, v. 5, n. 2, p. 173–183, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2010.80>>

VICENTE, H. I. G.; AMARAL, L. A.; NUNES, A. P.; LORENZON, C. S. *Escherichia coli*, produtoras de shigatoxinas detectadas em fezes de bovinos leiteiros. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 567-573, 2010.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2010. **Water Sanitation and Health**. Geneva, Switzerland.

XAVIER, C. A. N.; SANTOS, T. M. B.; LUCAS JÚNIOR, J. Digestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros: efeito da dieta e da adição de caldo de cana-de-açúcar. **Arch. Zootec.**, v. 65, n. 250, p. 131-138, 2016.

### **CAPÍTULO 3 – Produção de biogás e redução de ovos de helmintos pela codigestão anaeróbia de dejetos bovinos leiteiros com e sem adição de caldo de cana-de-açúcar e biorremediador**

**RESUMO** - O objetivo desse estudo foi avaliar a produção e os potenciais de produção de biogás e, a qualidade do efluente quanto a redução de ovos de helmintos pelo processo de codigestão anaeróbia dos dejetos de bovinos leiteiros, com e sem adição de caldo de cana-de-açúcar e biorremediador. Foram utilizados 20 biodigestores bateladas, com tempo de retenção hidráulica (TRH) de 90 dias, para cada ensaio. No primeiro ensaio, para análise de produção de biogás, os tratamentos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x2 representados pelo biorremediador (com e sem adição) e caldo de cana-de-açúcar (com e sem adição), sendo compostos de cinco repetições por tratamento. No segundo ensaio, para contagem de ovos de helmintos, os biodigestores tiveram a mesma distribuição de tratamentos. Todos os substratos foram calculados para conter 6 % de sólidos totais (ST) e 7% de caldo de cana-de-açúcar quando adicionado. O biorremediador foi acrescido de acordo com a recomendação indicada pelo fabricante. Para todas as variáveis analisadas, produção total e potenciais de produção de biogás, a adição de caldo de cana-de-açúcar interferiu na produção de biogás, apresentando menores médias de produção, quando comparado aos tratamentos que não tiveram sua inclusão. O fator biorremediador apresentou maiores resultados em todas as variáveis analisadas. Foi observado redução de 100% dos ovos de helmintos nos quatro tratamentos. Portanto, a adição de 7% de caldo de cana-de-açúcar levou a instabilidade do processo de codigestão anaeróbia. Quanto a qualidade do efluente, o período de 90 dias de codigestão anaeróbia foi eficaz na eliminação de ovos nematoides gastrointestinais, em todos os substratos analisados.

**Palavras-chave:** Gases de efeito estufa, Helmintos, Sustentabilidade animal, Tratamento de dejetos

## **Biogas production and reduction of helminth eggs by anaerobic codigestion of the dairy cattle waste with and without of sugarcane broth and bioremediator**

**Abstract** - The objective of this study was to evaluate the production and potentials of biogas production and the quality of the effluent verifying the reduction of the helminths egg load by the process of anaerobic codigestion of the dairy cattle waste, with and without addition of sugarcane broth and bioremediator. For this 20 batch type biodigesters were used with 90 days hydraulic retention time (HRT) for each test. In the first experiment, for biogas production analysis, the biodigesters were distributed in a completely randomized design, in a 2x2 factorial arrangement represented by the bioremediator (with and without addition) and sugarcane broth (with and without addition), where each treatment had 5 replicates. In the second experiment, for the analysis of the eggs of helminths, the biodigesters had the same distribution of treatments. All substrates were calculated to contain 6% total solids (TS) and 7% sugar cane broth when added. The bioremediator was added according to the recommendation indicated by the manufacturer. For all analyzed variables, total production and potential biogas production, the addition of sugarcane broth interfered in the biogas production presenting lower production when compared to the treatments that did not have sugarcane broth inclusion. The bioremediation factor presented higher results in all analyzed variables. Reduction of 100% of the helminth eggs was observed in the 4 treatments. However, the addition of sugarcane broth led to the instability of the anaerobic codigestion process. Regarding the quality of the effluent, the 90 days period of anaerobic codigestion for the efficacy of elimination of gastrointestinal nematode eggs, on all substrates analyzed.

**Keywords:** Environmental Sustainability, Helminths, Greenhouse effect, Treatment of manure

## Introdução

A intensificação da produção animal representa um agravo ao ambiente quanto a emissão de gases de efeito estufa. A abundância de resíduos agrícolas no Brasil pode ser utilizada como forma alternativa, por processos de conversão de biomassa, para produção de combustíveis, eletricidade e calor (ROSA et al., 2011; JARDIM, 2013), em substituição aos combustíveis fósseis, por emitirem menor carga poluente à atmosfera (SANTOS; LIMA, 2016), pela escassez de fontes de energia convencionais (CRUZ-ARDILA; CARDONA-GÓMEZ; HERNÁNDEZ-PORRAS, 2013) e a alta no preço do petróleo (GOMES; CAPPI, 2011).

Os dejetos bovinos são ricos em materiais fibrosos de difícil degradação, como a lignocelulose, o que leva ao menor rendimento de biogás, quando comparado a dejetos de outras espécies animais, como os suínos (MOLLER; SOMMER; AHRING, 2004; AMON et al., 2007; ORRICO et al., 2016).

O manejo inadequado desses dejetos, como a utilização e o descarte sem tratamento, são os principais problemas de saneamento enfrentados pela maioria das áreas rurais de países em desenvolvimento (CHAO et al., 2008).

As fezes são os principais meio de disseminação de agentes patogênicos (YONGABI; HARRIS; LEWIS, 2009), seja por meio do manuseio direto (AVERY et al., 2014), ou ainda pelo efeito da lixiviação em água subterrânea e superficial (YONGABI; HARRIS; LEWIS, 2009; BRENNAN et al., 2010), representando risco potencial à saúde animal e humana (BRENNAN et al., 2010).

A utilização desses dejetos de forma inadequada, na adubação de forragens, possibilita a continuidade do ciclo biológico dos nematódeos (DOWNEY; MOORE, 1977), principais parasitas gastrointestinais dos bovinos (FURLONG; PADILHA, 1996). Os nematódeos depositam seus ovos no lumen do abomaso, onde se misturam com o conteúdo chegando ao meio exterior com as fezes (FURLONG; PADILHA, 1996).

Dessa maneira, cria-se uma via fecal-oral com potencial de proporcionar maior ocorrência da doença no rebanho (WRIGHT et al., 2003). A demonstração da presença de ovos e/ou larvas de nematoides nas fezes e cistos de protozoários

proporciona uma evidência positiva de que o animal se encontra infectado (MATTOS JR.; MOTTA, 2009).

Diante deste cenário, processos de biodigestão anaeróbia têm se destacado pela capacidade de redução dos números de agentes patogênicos viáveis dos dejetos (PANDEY; SOUPIR, 2011) e como alternativa ao complemento de energia através do aproveitamento do biogás (GOMES; CAPPI, 2011). Podendo levar a resultados satisfatórios à saúde (AVERY et al., 2014) com a remoção de poluentes ambientais (PIROTA et al., 2015).

Com o objetivo de maximizar a produção de biogás (ORRICO et al., 2016; XAVIER; SANTOS; LUCAS JR., 2016) e também diminuir o tempo de retenção dos substratos (ORRICO et al., 2016), alguns autores têm pesquisado a associação dos dejetos de bovinos leiteiros com diversos resíduos, dentre eles, a manipueira (ANDRADE et al., 2016), o óleo de descarte (ORRICO et al., 2016) e o caldo de cana-de-açúcar (XAVIER; SANTOS; LUCAS JR., 2016). O caldo de cana-de-açúcar tem sido uma opção de substrato para incrementar a produção de biogás, por contribuir com carboidratos prontamente solúveis para o estabelecimento rápido e efetivo de comunidades microbianas típicas da digestão anaeróbia (XAVIER; SANTOS; LUCAS JR., 2016).

Outra alternativa que vem sendo estudada é a inclusão de biorremediadores, micro-organismos utilizados para remover ou reduzir poluentes no ambiente (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005) a níveis aceitáveis, transformando-os em compostos de baixa toxicidade (YAKUBU, 2007). Os biorremediadores foram utilizados por Costa et al., (2013) no tratamento de água residuária de frigorífico, por Costa, Sagula e Lucas Jr. (2014) no tratamento de cama de frango e por Ferreira et al. (2016) no tratamento de dejetos bovinos leiteiros.

Sendo assim, esse estudo teve como objetivos avaliar a produção e os potenciais de produção de biogás e, a qualidade do efluente quanto a redução e ovos de helmintos pelo processo de codigestão anaeróbia mesofílica dos dejetos de bovinos leiteiros, com e sem adição de biorremediador e caldo de cana-de-açúcar.

## Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Os biodigestores foram instalados no Departamento de Engenharia Rural, nos Laboratórios de Biomassa I e II, onde foi feita a avaliação da produção de biogás. As análises parasitológicas foram realizadas no Setor de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal. Os dejetos foram obtidos no setor de Bovinocultura Leiteira do Departamento de Zootecnia, todos situados na mesma instituição. O caldo de cana-de-açúcar foi obtido diretamente com produtores da cidade. O biorremediador, composto de uma mistura de microorganismos (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus polymyxa*, *Yarrowia lipolytica*), foi disponibilizado pelo fabricante do produto.

Para o primeiro ensaio foram utilizados 20 biodigestores bateladas distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x2 representados pelo biorremediador (com e sem adição) e caldo (com e sem adição), onde cada tratamento continha cinco repetições. O tempo de retenção hidráulica (TRH) foi de 90 dias, sendo os biodigestores abertos apenas no final do período.

Os biodigestores bateladas de bancada (Figura 1) são constituídos, basicamente, por três cilindros retos de PVC com diâmetros de sete e meio, dez e 15 cm, acoplados a um cap, com capacidade média aproximada de dois litros de substrato em fermentação. Os cilindros de sete e meio e 15 cm encontram-se inseridos um no interior do outro, de tal 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 de água”), atingindo profundidade de 50 cm. O cilindro de diâmetro intermediário tem uma das extremidades vedada com um cap, que contém um registro para descarga do biogás, e permanece inserido no selo de água, para propiciar condições anaeróbias e armazenar o gás produzido.

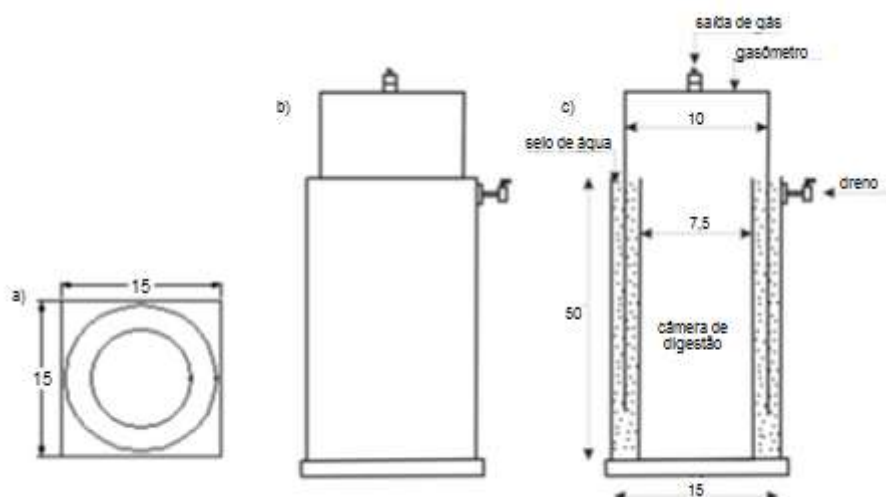


FIGURA 1. Planta baixa (a), vista lateral (b) e corte transversal (c) dos biodigestores de bancada (cm) (ORRICO JR.; AMORIM; LUCAS JR., 2004).

O estudo foi dividido em quatro tratamentos designados da seguinte maneira, SBSC (sem biorremediador e sem caldo), CBSC (com biorremediador e sem caldo), SBCC (sem biorremediador e com caldo) e CBCC (com biorremediador e com caldo).

Para o preparo do substrato da carga inicial foram pesados e homogeneizados os dejetos frescos, água, biorremediador e caldo de cana-de-açúcar. Os substratos foram calculados para conter 6 % de sólidos totais (ST) e 7% de caldo de cana-de-açúcar. O biorremediador foi acrescido de acordo com a recomendação indicada pelo fabricante,  $10 \text{ g L}^{-1}$  de afluente a ser tratado. As proporções utilizadas para o abastecimento de cada tratamento e suas respectivas repetições estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes dos substratos utilizados para o abastecimento e composição química dos diferentes tratamentos dos biodigestores bateladas.

	Água (L)	Dej. Bov. leite (Kg)	Biorremediador (g)	Caldo (L)	pH	Sólidos totais (%)	Sólidos voláteis (%)
SBSC	7,2	3,6	-	-	6,21	5,18	4,22
CBSC	7,2	3,6	108	-	5,99	5,29	3,89
SBCC	6,444	3,6	-	0,756	6,07	5,36	4,26
CBCC	6,444	3,6	108	0,756	5,95	7,36	6,00

SBSC= Sem biorremediador e sem caldo, CBSC= Com biorremediador e sem caldo, SBCC= Sem biorremediador e com caldo, CBCC= Com biorremediador e com caldo.

A determinação de sólidos totais (ST) foi realizada no dia do abastecimento e ao final do experimento, segundo metodologia descrita por APHA (2005). As amostras dos afluentes e efluentes foram acondicionadas em triplicata em recipientes de alumínio, previamente tarados, pesados para obtenção do peso úmido (Pu) do material. Após a pesagem foram levados à estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65° C até atingirem peso constante, sendo a seguir resfriadas em dessecador e novamente pesadas em balança com precisão de 0,01g, obtendo-se então o peso seco (Ps).

Os teores de sólidos voláteis (SV), do abastecimento e desabastecimento, foram expressos em porcentagem de matéria seca, segundo metodologia descrita por APHA (2005). O material seco em estufa resultante da determinação dos ST foi levado à mufla, em cadinhos de porcelana previamente tarados, e mantidos a uma temperatura de 575 °C por um período de duas horas e 30 minutos. O material resultante, após resfriamento, foi pesado em balança analítica com precisão de 0,0001g, obtendo-se o peso das cinzas ou matéria mineral. O teor de sólidos voláteis foi obtido subtraindo-se o peso das cinzas do valor do peso de sólidos totais.

A leitura dos dados para produção de biogás foi realizada conforme o acúmulo no gasômetro. A leitura consistia do deslocamento vertical do gasômetro medida na régua fixada junto ao biodigestor. O número obtido na leitura foi multiplicado pela área de seção transversal interna dos gasômetros e a correção do volume de biogás para as condições de 1 atm em 20°C, foi efetuada com base no trabalho de Caetano (1985), onde, pelo fator de compressibilidade (Z), o biogás apresenta comportamento próximo ao ideal.

Os potenciais de produção de biogás foram calculados utilizando-se os dados de produção e as quantidades de ST e SV adicionados nos biodigestores, além das quantidades de ST e SV reduzidos durante o processo de codigestão anaeróbia. Os valores foram expressos em m<sup>3</sup> de biogás por kg de substrato, de dejetos ou de ST e SV.

Paralelamente, um segundo ensaio com as mesmas distribuições de tratamentos foi conduzido para verificar a ação da codigestão anaeróbia na redução do número de ovos de helmintos. Para tanto, os substratos foram contaminados com

fezes de bezerros leiteiros positivos para ovos de helmintos nas proporções descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Componentes dos substratos utilizados para o abastecimento dos diferentes tratamentos dos biodigestores bateladas.

	Água (L)	Dej. Bov. leite (Kg)	Dej. Bezerro (Kg)	Biorremediador (g)	Caldo (L)
SBSC	7,2	2,4	1,2	-	-
CBSC	7,2	2,4	1,2	108	-
SBC	6,444	2,4	1,2	-	0,756
CBCC	6,444	2,4	1,2	108	0,756

SBSC= Sem biorremediador e sem caldo, CBSC= Com biorremediador e sem caldo, SBC= Sem biorremediador e com caldo, CBCC= Com biorremediador e com caldo.

No abastecimento foram colhidas 20 amostras (quatro tratamentos e cinco repetições) dos afluentes em frascos estéreis de 20 mL para realização da contagem de ovos de nematódeos gastrointestinais pela Técnica de Gordon e Whitlock modificada, segundo Ueno e Gonçalves (1994). Com o objetivo de verificar a viabilidade dos ovos, foi realizada técnica de coprocultura quantitativa descrita por Ueno e Gonçalves (1998).

Ao final do ensaio, no desabastecimento, foram colhidas 20 amostras dos efluentes em frascos estéreis de 20 mL para análise qualitativa da presença de ovos de helmintos pela Técnica de Willis segundo Ueno e Gonçalves (1994). Caso fosse verificada a presença de ovos viáveis seria realizada a contagem e a coprocultura.

As variáveis ST, SV, produção total (Prod. total) e potenciais de produção de biogás foram analisados com o pacote SAS<sup>®</sup> (SAS INSTITUTE, 2002). Antes das análises propriamente ditas, os dados foram analisados em relação à presença de informações discrepantes (“outliers”) e normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk). Quando a premissa de normalidade não foi atendida, a transformação logarítmica ou pela raiz quadrada foi necessária.

Os dados foram analisados de acordo com o Proc Mixed para modelos mistos. Para as análises, dentre as 12 diferentes estruturas de covariância testadas, a que melhor se ajustou ao modelo estatístico foi escolhida com base no menor valor do critério de informação Akaike corrigido (AICC) (WANG; GOONEWARDENE, 2004). O modelo incluiu efeitos fixos de tratamento (efeito do biorremediador e efeito de caldo)

e as interações duplas entre os fatores. Os efeitos de tratamentos foram separados pelo teste de Tukey. Para todos os testes realizados foi adotado o nível de significância de 5%.

## Resultados e discussão

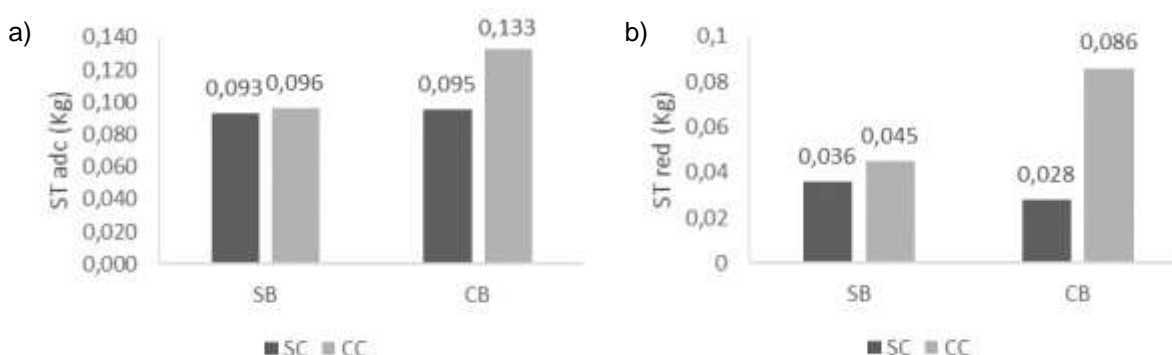
As variáveis ST adicionado e reduzido (ST adc e ST red) e SV adicionado e reduzido (SV adc e SV red) obtiveram interação ( $p < 0,05$ ) entre os fatores biorremediador vs caldo (Tabela 3).

Tabela 3. Variáveis sólido total e volátil adicionados e reduzidos em função dos fatores biorremediador (bio) vs caldo.

Variáveis	Tratamentos				EPM	Valores de p		
	Biorremediador		Caldo			Bio	Caldo	Bio*Caldo
	Com	Sem	Com	Sem				
ST adc (Kg)	0,1139	0,0949	0,1145	0,0943	0,0037	<0,0001	<0,0001	<0,0001
ST red (Kg)	0,0570	0,0410	0,0660	0,0320	0,0055	0,0002	<0,0001	<0,0001
SV adc (Kg)	0,0978	0,0774	0,0932	0,0820	0,0028	<0,0001	<0,0001	<0,0001
SV red (Kg)	0,0540	0,0330	0,0550	0,0320	0,0045	<0,0001	<0,0001	0,0001

EPM: erro padrão da média. ST adc = sólido total adicionado, ST red = sólido total reduzido, SV adc = sólido volátil adicionado, SV red = sólido volátil reduzido.

Para as variáveis ST (Figuras 2 a, b) e SV (Figuras 3 a, b) adc e red as maiores médias foram representadas pelos tratamentos que tiveram adição de caldo de cana-de-açúcar, quando comparadas com os tratamentos sem adição de caldo.



Figuras 2 a, b. Interação dos fatores biorremediador vs caldo para as variáveis ST adc e red.

As maiores médias para os tratamentos que tiveram adição de caldo de cana-de-açúcar podem ter ocorrido devido a sua possibilidade de acrescentar sólidos ao substrato. Xavier, Santos e Lucas Jr. (2016) também observaram ligeiro aumento nos teores de ST e SV para os tratamentos com inclusão de caldo de cana-de-açúcar.

Entretanto, as maiores reduções de ST e SV ocorreram nos tratamentos sem adição de caldo (Tabela 4). A associação de dejetos com outros tipos de resíduos tem como objetivo maximizar a atividade dos micro-organismos, como pode ser observado no ensaio realizado por Orrico et. al. (2016) na codigestão de dejetos de bovinos leiteiros com óleo de descarte. Esses autores relataram que os tratamentos com a inclusão do óleo obtiveram maiores percentuais de redução de ST e SV, o que não foi observado no presente estudo. Neste caso, a proporção de caldo de cana-de-açúcar pode não ter sido adequada, prejudicando a atividade das bactérias responsáveis pela degradação da matéria orgânica.

Tabela 4. Percentual de redução para ST e SV, para todos os tratamentos.

	Redução	
	ST (%)	SV (%)
SBSC	61,29	60,53
CBSC	70,52	61,62
SBCC	53,12	53,84
CBCC	35,33	32,72

SBSC= Sem biorremediador e sem caldo. CBSC= Com biorremediador e sem caldo, SBCC= Sem biorremediador e com caldo, CBCC= Com biorremediador e com caldo.

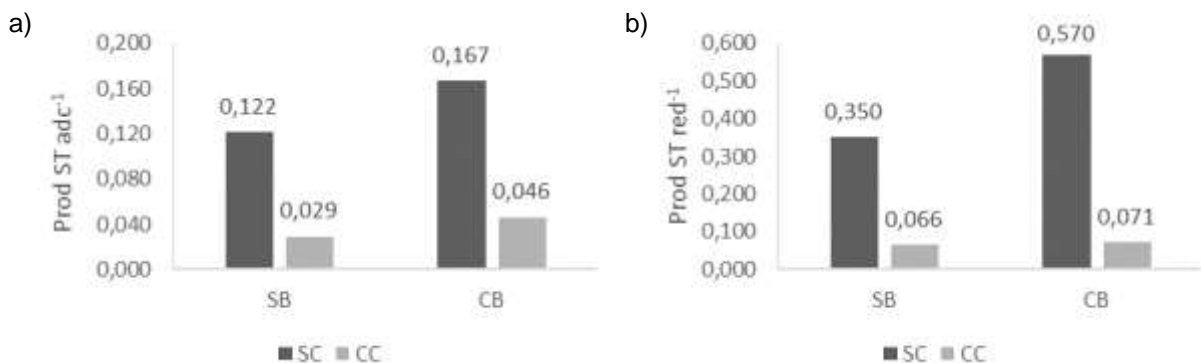
Entre as variáveis analisadas, para produção total de biogás (Prod total), potencial de produção de biogás por SV adicionados e reduzidos (Pot prod SV  $\text{adc}^{-1}$  e Pot prod SV  $\text{red}^{-1}$ ) e pH desabastecimento (pH desab) não houve interação ( $p > 0,05$ ) entre os fatores biorremediador (bio) vs caldo. No entanto, para essas variáveis houve efeito fixo ( $p < 0,05$ ), onde os tratamentos com adição do biorremediador tiveram as maiores médias para Prod total ( $0,012 \text{ m}^3$ ), Pot prod SV  $\text{adc}^{-1}$  ( $0,12 \text{ m}^3$ ) e para Pot prod SV  $\text{red}^{-1}$  ( $0,26 \text{ m}^3$ ), quando comparado aos tratamentos que não tiveram adição do biorremediador. Os tratamentos que não utilizaram a adição de caldo de cana-de-açúcar obtiveram maiores resultados na Prod total ( $0,013 \text{ m}^3$ ), Pot prod SV  $\text{adc}^{-1}$  ( $0,17 \text{ m}^3$ ) e Pot prod SV  $\text{red}^{-1}$  ( $0,43 \text{ m}^3$ ), quando confrontado aos tratamentos que tiveram inclusão do caldo. A menor média para pH ocorreu quando houve a adição de caldo de cana-de-açúcar (Tabela 5).

Tabela 5. Variáveis de produção e potencial de produção de biogás em função dos fatores biorremediador vs caldo.

Variáveis	Tratamentos				EPM	Valores de p		
	Biorremediador		Caldo			Bio	Caldo	Bio*Caldo
	Com	Sem	Com	Sem				
Prod total (m <sup>3</sup> )	0,0120	0,0071	0,0046	0,0130	0,0012	<0,0001	<0,0001	0,0968
Pot prod ST adc <sup>-1</sup> (m <sup>3</sup> Kg <sup>-1</sup> )	0,1100	0,0760	0,0380	0,1400	0,0130	<0,0001	<0,0001	0,0072
Pot prod ST red <sup>-1</sup> (m <sup>3</sup> Kg <sup>-1</sup> )	0,3210	0,2061	0,0690	0,4586	0,0490	0,0005	<0,0001	0,0008
Pot prod SV adc <sup>-1</sup> (m <sup>3</sup> Kg <sup>-1</sup> )	0,1200	0,0930	0,0460	0,1700	0,0150	<0,0001	<0,0001	0,2065
Pot prod SV red <sup>-1</sup> (m <sup>3</sup> Kg <sup>-1</sup> )	0,2701	0,2490	0,0830	0,4400	0,0430	0,5350	<0,0001	0,5657
pH desab	5,60	5,66	4,65	6,61	0,23	0,4390	<0,0001	0,3421

EPM: erro padrão da média. Prod total = Produção total, Pot prod ST adc<sup>-1</sup> = Potencial de produção por sólido total adicionado, Pot prod ST red<sup>-1</sup> = Potencial de produção por sólido total reduzido, Pot prod SV adc<sup>-1</sup> = Potencial de produção por sólido volátil adicionado, Pot prod. SV red<sup>-1</sup> = Potencial de produção por sólido volátil reduzido, pH desab= pH do desabastecimento.

As variáveis de potenciais de produção de biogás por ST adicionado e reduzido (Pot prod ST adc<sup>-1</sup> e Pot prod ST red<sup>-1</sup>) apresentaram interação ( $p < 0,05$ ) entre os fatores biorremediador vs caldo. Os tratamentos com adição do biorremediador e sem adição de caldo de cana-de-açúcar para essas duas variáveis, foram os que obtiveram maiores médias para o potencial de produção de biogás, quando comparado aos que não incluíram o biorremediador e aos que tiveram inclusão de caldo de cana, respectivamente. A interação entre os fatores para essas variáveis não foi favorável, visto o menor rendimento no potencial de produção de biogás ao incluir caldo de cana-de-açúcar. Portanto, o tratamento CBSC foi o que apresentou maiores médias tanto para Pot prod ST adc<sup>-1</sup> (0,1669 m<sup>3</sup>) quanto para Pot prod ST red<sup>-1</sup> (0,57 m<sup>3</sup>), quando confrontado com o tratamento CBCC (Figuras 4 a, b).

Figuras 4 a, b. Interação dos fatores biorremediador vs caldo para as variáveis Pot prod ST adc<sup>-1</sup> e red<sup>-1</sup>.

A inclusão do biorremediador pode ter influenciado na disponibilidade de micro-organismos que auxiliam na degradação da matéria orgânica, favorecendo a produção de gás. Costa, Sagula e Lucas Jr. (2014) observaram o maior rendimento no tratamento de cama de frango de corte nos biodigestores com inclusão de biorremediador. Entretanto, Ferreira et al. (2016) não observaram diferença estatística para produção de biogás no tratamento de dejetos de bovinos leiteiros com a inclusão de biorremediador.

Na teoria, a adição de caldo de cana-de-açúcar contribui com carboidratos prontamente solúveis (XAVIER; SANTOS; LUCAS JR., 2016) o que pode ocasionar a formação rápida de ácidos e diminuição brusca do pH (BRANDÃO et al., 2008) e, portanto, incrementar a produção de biogás (XAVIER; SANTOS; LUCAS JR., 2016). Entretanto, a manutenção do pH baixo durante o processo, pode levar a um meio muito ácido, afetando a multiplicação das bactérias metanogênicas (MANYI-LOH et al., 2013) que são muito sensíveis a esse ambiente (BROWN; SHI; LI, 2012).

Neste estudo foi possível inferir que as reduções dos teores de ST e SV estão diretamente associadas a produção e os potenciais de produção de biogás. Sendo que os substratos que tiveram maiores reduções de sólidos (sem caldo) obtiveram as maiores produções total e produções específicas por ST e SV adc e red (Tabela 4 e 5). A medida de potencial de produção é essencial para estimar a quantidade de energia disponível no resíduo, o volume útil e o volume de substrato necessário para suprir a demanda energética de cada biodigestor (ORTOLANI et al., 1986).

Dessa maneira fica evidenciado que para os tratamentos com adição de caldo pode ter ocorrido a exaustão do processo de codigestão pelo excesso de acidez no meio, afetando negativamente a produção de biogás (Tabela 5). Visto que para o melhor desenvolvimento da atividade dos micro-organismos é necessário um pH próximo da neutralidade, sendo considerado ideal entre 6,6 a 7,4 para a biodigestão anaeróbia (CHERNICHARO, 1997).

Resultados semelhantes foram observados por Xavier e Lucas Jr. (2009) ao adicionarem 10% de caldo de cana-de-açúcar na codigestão anaeróbia de dejetos bovinos leiteiros, causando queda na produção total de biogás. O mesmo não ocorreu no ensaio realizado por Xavier, Santos e Lucas Jr. (2016), ao utilizarem a adição de 6% de caldo de cana-de-açúcar em tratamento de dejetos de bovinos leiteiros em

biodigestores bateladas, igualmente em condições mesofílicas. Nesse estudo, os tratamentos que utilizaram o caldo de cana obtiveram maiores produções de metano (CH<sub>4</sub>), comparados aos tratamentos que não houve adição.

Com relação a ovos de helmintos nos afluentes de abastecimento dos biodigestores foram observadas variações de 4.166 a 10.000 ovos g<sup>-1</sup> ST para SBSC, de 3.333 a 11.666 ovos g<sup>-1</sup> ST para CBSC, de 4.166 a 8.333 ovos g<sup>-1</sup> ST para SBCC e de 5.000 a 13.333 ovos g<sup>-1</sup> ST para CBCC (Tabela 6).

Tabela 6. Variação da contagem de ovos de helmintos, nos diferentes tratamentos, para o abastecimento dos biodigestores bateladas.

	SBSC (ovos g <sup>-1</sup> ST)	CBSC (ovos g <sup>-1</sup> ST)	SBCC (ovos g <sup>-1</sup> ST)	CBCC (ovos g <sup>-1</sup> ST)
A	10000	3333	4167	5000
B	6667	10833	4167	9167
C	5833	4167	8333	8333
D	4167	3333	7500	5833
E	10000	11667	7500	13333

SBSC = Sem biorremediador e sem caldo, CBSC = Com biorremediador e sem caldo, SBCC = Sem biorremediador e com caldo, CBCC = Com biorremediador e com caldo. A, B, C, D, E = repetições.

Para verificar a viabilidade dos ovos, foi realizada a coprocultura com a identificação da presença de larvas de *Haemonchus spp.* e de *Cooperia spp.* Ao final do tratamento, TRH 90 dias, foram encontrados apenas 3 ovos, 1 no SBCC e 2 ovos no CBCC, com modificações estruturais que demonstravam não estar viáveis, portanto ocorreu a redução de 100% na contaminação das fezes por ovos de helmintos após o tratamento em biodigestores bateladas. Essas observações estruturais nos ovos de helmintos também foram identificadas por Mentz, Wiest e Gonçalves (2004) a partir de 42 dias de tratamento de dejetos de bovinos leiteiros em biodigestores anaeróbios.

Como o principal objetivo do material tratado é a sua utilização do material como biofertilizante, foi utilizada como parâmetro, no que se refere a contagem de ovos viáveis de helmintos, a Instrução Normativa SDA n°27 de 2006, da Secretaria de Defesa Agropecuária. Com base nessa instrução normativa, que determina o máximo de 1 ovo viável 4 g<sup>-1</sup> de ST. Os resultados em todos os tratamentos enquadraram-se dentro dos critérios estabelecidos.

O resultado observado nesse trabalho mostra que o tempo pode ter influenciado favoravelmente à redução de ovos de helmintos quando comparado ao encontrado por Quadros et al. (2010), que obtiveram redução de 96% de ovos de helmintos ao utilizar biodigestores anaeróbios para tratamento de dejetos de caprinos e ovinos, com tempo de retenção de 45 dias.

Amaral et al. (2004) ao tratar dejetos bovinos leiteiros em biodigestores dos modelos indiano e chinês obtiveram resultados positivos nos efluentes para redução de larvas de *Haemonchus spp.* e *Cooperia spp.* com 45 dias de retenção, o que reforça a hipótese da influência do tempo na redução da quantidade de ovos pelo tratamento por biodigestão anaeróbia dos resíduos animais.

Mentz, Wiest e Gonçalves (2004) relataram que o tempo influenciou na redução de 100% de larvas de *Haemonchus spp.* e *Cooperia spp.*, que foram controladas em 14 dias. Entretanto, a redução completa do número de ovos de outros helmintos foi observada após 35 dias de retenção. De fato, inúmeros autores (NUNEZ et al., 1987; FURLONG; PADILHA, 1996; AMARAL et al., 2004; QUADROS et al., 2010; CAÑON-FRANCO; HENAO-AGUDELO; PÉREZ-BEDOYA, 2012) demonstram a necessidade de períodos superiores a 30 dias para melhor remoção de ovos de helmintos em dejetos tratados de espécies distintas.

## **Conclusão**

Sob o ponto de vista de produção de biogás, o fator biorremediador apresentou maiores resultados em todas as variáveis analisadas, enquanto a adição de caldo de cana-de-açúcar levou a instabilidade do processo de codigestão anaeróbia. Entretanto, com base no exposto a associação do biorremediador com caldo de cana-de-açúcar pode ser favorável, caso seja feita a adequação da proporção de caldo de cana-de-açúcar que deve ser inferior a 7%. Sob o aspecto de qualidade do efluente, o período de 90 dias de codigestão anaeróbia em condições mesofílicas foi eficaz na eliminação de ovos nematoides gastrointestinais, em todos os efluentes analisados.

## REFERÊNCIAS

AMARAL, C. M. C.; AMARAL, L. A.; LUCAS JÚNIOR, J.; NASCIMENTO, A. A.; FERREIRA, D. S.; MACHADO, M. R. F. Biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros submetidos a diferentes tempos de retenção hidráulica. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1897-1902, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000600035> >

AMON, T.; AMON, B.; KRYVORUCHKO, V.; ZOLLITSCH, W.; MAYER, K.; GRUBER, L. Biogas production from maize and dairy cattle manure – influence of biomass composition on the methane yield. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v. 118, n. 1-4, p. 173-182, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2006.05.007>>

ANDRADE, W. R.; XAVIER, C. A. N.; COCA, F. O. C. G.; ARRUDA, L. D. O.; SANTOS, T. M. B. Biogas production from ruminant and monogastric animal manure co-digested with manipueira. **Arch. Zootec.**, v. 65, n. 251, p. 375-380, 2016.

APHA; AWWA; WEF. Multiple tube fermentation technique for members of the coliform group. In: \_\_\_\_\_. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21st ed. Washington DC: APHA, 2005.

AVERY, L. M.; ANCHANG, K. Y.; TUMWESIGE, V.; STRACHAN, N.; GOUDE, P. J. Potential for Pathogen reduction in anaerobic digestion and biogas generation in Sub-Saharan Africa. **Biomass Bioenerg.**, v. 70, p. 112–124, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.01.053>>

BRANDÃO, L. V.; NERY, T. B. R.; MACHADO, B. A. S.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Produção de goma xantana obtida a partir do caldo de cana. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, p. 217-222, 2008.

BRENNAN, F. P.; O'FLAHERTY, V.; KRAMERS, G.; GRANT, J.; RICHARDS, K. G. Long-Term Persistence and Leaching of *Escherichia coli* in Temperate Maritime Soils. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 5, p. 1449–1455, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02335-09>>

BROWN, D.; SHI, J.; LI, Y. Comparison of solid-state to liquid anaerobic digestion of lignocellulosic feedstocks for biogas production. **Bioresour. Technol.**, v. 124, p. 379-386, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.051>>

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

CAÑON-FRANCO, W. A.; HENAO-AGUDELO, R. A.; PÉREZ-BEDOYA, J. L. Recovery of gastrointestinal swine parasites in anaerobic biodigester systems. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 249-253, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612012000300013> >

CHAO, R.; SOSA, R.; PEREZ, A. A.; CRUZ, E. A study of pig wastewater treatment with low cost biodigesters. **Livestock Res. Rural Dev.**, v. 20, n. 9, 2008.

CHERNICHARO, C. A. L. de. **Reatores anaeróbios: princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: Polytécnica LTDA, 246p. 1997.

COSTA, L. V. C.; SAGULA, A. L.; LUCAS JÚNIOR, J. Uso de remediadores biológicos na biodigestão anaeróbia da cama de frango de corte. In. XLII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 2014, Campo Grande. **Resumos...** Campo Grande: XLII CONBEA, 2014.

COSTA, L. V. C.; MOGHRABI, J. A.; SAGULA, A. L.; LUCAS JÚNIOR, J. Tratamento anaeróbio da água residuária de frigorífico com uso de biodigestores: utilização de remediadores biológicos para produção de biogás. **Braz. J. Biosyst. Eng.**, Tupã, v. 7, n. 2, p. 77-85, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18011/bioeng2013v7n2p77-85>>

CRUZ-ARDILA, J. C.; CARDONA-GÓMEZ, J. C.; HERNÁNDEZ-PORRAS, D. M. Aplicación electrónica para el ahorro de energía eléctrica utilizando una energía alternativa. **Entramado**, v. 9, n. 2, p. 234-248, 2013.

DOWNEY, N. E.; MOORE, J. F. Trichostrongylid contamination of pasture fertilized with cattle slurry. **Vet. Rec.**, v. 101, n. 24, p. 487-488, 1977.

FERREIRA, L. M. S.; BRANCO, P. M. P.; NOGUEIRA, R. G. S.; OTENIO, M. H.; LUCAS JÚNIOR, J. Adição de biorremediador em dejetos bovinos leiteiros em biodigestores bateladas para produção de biogás. In: XLV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 2016, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: XLV CONBEA, 2016.

FURLONG, J.; PADILHA, T. Viabilidade de ovos de nematódeos gastrintestinais de bovinos após passagem em biodigestor anaeróbio. **Ciênc. Rural**, v. 26, n. 2, p. 269-271, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781996000200017>>

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Cienc. Desenvol.**, v. 8, n. 34, p. 36-43, 2005.

GOMES, F. O. C.; CAPPI, N. Redução de Sólidos de Dejetos de Poedeiras em Biodigestores Operados com Diferentes Tempos de Retenção Hidráulica. In: 2º EPEX-ENCONTRO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2011. **Anais...** Dourados: 9º ENIC- Encontro de iniciação científica, 2011.

JARDIM, C. A. M. **Valorização Econômica do Biogás: Geração Elétrica vs Produção de Biometano para Injeção na Rede**. 2013. 98f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção). Instituto Politécnico Setubal, 2013.

MANYI-LOH, C. E.; MAMPHWELI, S. N.; MEYER, E. L.; OKOH, A. I.; MAKAKA, G.; SIMON, M. Microbial anaerobic digestion as an approach to the decontamination of animal wastes in pollution control and generation of renewable energy. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 10, n. 9, p. 4390–4417, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijerph10094390>>

MATTOS JR., D. G.; MOTTA, O. V. Ocorrência de ovos de helmintos e cistos de protozoários em amostras de fezes de animais domésticos no município de Teresópolis. **PUBVET**, Londrina, v. 3, n. 9, 2009.

MENTZ, M. B.; WIEST, J. M.; GONÇALVES, P. D. Viability of bovine's Strongyloidea eggs in a system of anaerobic biodigestion. **Parasitol. Latinoam.**, Santiago, v. 59, n. 3-4, p. 148-152, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122004000300010>>

MOLLER, H. B.; SOMMER, S. G.; AHRING, B. K. Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. **Biomass Bioenerg.**, v. 26, n. 4, p. 485-495, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.08.008>>

NUNEZ, S. F.; URRUTIA, S. F.; URCELAY, V. S.; OVIEDO, H. P. Microbiological and parasitological study in swine manure treated by anaerobic biodigestion. **Av. Cs. Vet.**, v. 2, n. 1, p. 37-41, 1987.

ORRICO, A. C. A.; LOPES, W. R. T.; MANARELLI, D. M.; ORRICO JÚNIOR, M. A. P.; SUNADA, N. S. Codigestão anaeróbia dos dejetos de bovinos leiteiros e óleo de descarte. **Eng. Agric.**, Jaboticabal, v. 36, n. 3, p. 537-545, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1809-4430>>

ORRICO JÚNIOR, M. A. P.; AMORIM, A. C.; LUCAS JÚNIOR, J. Perda de nitrogênio e redução de carbono orgânico durante o processo de compostagem dos resíduos gerados na avicultura de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004.

ORTOLANI, A. F.; BENINCASA, M.; LOPES, L. R.; BEDUSCHI, L. C.; LUCAS JR. J.; ARAUJO, J. A. C.; GALBIATTI, J. A.; MILANI, A. P.; DANIEL, L. A.; LATANZE, R. J.; COAN, O.; PAVANI, L. C. Bateria de mini-biodigestores: estudo, projeto, construção e desempenho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 15, São Paulo. **Anais...** Botucatu: UNESP, p. 229-239, 1986.

PANDEY, P. K.; SOUPIR, M. L. *Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. **AMB Express**, v. 1, n. 18, p. 1-10, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/2191-0855-1-18>>

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; TREMACOLDI, C. R.; FARINAS, C. S. Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal.

**Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 9, p. 1606-1612, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141241>>

QUADROS, D. G.; OLIVER, A. P. M.; REGIS, U.; VALLADARES, R.; SOUZA, P. H. F.; FERREIRA, E. J. Biodigestão anaeróbia de dejetos de caprinos e ovinos em reator contínuo de PVC flexível. **Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.**, Campina Grande, v. 14, n. 3, p. 326–332, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662010000300014>>

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. Valorização de resíduos da agroindústria. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E AGROINDUSTRIAIS, 2011, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Foz do Iguaçu: II SIGERA, 2011. p. 98-105.

SANTOS, R. B; LIMA, A. K. C. Análise comparativa do biogás: processo em biodigestores e de aterro sanitário. **Ver. Eletr. Energ.**, v. 6, n. 1, p. 48-57, 2016.

SAS - STATISTICAL ANALYSES SYSTEM INSTITUTE. 2002. **Guide of personal computers**. Version 9.2. Inc., Cary, NC.

SDA – SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA – Instrução Normativa nº27, de 5 de junho de 2006. “**Limites máximos de contaminantes admitidos em fertilizantes orgânicos e condicionadores de solo**”. Brasília, Brasil, 2006.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4<sup>o</sup>ed. Tokio: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143p.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 3<sup>o</sup>ed. Tokio: Japan International Cooperation Agency, 1994.

WANG, L. A.; GOONEWARDENE, Z. The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 84, n. 1, p. 1-11, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4141/A03-123>>

WRIGHT, P. E.; INGLIS, S. F.; STEHMAN, S. M.; BONHOTAL, J. Reduction of selected pathogens in anaerobic digestion. **Am. Soc. Agric. Biol. Eng.**, St. Joseph, p. 74–82, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.13031/2013.15236>>

XAVIER, C. A. N.; LUCAS JÚNIOR, J. Caldo de cana-de-açúcar na biodigestão anaeróbia de dejetos de vacas em lactação: biodigestores contínuos. In: VI CONGRESSO DE MEIO AMBIENTE DA ASSOCIAÇÃO UNIVERSIDADES GRUPO MONTEVIDÉU, 5, 2009, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2009.

XAVIER, C. A. N.; SANTOS, T. M. B.; LUCAS JÚNIOR, J. Digestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros: efeito da dieta e da adição de caldo de cana-de-açúcar. **Arch. Zootec.**, v. 65, n. 250, p. 131-138, 2016.

YAKUBU, M. B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. **Afr. J. Biotechnol.**, Nigeria, v. 6, n. 24, p. 2735-2739, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJB2007.000-2437>>

YONGABI, K. A.; HARRIS, P. L.; LEWIS, D. M. Poultry faeces management with a simple low cost plastic digester. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 8, n. 8, p. 1560-1566, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJB2009.000-9232>>

## CAPÍTULO 4 – Considerações finais

Como descrito no decorrer do trabalho, a intensificação da produção animal gera grande quantidade de dejetos e a sua deposição, *in natura*, pode levar a contaminação do solo, da água e do ar. Dessa forma, pode promover reflexos importantes sob os aspectos de saúde humana, saúde animal e saúde ambiental, o tripé indissociável que conceitua o termo saúde única.

É fundamental para garantir o equilíbrio entre o agente etiológico, o hospedeiro e o meio ambiente, e assim ter a manutenção da saúde, a ação de equipe multidisciplinar, incluindo o médico veterinário, para que se consiga a implementação de medidas de prevenção de doenças.

Os dejetos animais, em especial o bovino, podem conter inúmeros micro-organismos responsáveis por diversas zoonoses, como *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* e *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia*. Portanto, o conhecimento sobre a sobrevivência desses micro-organismos nos dejetos e formas de inativação são aspectos relevantes a serem conhecidos.

No aspecto de saúde humana é destacada a importância das *E. coli* shigatoxigenicas, visto que os bovinos são reservatórios naturais desses micro-organismos e os eliminam por meio de suas fezes. Este agente zoonótico, com alta viabilidade, uma vez depositado no ambiente, é de difícil controle, portanto, estratégias eficazes para limitar a sua propagação, incluindo o controle do reservatório bovino e práticas adequadas de gestão de efluentes agrícolas devem ser rigorosamente avaliadas.

O aumento de casos de doenças veiculadas por vegetais produzidos em terrenos adubados com esterco bovino, chama a atenção para se buscar solução para prevenção dessas enfermidades. Sendo assim, a melhor compreensão dos fatores que contribuem à sobrevivência desses micro-organismos a longo prazo no ambiente é uma questão importante que deve ser abordada, a fim de reduzir o impacto dos reservatórios ambientais como vias de transmissão da infecção.

Sob aspecto de saúde animal, vale ressaltar a importância do controle dos nematódeos, de forma a minimizar a continuidade do seu ciclo biológico. Esses são os

principais parasitas gastrointestinais dos bovinos, capazes pela via fecal-oral possibilitar a manutenção da doença no rebanho.

Do ponto de vista de saúde ambiental, os dejetos animais podem estar relacionados com diminuição do oxigênio dissolvido na água, a eutrofização do corpo de água com aumento na população de algas, inclusive algas tóxicas e ainda a emissão de gases de efeito estufa, como o metano.

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram a ação positiva processo de codigestão anaeróbia, em especial com adição do caldo de cana-de-açúcar. Esse tipo de tratamento demonstrou a possibilidade de prevenção das enfermidades de rota fecal-oral, com a redução significativa de micro-organismos enteropatogênicos e ovos de helmintos e, ainda, a possibilidade da conversão dos gases de efeito estufa em biogás.

Além de todos os benefícios à saúde proporcionado pelo tratamento de dejetos, a utilização de biodigestores ainda possibilita ao produtor rural os benefícios da utilização do biogás para suprir as necessidades da produção animal e da propriedade e da utilização do biofertilizante, aflente tratado, na forma de adubação que permite, além da melhora a qualidade do solo, a economia com adubos minerais. Depreende-se, portanto que o processo de biodigestão anaeróbia é instrumento importante para se utilizar como um dos promotores à saúde única.