



UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, NATURAIS E TECNOLOGIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

MARIANA DE OLIVEIRA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E  
MOLECULAR DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE BIOFERTILIZANTES  
LÍQUIDOS DE DEJETOS SUÍNOS**

Ribeirão Preto  
2023

MARIANA DE OLIVEIRA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E  
MOLECULAR DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE BIOFERTILIZANTES  
LÍQUIDOS DE DEJETOS SUÍNOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP, como requisito de avaliação para a obtenção do título de Doutora em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. André Pitondo da Silva.

RIBEIRÃO PRETO  
2023

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico da Biblioteca Central da  
UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto –

S586i SILVA, Mariana de Oliveira, 1994-  
Identificação e caracterização fenotípica e molecular de bactérias isoladas de  
biofertilizantes líquidos de dejetos suínos/ Mariana de Oliveira Silva. – Ribeirão  
Preto, 2023.

105 f.: il. color.

Orientador: Prof.º Dr.º André Pitondo da Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Doutorado  
em Tecnologia Ambiental, 2023.

1. Enterobacteriaceae. 2. Enterococcus. 3. Patogenicidade. 4. Suínos - dejetos.  
II. Título.

CDD 589.90

**MARIANA DE OLIVEIRA SILVA**

**“IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR  
DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE BIOFERTILIZANTES LÍQUIDOS DE  
DEJETOS SUÍNOS”**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental do Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnologias da Universidade de Ribeirão Preto, para a obtenção do título de Doutora em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. André Pitondo da Silva

Área de concentração: Tecnologia Ambiental

Data de defesa: 31 de agosto de 2023

Resultado: **APROVADA**

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
 **ANDRÉ PITONDO DA SILVA**  
Data: 01/09/2023 11:10:11-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. André Pitondo da Silva  
Presidente/UNAERP

Documento assinado digitalmente  
 **VALDIR SCHALCH**  
Data: 08/09/2023 15:23:42-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Valdir Schalch  
USP

Documento assinado digitalmente  
 **GUSTAVO ALMEIDA FRATA**  
Data: 05/09/2023 18:10:39-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Gustavo Almeida Frata  
UNAERP

Documento assinado digitalmente  
 **GERSON NAKAZATO**  
Data: 01/09/2023 15:51:21-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Gerson Nakazato  
UEL

Documento assinado digitalmente  
 **RICARDO BORTOLETTO SANTOS**  
Data: 05/09/2023 10:50:45-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ricardo Bortoletto Santos  
UNAERP

**Ribeirão Preto  
2023**

## DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese ao meu falecido irmão, **Samuel de Oliveira Silva**, vítima da pandemia de Sars-CoV-2 (Covid19), que não pôde acompanhar a finalização do meu estudo, mas que sempre, ao longo do meu caminho escolar e de formação, me incentivou e apoiou com suas brincadeiras, seu grande coração, abraço e sorriso. Você está sempre presente em meus pensamentos e no meu coração. Amo você, Samuca.

Dedico também a todos profissionais de pesquisa, saúde e saneamento, que foram e são cruciais para desenvolvimento da ciência e saúde, e sua manutenção. No momento em que se mostraram imprescindíveis, não nos desapontaram e, graças a eles, somos capazes de retomar as atividades diárias com menores riscos à nossa saúde. Minha gratidão a todos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao meu orientador **Prof. Dr. André Pitondo da Silva**, que durante esses anos de convivência e orientação, esteve me apoiando de todas as maneiras possíveis, acreditando no meu potencial, quando, às vezes, nem eu mesma o fiz. Ele nos mostrou seu amor à pesquisa e seriedade para com ela, buscando sempre cultivar um ambiente harmonioso e pacífico no laboratório, para que pudéssemos nos desenvolver ao máximo como pesquisadores e também como pessoas. Eu o considero meu pai na Ciência. Muito obrigada por todas as orientações, auxílios, conselhos e histórias da sua caminhada, divididos durante as confraternizações e no cotidiano do laboratório, sem seu apoio e orientação, com certeza, não estaria mais no que mais amo fazer. MUITÍSSIMO obrigada.

Aos meus pais, **Jane de Oliveira Silva e Benedito Graciano da Silva**, por todo amor e carinho. Eu tenho muito orgulho em ser filha de vocês que, em suas vivências, entenderam o quão importante o estudo e a formação são para a vida. Vocês sempre nos mostraram que nada se perde em estudar, pelo contrário, o conhecimento nunca nos é tirado, como sempre dizem. Obrigada por, ao longo da minha criação, vida escolar e acadêmica, buscarem fazer o que estava ao seu alcance para que eu pudesse seguir meus sonhos, por sempre me incentivarem a estudar, por entenderem minha ausência como filha em muitas confraternizações familiares. Mais uma vez, minha gratidão por todo amor, carinho que dedicaram em minha criação e por sempre acreditarem no meu potencial. Amo vocês.

Aos meus irmãos, **Rogério de Oliveira Silva, Marina de Oliveira Silva Nascimento, Samuel de Oliveira Silva, Eduardo de Oliveira Silva e Janice Aparecida Silva**, os quais tanto amo e admiro, e que dividiram brincadeiras da infância, descobertas da adolescência e agora dividem a vida adulta comigo. Obrigada pelo grande companheirismo, amor e cuidado que temos um com outro, os quais, em muitos momentos, foram essenciais para eu não desistisse dos meus objetivos. Que continuemos nos incentivando e apoiando sempre. Amo vocês.

Aos meus amigos de longa caminhada, **Bruna Vieira, Raquel Correa, Bruno Guerra, Thalyson Resende, Nádia Mandello, Miguel Negrão, Josiane Gomes, Rafael Goulart, Miguel Augusto, Isadora Cunha e Maria Julia Prado**, obrigada por todos os momentos juntos, sendo eles regados a cerveja ou café, diálogos alegres ou lágrimas, nos quais, me senti aceita, acolhida e recarregada para as várias circunstâncias da vida adulta. Foram esses

momentos que me distraíram para que fosse possível descansar e continuar seguindo. Obrigada, amigos.

Ao meu namorado, **Renato Feliciano Lino**, por sempre ser tão amoroso, atencioso, acolhedor, cuidadoso, incentivador e companheiro, obrigada por todos os afetos, por me receber na sua vida e me deixar fazer parte dela. Obrigada por me auxiliar inúmeras vezes com correções de inglês, por salvar meus dados e meu notebook, que foram essenciais para finalização deste trabalho. Obrigada por me proporcionar momentos de risadas, diversão, amor, amizade e descanso das adversidades da vida. Você é meu porto seguro. Amo você.

Aos meus amigos do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, **Rafael da Silva Goulart, Miguel Augusto de Moraes, Rafael Nakamura da Silva** e demais colegas que passaram pelo Labac, que fazem meus dias divertidos, musicais e cheio de trocas incríveis. Obrigada por toda amizade, apoio, risadas durante os cafezinhos e parceria nos experimentos. Que possamos estar sempre juntos.

Às técnicas dos laboratórios de práticas do Bloco J, **Claudineia Araújo, Tassiana Trevisan e Divaneide Dantas**, que nos acolheram desde o início, sendo prestativas a todo momento, nos auxiliando na resolução dos vários problemas que surgiam no cotidiano de experimentos, e, sempre que possível, me oferecendo um cafezinho e uma conversa de coração. Obrigada pelo carinho e cuidado comigo.

Ao **Henri Berghs**, CEO na Fairport Ltda e representante da *Applied Math*, que possibilitou meu acesso ao *software Bionumerics*, que sempre foi solícito e gentil, e que fez o possível para que minhas análises fossem realizadas. Muito obrigada.

Às granjas de suínos, Fazendas A e B, que forneceram as amostras de biofertilizantes estudadas no desenvolvimento deste estudo, nos permitindo fazer coletas, colaborando e apoiando a pesquisa e a ciência da região.

Ao professor **Rodrigo Yudi Fujimoto**, pesquisador na EMBRAPA- Tabuleiros SE, e ao Técnicos **Ricardo Coelho e Kenia Moura** que realizaram as identificações dos isolados por MALDI-TOF em seu laboratório.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP que financiou os equipamentos do laboratório, nos quais os experimentos deste estudo foram realizados.

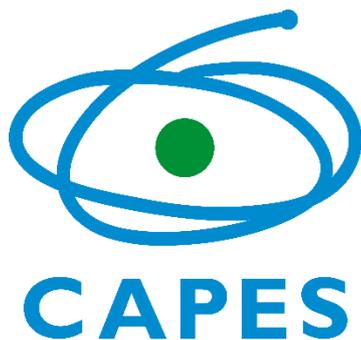
À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) que financiou minha bolsa de estudo PROSUP, com a qual mantive meus gastos particulares e pude me dedicar integralmente aos meus estudos e pesquisas.

Ao prof. Dr. **Murilo Daniel de Melo Innocentini**, coordenador do programa de pós-graduação em Tecnologia Ambiental, por ser presente e acessível, por ouvir os discentes, e sempre tentar fazer o melhor para o programa, e pelas excelentes aulas que tive oportunidade de assistir durante meu período de disciplinas, elas me agregaram muito como aluna, mas principalmente como microbiologista.

À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Luciana Rezende Alves de Oliveira**, ex-coordenadora do programa de pós-graduação em Tecnologia Ambiental, por ter sido sempre solícita e presente, por todo apoio, pela disponibilidade em resolver situações problemáticas durante meu percurso na pós-graduação, e por nos auxiliar durante sua coordenação em tudo que lhe foi possível.

À Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP, na pessoa de sua Magnífica Reitora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Suzelei de Castro França, que me proporcionou estrutura e suporte financeiro para desenvolvimento do meu estudo, contato com uma pluralidade de alunos-colegas de diferentes áreas durante as aulas do programa de pós-graduação em Tecnologia Ambiental, enriquecendo a minha vivência e, também aos professores do programa que são de excelência e tornaram ainda mais interessantes os conhecimentos compartilhados.

Obrigada a todos



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (LABAC) da Universidade de Ribeirão Preto, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio da concessão de bolsa de estudo para doutorado (processo no 88887.601821/2021 e Código Financeiro 00) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. Nº 2013/22581-5).

*“Tudo o que temos que decidir,  
é o que fazer com o tempo que nos é dado”*

**J. J. Tolkien**

## RESUMO

O uso de antimicrobianos na pecuária é indispensável para a melhoria da qualidade das culturas animais, uma vez que são empregados na profilaxia, tratamento e promoção do crescimento animal. No entanto, esse uso contínuo tem contribuído para o surgimento de bactérias multirresistentes a antimicrobianos. Desse modo, neste estudo, visou-se isolar, identificar e caracterizar o perfil de resistência aos antimicrobianos e potencial patogênico de bactérias encontradas em biofertilizantes líquidos, provenientes de sistemas de biodigestão anaeróbios, alimentados por dejetos de suínos, por meio de técnicas fenotípicas e moleculares. As 125 bactérias identificadas, foram isoladas das amostras de biofertilizantes por *spread plate*, e identificadas por *Matrix-Assistant Laser Desorption Ionization Time-of-Flight* (MALDI-TOF), e submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, conforme as recomendações do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) e do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), enquanto os genes de resistência e virulência foram pesquisados por *Polimerase Chain Reaction* (PCR). A similaridade genética entre os isolados de *Escherichia coli* foi investigada por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR* (ERIC-PCR). Foram identificadas duas grandes famílias bacterianas, *Enterobacteriaceae* (n=31) dos quais 90% eram *Escherichia coli* e nas *Enterococcaceae* (n=66) 44% eram *Enterococcus hirae*, sendo que 100% os isolados bacterianos (n=95) foram classificados como multirresistentes (MDR), além disso 15% dos *Enterococcus* foram resistentes à vancomicina (ERV). A técnica de ERIC-PCR demonstrou uma heterogeneidade na diversidade genética entre os isolados de *E. coli*, apresentando, de forma geral, 47% de similaridade genética entre si. Nas *Enterobacteriaceae* foi detectado o gene *ecpA* em mais 83% dos isolados e outros doze genes de virulência foram encontrados, enquanto nos *Enterococcus* foram encontrados 8 genes de virulência *ace*, *efa*, *esp*, *gls-like-24*, *psaA*, *cbh*, *gelE*, *cpsEnd/cpsG*. Com este estudo, foi possível traçar um perfil fenotípico, molecular dos isolados bacterianos, mostrando a presença de cepas multirresistentes a antimicrobianos, após a biodigestão anaeróbia. Isso sugere que o uso intensivo de antimicrobianos na produção animal pode contribuir para surgimento de bactérias multirresistentes que podem estar sendo dispersas no ambiente por intermédio dos biofertilizantes produzidos com dejetos suínos. Portanto, procedimentos de vigilância e busca de dados, como este, são importantes formas de contribuir para um melhor entendimento da disseminação de bactérias sobreviventes a processos de biodigestão, possibilitando traçar estratégias de prevenção e mitigação de potenciais patógenos resistentes aos antimicrobianos, que são dos maiores desafios para a saúde pública mundial.

**Palavras-chave:** *Enterobacteriaceae*. *Enterococcus*. Multirresistência. Patogenicidade. Biofertilizantes líquidos. Dejetos suínos.

## ABSTRACT

The use of antimicrobials in livestock farming is essential for improving the quality of animal crops, as they are used in prophylaxis, treatment, and promotion of animal growth. However, this continuous use has contributed to the emergence of multidrug-resistant bacteria. Therefore, in this study, the aim was to isolate, identify and characterize the antimicrobial resistance profile and pathogenic potential of bacteria found in liquid biofertilizers, coming from anaerobic biodigestion systems, fed by swine waste, using phenotypic and molecular techniques. The 125 identified bacteria were isolated from biofertilizer samples by spread plate and identified by Matrix-Assistant Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF), and subjected to antimicrobial susceptibility testing, according to the recommendations of Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), while resistance and virulence genes were investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR). The genetic similarity between *Escherichia coli* isolates was investigated by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR). Two large bacterial families were identified, *Enterobacteriaceae* (n=31) of which 90% were *Escherichia coli* and in the *Enterococcaceae* (n=66) 44% were *Enterococcus hirae*, with 100% of the bacterial isolates (n=95) being classified as multi-resistant. (MDR), in addition 15% of *Enterococcus* were resistant to vancomycin (ERV). The ERIC-PCR technique demonstrated heterogeneity in genetic diversity among *E. coli* isolates, showing, in general, 47% genetic similarity between them. In *Enterobacteriaceae*, the *ecpA* gene was detected in over 83% of the isolates and another twelve virulence genes were found, while in *Enterococcus* 8 virulence genes were found *ace*, *efa*, *esp*, *gls-like-24*, *psaA*, *cbh*, *gelE*, *cpsEnd* /*cpsG*. With this study, it was possible to draw a phenotypic and molecular profile of the bacterial isolates, showing the presence of multiresistant strains to antimicrobials, after anaerobic biodigestion. This suggests that the intensive use of antimicrobials in animal production may contribute to the emergence of multi-resistant bacteria that may be dispersed in the environment through biofertilizers produced with swine waste. Therefore, surveillance and data search procedures, such as this one, are important ways of contributing to a better understanding of the dissemination of bacteria surviving biodigestion processes, making it possible to outline prevention and mitigation strategies for potential pathogens resistant to antimicrobials, which are one of the largest challenges for global public health.

**Keywords:** *Enterobacteriaceae*. *Enterococcus*. Multiresistance. Pathogenicity. Liquid biofertilizers. Pig waste.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 Modelo de Biodigestor Chinês (A) e modelo de biodigestor indiano (B) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 29 |
| Figura 2 Esquema representativo interno do Modelo de Biodigestor de Lagoa Coberta Canadense....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 30 |
| Figura 3 Esquema de funcionamento de um biodigestor tipo UASB .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 30 |
| Figura 4 Biodigestor em fase sólida e em batelada, com recirculação de inóculo .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 31 |
| Figura 5 Esquema de digestão anaeróbia de matéria orgânica.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 33 |
| Figura 6 Relação dos produtos de várias fermentações microbianas x microrganismos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 37 |
| Figura 7 Mecanismos de resistências aos antimicrobianos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 44 |
| Figura 8 Fluxograma 1 metodologia geral da estudo, na qual aponta as etapas realizadas conforme com os resultados eram obtidos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 49 |
| Figura 9 Biodigestores- BLC de Fluxo contínuos tubulares-Modelo Canadense das Granja A <sub>1</sub> , Granja B <sub>1</sub> e lagoas de estabilização Granja A <sub>2</sub> , Granja B <sub>2</sub> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 50 |
| Figura 10 Ilustração do sistema de biodigestão das granjas indicando o ponto do sistema, o qual foi realizada a coleta. Esse sistema de biodigestão contém: Instalação dos suínos, reservatório dos dejetos animais, Biodigestor e a Lagoa de estabilização. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 51 |
| Figura 11 Coletas de Biofertilizantes Granja A: A <sub>1</sub> : lavagem do recipiente coleta com biofertilizante, A <sub>2</sub> : coleta de três amostras de 50 mL de biofertilizante a cada 5 minutos e A <sub>3</sub> : mistura do <i>pool</i> , armazenamento em recipiente esterilizado com e sem meios de cultura. Granja B: B <sub>1</sub> : lavagem do recipiente coleta com biofertilizante, B <sub>2</sub> : coleta de três amostras de 50 mL de biofertilizante a cada 5 minutos B <sub>3</sub> : armazenamento em recipiente esterilizado com e sem meios de cultura ..... | 52 |
| Figura 12 Isolamento de bactérias por diluição seriada e <i>spread plate</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 53 |
| Figura 13 Crescimento de culturas puras em Agar MH (A), Tioglicolato (B), EMB (C) e McConkey (D) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 54 |
| Figura 14 Frasco com BHI, acrescido de 15% Glicerol, Criotubos para estocar os isolados e caixa de armazenamento .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 54 |
| Figura 15 Extração de DNA genômico pelo método Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 55 |
| Figura 16 Fluxograma 2 Caracterização da resistência antimicrobianos e perfil de patogenicidade....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 56 |
| Figura 17 Frequência de não-susceptibilidade encontrada nos 31 isolados pertencentes à família <i>Enterobacteriaceae</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 65 |
| Figura 18 Rota de disseminação de antimicrobianos e microbiota multirresistente .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 66 |
| Figura 19 <i>Heatmap</i> do perfil de Resistência aos antimicrobianos de Enterobactérias.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 67 |
| Figura 20 Dendrograma de similaridade genética gerado com dados de ERIC-PCR dos 28 isolados de <i>Escherichia coli</i> de biofertilizante construído pelo Bionumerics 7.5 ( <i>Applied Math</i> ), usando método UPGMA e coeficientes de similaridade DICE com 1% de tolerância para as bandas. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 73 |
| Figura 21 Percentual das diferentes espécies de <i>Enterococcus</i> encontradas entre os 66 isolados .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 75 |
| Figura 22 Frequência de não-susceptibilidade aos antimicrobianos dos 29 isolados pertencentes ao grupo <i>Enterococcus</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 76 |
| Figura 23. <i>Heatmap</i> de Resistência aos antimicrobianos de <i>Enterococci</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 77 |
| Figura 24. Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Vancomicina em placa de 96 poços em isolados de <i>Enterococcus</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 78 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 Patógenos de importância para saúde pública desativados na Biodigestão.....                                         | 36 |
| Tabela 2 Genes codificadores de $\beta$ -lactamases pesquisados.....                                                         | 57 |
| Tabela 3 <i>Primers</i> utilizados no presente estudo para investigação de genes de virulência por PCR....                   | 58 |
| Tabela 3 <i>Primers</i> utilizados no presente estudo para investigação de genes de virulência por PCR....                   | 59 |
| Tabela 4 Genes pesquisados e sequência de iniciadores para patotigem de <i>E.coli</i> .....                                  | 60 |
| Tabela 5 Genes de virulência de <i>Enterococcus</i> pesquisados, primers e tamanho dos produtos de PCR<br>amplificados. .... | 60 |
| Tabela 5 Genes de virulência de <i>Enterococcus</i> pesquisados, primers e tamanho dos produtos de PCR<br>amplificados. .... | 61 |
| Tabela 6 Espécies identificadas por MALDI-TOF .....                                                                          | 64 |

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1 Legislação ambiental federal incidente na suinocultura .....              | 24 |
| Quadro 1 Legislação ambiental federal incidente na suinocultura (continuação)..... | 25 |
| Quadro 2 Pontos importantes para escolha do sistema de biodigestão .....           | 28 |
| Quadro 3 Normas de uso de antimicrobianos na pecuária brasileiras.....             | 46 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |                                                                   |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------|
| AAEC            | Enteroaderente                                                    |
| AMC             | Amoxicilina+Clavulanato                                           |
| AMI             | amicacina                                                         |
| AMP             | Ampicilina                                                        |
| APEC            | <i>Escherichia coli</i> Patogênica Aviária                        |
| APS             | Ampicilina+Sulbactam                                              |
| ATM             | Aztreonam                                                         |
| BHI             | <i>Brain Heart Infusion</i>                                       |
| BLC             | Biodigestor De Lagoa Coberta                                      |
| CAZ             | Ceftazidima                                                       |
| CC              | Ciclo Completo                                                    |
| CETESB          | Companhia Ambiental do Estado de São Paulo                        |
| CFC             | Cefaclor                                                          |
| CFL             | Cefalotina                                                        |
| CFM             | Cefixima                                                          |
| CFO             | Cefoxitina                                                        |
| CFZ             | Cefazolina                                                        |
| CGP/C+          | Catalase positiva                                                 |
| CH <sub>4</sub> | Metano                                                            |
| CIP             | Ciprofloxacina                                                    |
| CLO             | Cloranfenicol                                                     |
| CLSI            | <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>                    |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de Carbono                                                |
| CPM             | Cefepima                                                          |
| CRO             | Ceftriaxona                                                       |
| CRX             | Cefuroxima                                                        |
| CSTR            | <i>Continuous Stirred Tank Reactor</i>                            |
| CTL             | Ceftarolina                                                       |
| DAEC            | <i>E. coli</i> de aderência difusa                                |
| DBO             | Demanda Bioquímica de Oxigênio                                    |
| DOX             | Doxiciclina                                                       |
| DQO             | Demanda Química de Oxigênio                                       |
| <i>ecpA</i>     | <i>E coli. common pillus</i>                                      |
| EHEC            | <i>E. coli</i> Enterohemorrágica                                  |
| EIEC            | <i>E. coli</i> Enteroinvasiva                                     |
| EMB             | <i>Eosin Methylene Blue Agar</i>                                  |
| EPEC            | <i>E. coli</i> Enteropatogênica                                   |
| ERI             | Eritromicina                                                      |
| ERIC            | <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>            |
| ERIC-PCR        | <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR</i>        |
| ERT             | Ertapenem                                                         |
| ERV             | <i>Enterococcus</i> Resistentes à Vancomicina                     |
| ESBL            | β-lactamases de Espectro Estendido                                |
| EST             | Estreptomicina                                                    |
| ETEC            | <i>E. coli</i> Enterotoxigênica                                   |
| EUCAST          | <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> |
| ExPEC           | <i>Extra- intestinal pathogenic E. coli</i>                       |
| FAO             | <i>Food and Agriculture Organisation</i>                          |

|                               |                                                                                     |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| FOS                           | Fosfomicina                                                                         |
| GEN                           | Gentamicina                                                                         |
| GRA                           | Genes de Resistência Antimicrobianos                                                |
| H <sub>2</sub>                | Hidrogênio Molecular                                                                |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido De Oxigênio                                                                |
| HRMS                          | <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>                                            |
| IBGE                          | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística                                     |
| IMP                           | Imipenem                                                                            |
| InPEC                         | <i>E.coli</i> patogênicas intrainestinais                                           |
| IPEA                          | Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada                                            |
| IRAS                          | Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde                                        |
| LEV                           | Levofloxacina                                                                       |
| LMX                           | Lomefloxacina                                                                       |
| LNZ                           | Linezolida                                                                          |
| LPS                           | Lipopolissacarídeos                                                                 |
| MALDI-TOF                     | <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight</i>                   |
| MALDI-TOF-MS                  | <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i> |
| MAN                           | Ágar Hipertônico Manitol                                                            |
| MAPA                          | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento                                 |
| MC                            | Ágar Maconkey                                                                       |
| MDR                           | Multirresistentes                                                                   |
| MH                            | Muller Hinton                                                                       |
| MIN                           | Minociclina                                                                         |
| MPM                           | Meropenem                                                                           |
| NAL                           | Ácido Nalidíxico                                                                    |
| NIT                           | Nitrofurantoina                                                                     |
| NMEC                          | <i>E. coli</i> Associadas a meningites neonatal                                     |
| NOR                           | Norfloxacina                                                                        |
| NT                            | Nitrogênio Total                                                                    |
| NTEC                          | <i>E. coli</i> Necrotoxigênica                                                      |
| OFX                           | Ofloxacina                                                                          |
| OIE                           | <i>World Organisation for Animal Health</i>                                         |
| OMS                           | Organização mundial de saúde                                                        |
| PCR                           | <i>Polimerase chain reaction</i>                                                    |
| PEN                           | Penicilina                                                                          |
| PFGE                          | <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>                                             |
| PIB                           | Produto Interno Bruto                                                               |
| PIT                           | Piperacilina+Tazobactam                                                             |
| PMQR                          | Quinolona mediada por plasmídeo                                                     |
| PPM                           | Produção de Pecuária Municipal                                                      |
| REP                           | Repetitivas Extragênicas palindrômicas                                              |
| RIF                           | Rifampicina                                                                         |
| RO                            | Resíduos Orgânicos                                                                  |
| RV                            | Resistentes a Vancomicina                                                           |
| ST                            | Sólidos Totais                                                                      |
| Stx/VTEC                      | <i>E. coli</i> Shiga/Verotoxigênica                                                 |
| SUL                           | Sulfonamida                                                                         |
| SUT                           | Sulfametazol+Trimetoprim                                                            |
| SV                            | Sólidos Voláteis                                                                    |
| TAC                           | Ticarcilina+Clavulanato                                                             |

|       |                                                                                                 |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TEC   | Teicoplanina                                                                                    |
| TET   | Tetraciclina                                                                                    |
| TGG   | Tigeciclina                                                                                     |
| TIO   | Ágar tioglicolato                                                                               |
| TOB   | Tobramicina                                                                                     |
| TRI   | Trimetoprim                                                                                     |
| UASB  | Reator Anaeróbio de fluxo ascendente (do <i>inglês</i> <i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> ) |
| UFC   | Unidades Formadoras de Colônia                                                                  |
| UPD   | Unidade de Produção de Desmamados                                                               |
| UPEC  | <i>E. coli</i> Uropatogênica                                                                    |
| UPL   | Unidade Produtora de Leite                                                                      |
| USAID | Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional                                 |
| UT    | Unidade De Terminação                                                                           |
| VAN   | Vancomicina                                                                                     |

## SUMÁRIO

|                                                                      |            |
|----------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                           | <b>17</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....                                            | <b>20</b>  |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....                                             | 20         |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                      | 20         |
| <b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....                                | <b>21</b>  |
| 3.1 SUINOCULTURA .....                                               | 21         |
| 3.2 RESÍDUOS SÓLIDOS E SEMISSÓLIDOS .....                            | 22         |
| 3.3 NORMATIVAS DE TRATAMENTO DE RESÍDUOS SUINÍCOLAS .....            | 23         |
| 3.3 ECONOMIA CIRCULAR E A AGROPECUÁRIA .....                         | 25         |
| 3.4 BIODIGESTORES .....                                              | 27         |
| 3.4 PROCESSO DA BIODIGESTÃO .....                                    | 32         |
| 3.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A BIODIGESTÃO .....                      | 33         |
| 3.6 EFLUENTES: BIOGÁS E O BIOFERTILIZANTE .....                      | 34         |
| 3.6.1 Biogás .....                                                   | 34         |
| 3.6.2 Biofertilizante .....                                          | 35         |
| 3.7 MICRORGANISMOS NO BIOFERTILIZANTE .....                          | 36         |
| 3.8 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO E TIPAGEM MOLECULAR BACTERIANA .....    | 37         |
| 3.9 PATÓGENOS OPORTUNISTAS .....                                     | 39         |
| 3.10 PATOGENICIDADE E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS .....          | 42         |
| 3.11 USO DE ANTIMICROBIANOS NA PECUÁRIA .....                        | 44         |
| 3.12 <i>ONE HEALTH</i> NA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS .....      | 47         |
| 4.1 BIODIGESTORES .....                                              | 49         |
| 4.2 COLETA DOS BIOFERTILIZANTES LÍQUIDOS .....                       | 50         |
| 4.3 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS .....                                   | 52         |
| 4.4 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA .....                                   | 54         |
| 4.4.1 Extração do DNA Genômico .....                                 | 54         |
| 4.4.2 Identificação dos isolados bacterianos .....                   | 55         |
| 4.5.1 Avaliação perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos ..... | 56         |
| 4.5.2 Pesquisa de genes de resistência .....                         | 56         |
| 4.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PATOGÊNICO .....                          | 57         |
| 4.7 SEQUENCIAMENTO DE MATERIAL GENÉTICOS .....                       | 61         |
| 4.8 TIPAGEM MOLECULAR .....                                          | 61         |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                               | <b>63</b>  |
| 5.1 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA .....                                   | 63         |
| 5.2 ENTEROBACTÉRIAS .....                                            | 64         |
| 5.3 <i>ENTEROCOCCI</i> .....                                         | 74         |
| <b>6. CONCLUSÕES</b> .....                                           | <b>84</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                             | <b>85</b>  |
| <b>APENDICE 1</b> .....                                              | <b>100</b> |
| <b>APÊNDICE 2</b> .....                                              | <b>101</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

O avanço da humanidade sempre foi ligado à relação entre o homem e os animais, iniciada há cerca de 12 mil anos, quando o homem aprendeu a domesticá-los. Essa relação vai desde fontes de alimentação e trabalho, até transporte e companhia. A produção animal é um dos setores mais importantes da economia global e passou por um grande desenvolvimento nas últimas décadas, sendo o Brasil o quarto maior produtor de carne suína mundial (EMPRAPA, 2020).

O Brasil está entre os maiores pecuaristas mundiais, sendo esse setor responsável por 25% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional e de grande importância para estruturação da economia brasileira (Cepea/CNA, 2022). No entanto, a robustez desses números demanda também o desenvolvimento de sistemas efetivos de tratamento dos dejetos animais. Na pecuária brasileira, segundo relatório do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012), por ano, são gerados 1.703.773.970 t de dejetos orgânicos, sendo que 20.379.732 t são de dejetos suínos, provindos de culturas de sistemas de confinamento.

Produz-se, no Brasil anualmente, 365.315.261 t/ano de dejetos tratáveis em sistemas de biodigestão. Os dejetos são responsáveis por uma grande fonte de poluição ambiental, sendo a agroindústria uma atividade que depende diretamente de recursos ambientais e do equilíbrio do meio ambiente. Portanto, são necessárias formas de tratamento para que os resíduos sólidos e semissólidos não desestabilizem o meio ambiente, ocasionando também prejuízos para o próprio setor. Neste sentido, os investimentos em agropecuária sustentável tornaram-se imprescindíveis para a manutenção do equilíbrio socioambiental (IPEA, 2012).

Os dejetos da suinocultura são semissólidos e possuem alta taxa orgânica, são compostos por matéria orgânica rica em macro e micronutrientes, em bactérias e outros microrganismos que auxiliam na degradação da biomassa, quando realizado tratamento por biodigestão. Por outro lado, essas bactérias também podem ser agentes patogênicos, uma vez que, após o ciclo biológico da biodigestão, o subproduto dessa biomassa é, muitas vezes, utilizado como fertilizante, disseminando os microrganismos sobreviventes em diversos ambientes e os contaminando (VITAL *et al.*, 2018).

Devido à sua composição, os dejetos animais são caracterizados como poluentes preocupantes pois, ao serem manejados incorretamente, contaminam solos, corpos de água, exalam mau cheiro, atraem insetos que podem ser vetores de doenças, além de intoxicarem as

pessoas e os próprios animais, trazendo, conseqüentemente, além de riscos à saúde humana, prejuízos ambientais e econômicos para os produtores (MESSA *et al.*, 2016).

Visando amenizar os impactos desses dejetos e aumentar a longevidade e qualidade das culturas e das criações e contribuir para uma produção animal sustentável, os agropecuaristas têm optado por um sistema de digestão anaeróbia, utilizando-se biodigestores. Nesse sistema, deposita-se os dejetos sólidos ou semissólidos dos animais manejados na propriedade, sob temperatura, pH e nível de oxigenação controlados. As bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas, que são provenientes do próprio dejetos, fazem a digestão da biomassa, e os subprodutos gerados pela biodigestão são o biogás e o biofertilizante, que são utilizados como fonte alternativa de energia e fertilizante do solo, gerando energia sustentável e aumentando o tempo de vida fértil do solo, respectivamente (VITAL *et al.*, 2018).

Além da importância indiscutível da qualidade das culturas animais e redução da disposição ambientalmente incorreta dos dejetos animais, é cada vez mais imprescindível uma vigilância dos microrganismos que permeiam a microbiota ambiental, plantas, animal e humana, visto que as zoonoses são as principais causas de doenças humanas. Segundo o relatório da Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional (USAID, 2009), 75 % das doenças emergentes no último século estão relacionadas a zoonoses, devido à alta quantidade e aglomeração de animais em confinamento, propiciando um ambiente para o desenvolvimento de microrganismos.

As zoonoses ocasionam prejuízo para o próprio setor como: queda de produtividade, perdas de oportunidades comerciais devido ao status sanitário e, conseqüentemente, elevam os índices de desemprego (VALLAT; WILSON, 2003; BERNSTEIN; DUTKIEWICZ, 2021). Recentemente, o mundo viveu a pandemia de COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2. A pandemia trouxe, mais uma vez, o olhar para a Saúde Única (*One Health*), termo que significa a integração da saúde humana, animal e ambiental, alertando a todos, da forma mais drástica, como a forma de produção animal e não sustentável está contribuindo para o surgimento e disseminação de novas doenças (BERNSTEIN; DUTKIEWICZ, 2021).

Juntamente com a preocupação global de disseminação de novas doenças, há também a problemática do aumento exorbitante da resistência bacteriana aos antimicrobianos, os principais fármacos responsáveis pelo combate às bactérias e que, frequentemente, são administrados de forma profilática visando ao bem-estar animal. Entretanto, devido ao uso errôneo e indiscriminado desse medicamento, tem havido um aumento da resistência bacteriana,

a qual, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), até 2050, será a principal causa de mortes no mundo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Neste estudo, visou-se isolar, identificar e caracterizar, fenotípica e molecular, por meio de técnicas fenotípicas e moleculares, bactérias encontradas nos biofertilizantes, provenientes de sistemas de biodigestão anaeróbio, alimentados por dejetos suínos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar as bactérias presentes em biofertilizantes originados de biodigestores, alimentados com dejetos suínos;
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados identificados;
- Pesquisar genes de resistência aos antimicrobianos;
- Detectar a presença de genes de virulência nos isolados bacterianos;
- Investigar as similaridades genéticas dos isolados pela técnica de *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polimerase Chain Reaction* (ERIC-PCR).

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 SUINOCULTURA

No Brasil, a história da suinocultura foi iniciada juntamente com a colonização. Os suínos chegaram por volta de 1532, mas foi somente com a vinda de imigrantes europeus, no final do século XVIII, que se tornou uma atividade econômica, sendo a banha o principal produto, utilizada na culinária e na conservação de alimentos. No entanto, com a revolução na alimentação, aumentando o consumo de grãos, a pressão por carne mais saudável chegou também aos suínos. Iniciou-se, então, uma revolução da indústria suína com melhoramento nas instalações físicas, no manejo dos animais e nas tecnologias das granjas, além do melhoramento genético das matrizes, atenção ao bem-estar animal e investimentos em políticas agrícolas, visando à produção de animais que correspondessem às demandas por carne de qualidade (, MIELLE *et al.*, 2011; GUIMARÃES *et al.*, 2017).

A suinocultura é o setor que mais cresceu nos últimos anos na agropecuária brasileira. Segundo o relatório de Produção de Pecuária Municipal (PPM, 2021), em 2020, foram contabilizados 41,1 milhões de suínos, obtendo um acréscimo de 1,4% com relação ao ano anterior. Naquele ano, foram exportadas cerca de 901,1 mil toneladas de carnes suínas, sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial e o quarto maior exportador. Na região Sul, estão os maiores produtores, detendo 20,6 milhões de cabeças suínas, sendo responsável por mais de 50% do crescimento nacional e por movimentar R\$ 149,867 bilhões (ABCS, 2016).

A produção de suínos acontece em pequenos e grandes produtores, que praticam principalmente um manejo tecnificado e industrial. Existem vários tipos de granjas: unidade produtora de leitão (UPL), unidade de desmamados (UPD), crechário, unidade de terminação (UT) e ciclo completo (CC). A escolha do tipo de granja depende da infraestrutura da fazenda, disponibilidade de recursos, investimentos e mão-de-obra (FERREIRA *et al.*, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2017).

Apesar das boas práticas de cuidado aos animais, dos investimentos, e lucratividade do setor, a suinocultura desencadeia algumas problemáticas, iniciando pela própria criação extensiva dos suínos, a qual, na lida diária, necessita do uso de diversos antimicrobianos, desde as matrizes até os suínos em fase de abate. Isso porque a qualidade de vida dos animais é vinculada ao controle de suas doenças e, também, à sua engorda que está diretamente relacionada à microbiota presente em seus intestinos (SILVA; NÖRNBERG, 2003; BUDIÑO, 2007; BARKO, 2018). O uso exacerbado de antimicrobianos, ao longo do processo de criação

suína, é um dos responsáveis pelo surgimento de bactérias multirresistentes, dispersão de genes de resistência e contaminação de solos e águas com resíduos antimicrobianos.

Outra grande problemática da suinocultura é o impacto ambiental gerado pelos dejetos dos animais, que se tornam poluentes devido à própria composição dos dejetos com alta carga orgânica. Quando depositada diretamente em solos, essa carga orgânica acaba saturando, além disso, pode ser lixiviada para corpos das águas, afetando a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) disponível, impactando no equilíbrio da vida aquática (CARDOSO, OYAMADA, SILVA; 2015).

Segundo o Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril (IPEA, 2012), são gerados 20.379.732 t/ano em dejetos suínos que, mesmo representando pouco mais de 1,1% dos dejetos tratáveis por biodigestão, se não gerenciados de forma ambientalmente adequada, sendo depositados sem tratamentos diretamente em solos, geram grandes gastos e impactos ambientais. Por também apresentarem formas líquidas, encarecem o processo de transporte, contribuindo para a deposição em locais próximos e saturação dos solos locais.

Assim, os dejetos suínos, além de serem grandes poluentes ambientais, podem também ser fontes de dispersão de bactérias potencialmente patogênicas, genes de resistência e resíduos de antimicrobianos.

### 3.2 RESÍDUOS SÓLIDOS E SEMISSÓLIDOS

Os resíduos sólidos são provindos das atividades da sociedade, e são produzidos em todos os âmbitos: alimentação, educação, indústrias, agricultura, transporte, lazer, etc. Dessa maneira, observa-se que, em todos as áreas, a humanidade consome e produz resíduos. Segundo o Plano Nacional de Resíduo Sólido (BRASIL- PNRS, 2010, n.p.), lei 12305/2010 decreto 10932/2022 capítulo II, artigo 3º- inciso XVI, caracteriza-se como resíduos sólido:

“XVI - resíduos sólidos: material, substância, objeto ou bem descartado resultante de atividades humanas em sociedade, a cuja destinação final se procede, se propõe proceder ou se está obrigado a proceder, nos estados sólido ou semissólido, bem como gases contidos em recipientes e líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou em corpos d'água, ou exijam para isso soluções técnica ou economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível”

Os resíduos sólidos, por sua vez, podem ser caracterizados como sólidos, semissólidos, líquidos e gasosos, e de acordo com NBR 10.004/04 podem ser classificados quanto a periculosidade (ABNT, 2004), facilitando, assim, o tratamento, destinação, e disposição ambientalmente adequada, quando necessário. Os resíduos semissólidos são considerados os lodos de tratamento de água, lodos de estações de tratamento de esgoto, lodos provenientes de corte industrial, lodos de lavadores de gases, graxas (CÓRDOBA, 2014).

Os dejetos suínos são constituídos esterco (fezes), urina, resíduos de ração e de água que, por sua vez, são influenciados por fatores zootécnicos (tamanho, peso, raça), ambientais (temperatura e umidade) e dietéticos (digestibilidade, conteúdo de fibras e vitamina). Esses dejetos possuem características semissólidas, uma vez que são pastosos, mas, devido à adoção de sistemas de confinamento, o manejo desses dejetos se dá na forma líquida, o que agravou os problemas de captação, armazenamento, transporte, tratamento e disposição. Portanto, é necessário o tratamento desses dejetos para diminuir o volume líquido e aumentar a massa seca, para aplicação em solos como adubo (ITO *et al.*, 2016).

### 3.3 NORMATIVAS DE TRATAMENTO DE RESÍDUOS SUINÍCOLAS

As primeiras questões levantadas sobre impactos ambientais e que, posteriormente, foram incorporadas à legislação, ocorreram após a 1ª Conferência Mundial Sobre Meio Ambiente em Estocolmo, na Suécia, em 1972. No Brasil, somente em 1981, foi implementada a Lei 6.938/81 (BRASIL, 1981), que dispôs sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, a qual normatizou sobre a preservação, melhoramento e recuperação da qualidade ambiental, com penalizações por atos que desencadeassem danos ao meio ambiente.

A suinocultura, por sua vez, se enquadra como um setor de grande geração de poluentes ambientais, na contramão da sustentabilidade. Assim, além da Lei 6.938/81, outras são incidentes e importantes na suinocultura, e são apresentadas no quadro 1. Os resíduos suinícolas são semissólidos, devendo, então, atender à legislação de manejo, tratamento e disposição de resíduos líquidos e sólidos.

De acordo com inciso I do artigo 13º da Lei Federal 12.305/2010, são considerados como resíduos agrossilvopastoris “os gerados nas atividades agropecuárias e silviculturas, incluindo os relacionados com insumos utilizados nessas atividades” (BRASIL, 2010, n.p.). As atividades que geram esses resíduos abrangem a agricultura, pecuária, silvicultura e agroindústrias, e podem gerar resíduos classificados como orgânicos e inorgânicos (SCHALCH *et al.*, 2019).

Nos resíduos orgânicos estão inclusos: dejetos de produção animal, resíduos gerados na agroindústria, abatedouros, laticínios e graxarias, assim como aqueles gerados na silvicultura, na produção de madeiras para carvão e outros derivados, como lenha, papel e celulose (FERNANDEZ; CASTRO, 2019).

No estado de São Paulo, o órgão que regulamenta, controla, fiscaliza, monitora e realiza licenciamento ambiental das atividades geradoras de resíduos poluidores de águas, ar e solo é a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). O decreto 63.882/18, que regulamenta os licenciamentos ambientais das atividades de suinocultura (SÃO PAULO,

2018), deu nova redação a dispositivos do Regulamento da Lei nº 997, de 31 de maio de 1976, que dispõe sobre a prevenção e o controle da poluição, aprovada no decreto 8.468/76. A legislação ambiental federal brasileira que incide na suinocultura está descrita em ordem cronológica no Quadro 1.

Além das normatizações já citadas, os impactos ambientais da suinocultura podem também ser vinculados à lei nº 9.605/98, decreto nº 6.514/2008, que dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências, especificamente, na seção III, nos artigos 54 ao 61, que tratam de poluição e outros crimes ambientais (BRASIL, 1998).

Apesar da indústria suinícola não ser ambientalmente sustentável, existem técnicas e manejos que são adotados para minimizar os impactos dos dejetos gerados nesse setor. Uma das alternativas de destinação dos resíduos da suinocultura é o tratamento de resíduos orgânicos (RO), que se dá pela biodigestão ou biometanização (digestão anaeróbia da matéria orgânica). Esse processo reduz odores e agrega valor à biomassa que, após ser tratada, é aproveitada gerando biogás e fertilizante (CARDOSO OYAMADA, SILVA; 2015).

Quadro 1 Legislação ambiental federal incidente na suinocultura (continua)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| • Decreto n 24.643, de 10 de julho de 1934 - Código de Águas.                                                                                                                                                                                                                   |
| • Lei no 4.771, de 15 de setembro de 1965 - Código Florestal.                                                                                                                                                                                                                   |
| • Lei no 6.938/81 - Estabeleceu a finalidade e mecanismos de formulação e aplicação da Política Nacional do Meio Ambiente, constituiu o Sistema Nacional do Meio Ambiente (SISNAMA) e instituiu o Cadastro de Defesa Ambiental e o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). |
| • Lei n.º 7.347/85 Disciplina a ação civil pública de responsabilidade por danos causados ao meio ambiente, ao consumidor e dá outras providências.                                                                                                                             |

Quadro 1 Legislação ambiental federal incidente na suinocultura (conclusão)

|                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Resolução CONAMA no 001, de 23 de janeiro de 1986 – Estabelece diretrizes gerais para uso e implementação da Avaliação de Impacto Ambiental.</li> </ul>                        |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lei no 9.433, de 08 de janeiro de 1997 - Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos e cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos.</li> </ul>         |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Portaria IBAMA n 113, de 25 de novembro de 1997 - Institui Cadastro Técnico Federal de Atividades Potencialmente Poluidoras ou Utilizadoras de Recursos Ambientais.</li> </ul> |

Fonte: PALHARES (2008)

### 3.3 ECONOMIA CIRCULAR E A AGROPECUÁRIA

Atualmente, a sociedade mundial compartilha de um modelo econômico denominado linear, no qual o processo produtivo desse modelo se dá pela extração da matéria-prima, produção do produto, consumo e descarte, esse modelo de produção se baseia no consumo exacerbado e na extração contínua de matéria prima. Segundo Foster *et al.* (2016, p.3):

Tal modelo de produção pressupõe a depleção contínua de recursos naturais e se caracteriza pelo descarte acelerado e precoce dos bens consumidos. Assim, com o aumento da produção e do consumo, ocorre o aumento da extração de recursos naturais e da deposição de resíduos, provenientes do processo produtivo e do pós-consumo.

A economia linear somada ao uso intenso dos recursos naturais, consumo desenfreado, disposição inadequada dos resíduos, juntamente com aumento populacional, contribuem diretamente para o colapso do planeta. De acordo com o *Living Planet Report (2022)*, estima-se que usamos 75% a mais da biocapacidade do planeta e, nesse cenário, precisaríamos de 1,75 Terras (quase dois planetas Terra) para suprir o consumo da humanidade, apesar da discrepância regional onde ocorre os maiores consumos. Logo, repensar os modos de produção, consumo e descarte é o único caminho que a humanidade pode recorrer atualmente, na tentativa de preservar os recursos naturais, a biodiversidade e amenizar os efeitos das mudanças climáticas que afetam diretamente a qualidade de vida.

Com aumento do consumo global e uso de recursos, aumentou-se também a produção dos resíduos e, conseqüentemente, as áreas angariadas para disposição de tais resíduos, como aterros sanitários, seguida pelos processos de destinação como reciclagem, incineração, despejo em lixões e compostagem. Segundo o relatório *What a Waste: A Global Review of Solid Waste Management*, publicado pelo Banco Mundial (HOORNWEG; BHADA-TATA, 2012), até

2025, a previsão é que sejam gerados anualmente 2,2 bilhões toneladas de resíduos. Essas destinações alternativas são uma solução a médio prazo, uma vez que elas também são responsáveis por desencadear impactos ambientais, como a produção de chorume e gases pelos aterros sanitários. Tais resíduos, quando não coletados, tratados e dispostos corretamente, voltam a fazer parte do ciclo de poluição de solos, rios e ar (FOSTER *et al.*, 2016).

Pensar e colocar em prática uma nova economia, será a maneira mais eficiente de contribuir para um dos maiores desafios que a humanidade enfrenta, que são os efeitos das mudanças climáticas, os quais estão diretamente ligados à nossa forma de consumo, uso e descarte de recursos. No primeiro momento, falou-se muito no desenvolvimento sustentável relacionado ao termo sustentabilidade, principalmente após à primeira conferência mundial sobre o clima Estocolmo, em 1972. No entanto, a sustentabilidade passou realmente a fazer parte da agenda econômica de desenvolvimento durante a 55ª sessão da Assembleia Geral, nos anos 2000, a chamada Cúpula do Milênio das Nações Unidas, na qual se estabeleceu oito objetivos de desenvolvimento do milênio (ODM), que foram aderidos por 161 países (ROMA, 2019). Dentre as ODM, estava a ODM7, a qual abrangia quatro metas:

Integrar os princípios do desenvolvimento sustentável nas políticas e programas e reverter a perda de recursos ambientais; Reduzir a perda da biodiversidade, atingindo, até 2010, uma redução significativa; Reduzir pela metade, até 2015, a proporção da população sem acesso permanente e sustentável à água potável e ao esgotamento sanitário; e Até 2020, ter alcançado uma melhora significativa na vida de pelo menos 100 milhões de habitantes de assentamentos precários.

A renovação das ODM se deu na Conferência Rio +20, realizada em 2012, na qual se implementou o documento da Agenda 2030, renovando e ampliando os compromissos com a sustentabilidade Global. Assim, visualizado a incapacidade das destinações e disposições dos resíduos em solucionar satisfatoriamente a temática do desenvolvimento sustentável, uma das soluções apontadas é a reestruturação do modelo produtivo por meio da Economia Circular (Brasil-Agenda 2030, 2016).

A Economia Circular propõe que os processos produtivos passem a ser concebidos e reformulados de forma circular, ou seja, os produtos obtidos de recursos naturais do meio ambiente, continuam sendo reutilizados na cadeia de produção, diminuindo assim a extração de recursos e a disposição de resíduos no meio ambiente. Segundo Berndtsson (2015), cada produto produzido numa economia circular deve ser concebido de modo a que os componentes biológicos e técnicos possam ser facilmente separados e recirculados no sistema.

Um dos setores que causam maiores apreensões para a adoção de modelo econômico mais sustentável é a agropecuária, responsável por emitir gases do efeito estufa (GEE). No

Brasil, de acordo com Observatório do Clima- SEEG (2021), as atividades do setor foram responsáveis por 74% emissões dos GEE entre 1990-2021, consolidando o Brasil como o 7º maior poluidor mundial. Contudo, apesar dos elevados números de poluição do setor, ações de mitigação a partir do Plano Setorial de Mitigação e de Adaptação às Mudanças Climáticas para a Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura, o plano ABC, estão sendo adotadas (BRASIL-MAPA, 2021; EMBRAPA; 2023).

O plano ABC é uma política pública composta de ações que visam a promoção da ampliação da adoção de tecnologias agropecuárias sustentáveis com alto potencial de mitigação das emissões de GEE e combate ao aquecimento global. O plano aborda sete programas: 1) Recuperação de Pastagens Degradadas; 2) Integração Lavoura-Pecuária-Floresta (iLPF) e Sistemas Agroflorestais (SAFs); 3) Sistema Plantio Direto (SPD); 4) Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN); 5) Florestas Plantadas; 6) Tratamento de Dejetos Animais; e, 7) Adaptação a Mudanças Climáticas (EMBRAPA; 2023). A primeira parte do plano ABC com duração de dez anos (2010-2020) foi finalizada. E desde setembro de 2022 foi instituído a portaria MAPA Nº 471, que abarco oito compromissos até 2030, iniciando uma nova etapa do Plano ABC (BRASIL, 2022).

### 3.4 BIODIGESTORES

O biodigestor é uma importante tecnologia sustentável responsável por gerar energia renovável. O primeiro modelo surgiu, em 1939, no Instituto de pesquisa Kanpur, na Índia e, desde então, houve muitas modificações nos modelos, sendo o modelo chinês e o indiano os mais utilizados devido ao baixo custo e alta produtividade. No entanto, os processos fundamentais da biodigestão continuam os mesmos (MESSA *et al.*, 2016). No Brasil, o uso do biodigestor passou a ser incentivado pelo governo federal a partir da década de 70 (SPLINDER, 2018).

O biodigestor consiste, basicamente, em um tanque fechado, revestido de material impermeável e, dentro desse tanque, são depositados os dejetos animais ou outros resíduos orgânicos, que serão degradados por bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas. provenientes da própria biomassa. O processo de biodigestão anaeróbia passa por quatro fases essenciais para a formação dos subprodutos e, para que isso ocorra, é necessário o controle da temperatura, pH, tempo de retenção hidráulica e acidez volátil para alcançar as condições ótimas que permitem uma melhor atividade das bactérias.

Biodigestão é o processo biotecnológico que produz energia ambiental limpa e renovável, mas que ainda é de difícil acesso ao pequeno agropecuarista, seja por deficiência

nos programas institucionais de assistência técnica especializada ou despreocupação de órgãos ambientais. Tendo em vista a eficácia do tratamento e as vantagens dessa tecnologia, foram desenvolvidas adaptações de sistemas de biodigestão para agricultura familiar e pequenos produtores (SILVA, 2018).

A escolha do modelo de biodigestor deve ser realizada de acordo com alguns critérios, como o tipo de substrato a ser tratado, nível de investimento, condições ambientais, tempo de retenção hidráulica e outros, como descrito no Quadro 2.

**Quadro 2** Pontos importantes para escolha do sistema de biodigestão

| <b>Tecnologia</b>             | <b>Pontos-chave</b>                                     | <b>Opções</b>                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Sistema de alimentação</b> | Tipo de biodigestor e de matéria-prima para alimentação | Alimentação descontínua para biodigestores de Batelada Alimentação contínua ou semicontínua para fluxo em pistão/digestores CSTR Sistema de alimentação sólido ou líquido, dependendo do conteúdo da matéria seca do substrato |
| <b>Temperatura do reator</b>  | Risco para patógenos                                    | Temperatura mesofílicas quando não há risco de patógenos Temperaturas termofílicas quando houver risco de patógenos (ex.: lixo orgânico doméstico)                                                                             |
| <b>Número de fases</b>        | Composição de substratos, risco de acidificação         | Sistemas de uma fase quando não há risco de acidificação Sistema de duas fases para substratos com um elevado teor de açúcar, amido, proteínas ou de difícil degradação                                                        |
| <b>Sistema de agitação</b>    | Matéria-prima seca para alimentação                     | Agitadores mecânicos para alta concentração de sólidos no biodigestor Sistemas de agitação mecânica, hidráulica ou pneumática para baixa concentração de sólidos no biodigestor                                                |

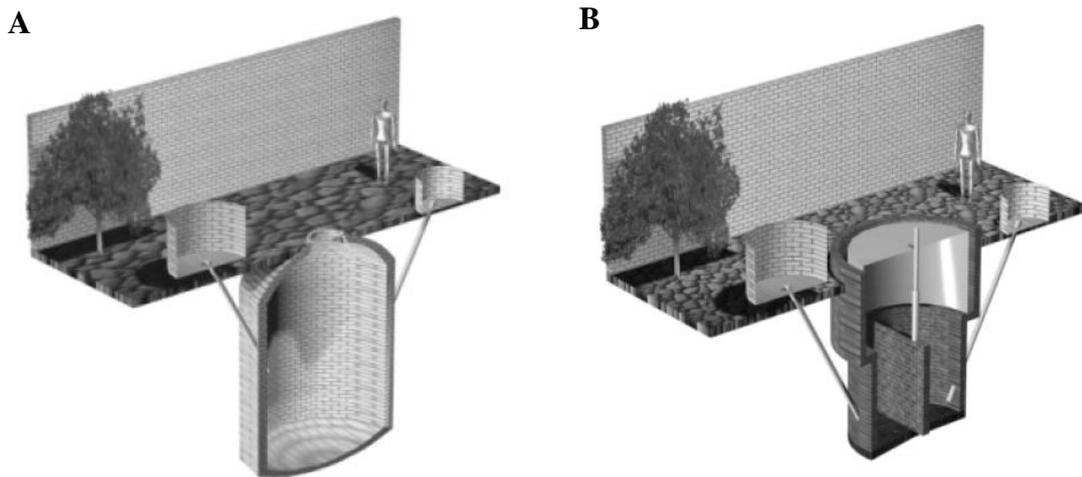
Fonte: Adaptado de KUNZ; STEINMETZ; AMARAL (2019).

Os biodigestores são caracterizados pela frequência e forma de alimentação, contenção de sólidos no reator e o sistema de agitação, os primeiros biodigestores difundidos foram aos modelos chinês e indiano, os quais eram utilizados, no primeiro, para suprir a demanda de fertilizantes para as culturas e, no segundo, para suprir as demandas energético, de seus respectivos países de desenvolvimento.

O biodigestor chinês (Figura 1-A) é mais simples e econômico, sendo constituído por uma câmara cilíndrica em alvenaria (tijolo) para a fermentação, com teto abobado, impermeável,

destinado ao armazenamento do biogás. O modelo Indiano (Figura 1-B), por sua vez, é mais sofisticado e técnico, planejado para apresentar maior eficiência na produção de biogás. Nesse modelo, há uma campânula como gasômetro, a qual pode estar mergulhada na biomassa em fermentação, ou em um selo d'água externo, e uma parede central que divide o tanque de fermentação em duas câmaras. A função da parede divisória é fazer com que o material circule por todo o interior da câmara de fermentação (DEGANUTTI *et al.*, 2002).

Figura 1- Modelo de Biodigestor Chinês (A) e modelo de biodigestor indiano (B)

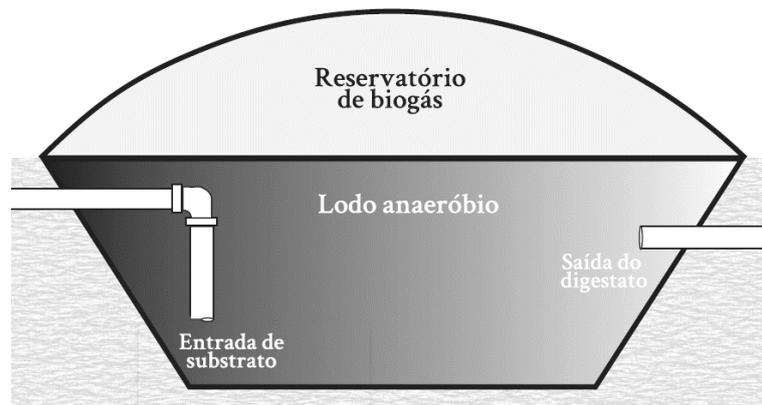


Fonte: DEGANUTTI *et al.*, 2002

De acordo com Kunz, Steinmetz e Amaral (2019), os modelos mais utilizados no Brasil são: Biodigestor de Lagoa Coberta (BLC) (Figura 2), Biodigestor tipo *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB) (Figura 3), Biodigestor *Continuous Stirred Tank Reactor* (CSTR) e Biodigestor em fase sólida (*dry digestion*) (Figura 4).

O modelo BLC (Figura 2) é amplamente difundido no Brasil pela vantagem de poder ser implantado tanto em pequenas como grandes propriedades, por possuir baixo nível tecnológico, pela facilidade de construção e operação, comumente conhecido como modelo Canadense ou de Lona. Este consiste em uma caixa de alvenaria construída no solo, na horizontal, com maior largura que profundidade, impermeabilizada e coberta com material geossintético.

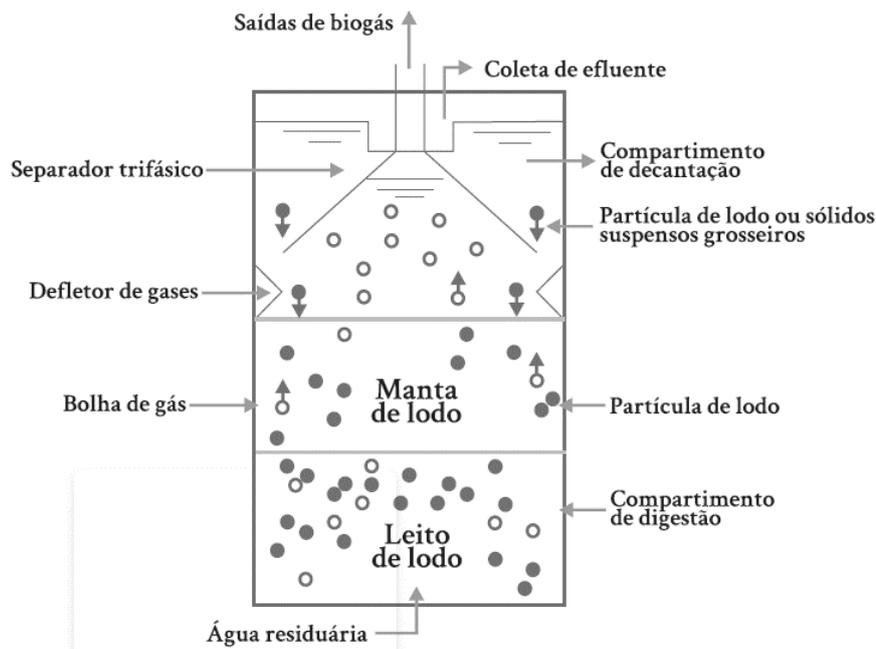
**Figura 2-** Esquema representativo interno do Modelo de Biodigestor de Lagoa Coberta Canadense



Fonte: KUNZ *et al.*, 2019.

O biodigestor *UASB* (Figura 3) é caracterizado pelo fluxo ascendente do afluente por uma manta de lodo até o topo do reator onde se encontra um separador trifásico. Para a construção, é necessário considerar o volume da carga orgânica, velocidade superficial e volume efetivo de tratamento. Assim como o BLC, tem alta capacidade de retenção hídrica. Porém, por questões hidrodinâmicas, o afluente deve apresentar baixa concentração de sólidos totais (<2%), sendo necessário o pré-tratamento quando a biomassa é oriunda de dejetos animais (DEGANUTTI; PALHACI; ROSSI, 2002; KUNZ; STEINMETZ; AMARAL, 2019, SCHALCH *et al.* 2019).

**Figura 3-** Esquema de funcionamento de um biodigestor tipo *UASB*



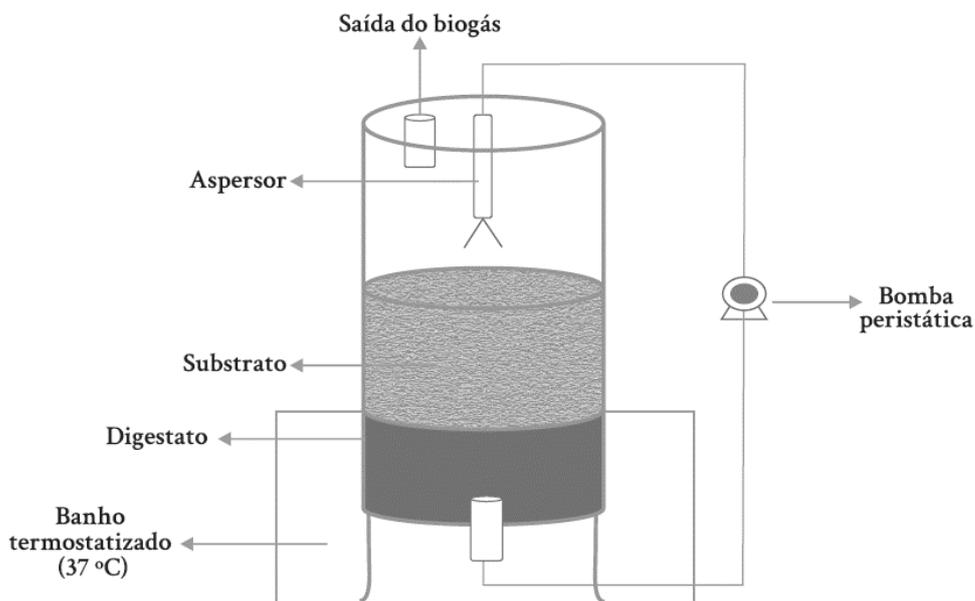
Fonte: KUNZ *et al.* 2019

O modelo de biodigestor CSTR corresponde a 90% das plantas instaladas na Europa, apresenta maior custo de implantação e manutenção devido à agitação que proporciona maior ressuspensão da biomassa, contribuindo para maior contato entre matéria orgânica e microrganismos (KUNZ; STEINMETZ; AMARAL, 2019, SCHALCH *et al.* 2019).

Os biodigestores de fase seca (*dry digestion*) são mais comuns em maiores concentrações de sólidos, de 20% a 40%. Na biodigestão, ocorre a adição do substrato que é adicionado com a metade do inóculo, que percola pelo que já está recirculando sobre a fração sólida (Figura 4). A quantidade de gás metano produzida nesse sistema é relativamente alta e, além disso, possui algumas características específicas da digestão de fase seca.

Como a alimentação do reator é descontínua, precisa ser aberto para ser alimentado, não requer diluição do substrato e suporta um menor volume. No entanto, o substrato pode ter maiores concentrações de sólidos e partículas maiores, apresentando uma produção que pode chegar a ser 40% maior que a biodigestão úmida (KUNZ; STEINMETZ; AMARAL, 2019).

**Figura 4-** Biodigestor em fase sólida e em batelada, com recirculação de inóculo



Fonte: KUNZ *et al.* 2019 apud MARCHIORO *et al.*, 2018.

De acordo com Kunz *et al.* (2019), além de fazer a escolha correta do reator com o substrato a ser degradado, deve-se levar em consideração a segurança do processo, que está relacionada a riscos ocupacionais e ambientais, e à efetividade do processo de geração do biogás.

O efluente da biodigestão, o digestato ainda apresenta altas concentrações de nutrientes e matéria orgânica, o que possibilita seu uso na agricultura. Contudo, essas altas concentrações de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, podem exaurir o solo. Assim, existem formas alternativas complementares à biodigestão para o tratamento do digestato, e uma delas é a implantação de lagoas de estabilização, que são locais construídos para o armazenamento do digestato, e que contribuem para a estabilização dos níveis de nitrogênio e fósforo (KUNZ, HIGARASHI, DE OLIVEIRA; 2007).

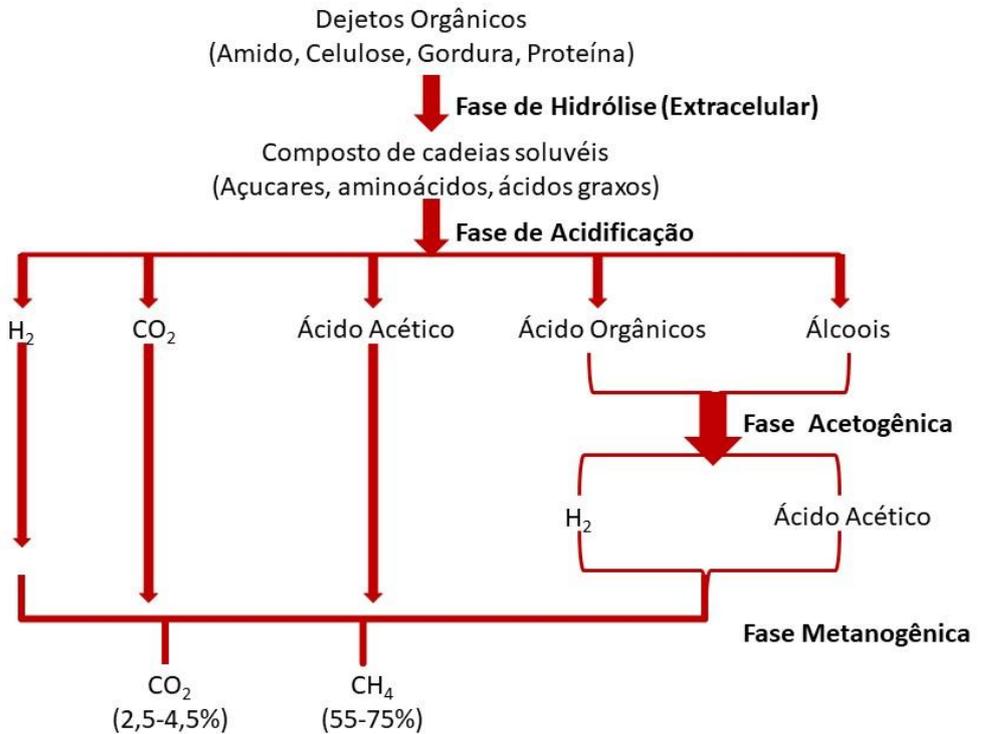
### 3.4 PROCESSO DA BIODIGESTÃO

A fermentação da biomassa é dividida em quatro etapas, entretanto, dentro do tanque de digestão o processo é dinâmico, sendo gerados os subprodutos das reações. A biodigestão passa por fases denominadas hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (figura 5). As degradações que ocorrem nas quatro fases são realizadas obrigatoriamente por bactérias anaeróbias ou anaeróbias facultativas, sendo que, em cada fase, um grupo faz a degradação (MESSA *et al.*, 2016).

A fase de hidrólise é realizada por um grupo de bactérias hidrolíticas que secretam enzimas que degradam compostos insolúveis, convertendo-os em solúveis, ou seja, proteínas em aminoácidos, carboidratos em açúcares, lipídios em ácidos graxos. Após a conversão, outro grupo de bactérias dá continuidade à biodigestão dos compostos solúveis. Na fase seguinte, a acidificação, os produtos da fase anterior são convertidos em ácido orgânicos, ácido acético, hidrogênio molecular ( $H_2$ ), dióxido de carbono ( $CO_2$ ) e álcoois. A próxima etapa, a acetogênica, é realizada por bactérias sintróficas que metabolizam os produtos da fase acidogênica produzindo os gases hidrogênio ( $H_2$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ), ácido acético, ácidos orgânicos de cadeia curta e, em seguida, esses produtos são transformados em metano ( $CH_4$ ) e  $CO_2$ , na fase metanogênica (RIZONNI *et al.*, 2012).

A biodigestão anaeróbia precisa ter condições balanceadas para assegurar um bom rendimento das reações envolvidas. O controle da produção de gás metano depende de vários fatores, incluindo a quantidade de matéria orgânica introduzida, diariamente, no sistema, pH, alcalinidade, temperatura e a qualidade da matéria orgânica do afluente que pode ser avaliada pela demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV) e nitrogênio total (NT).

Figura 5- Esquema de digestão anaeróbia de matéria orgânica



Fonte: adaptado de SOUSA (1999).

### 3.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A BIODIGESTÃO

A qualidade da fermentação no biodigestor pode ser afetada pela variação dos fatores essenciais para a funcionalidade do sistema. Além disso, a entrada de antibióticos, inseticidas e desinfetantes pode alterar a atividade biológica dos microrganismos e, conseqüentemente, diminuir a qualidade dos subprodutos, incluindo o biofertilizante e o biogás (SCHALCH *et al.*, 2019).

Os fatores que influenciam o processo de biodigestão estão diretamente relacionados ao metabolismo e crescimento das bactérias presentes no ambiente do biodigestor, sendo os principais, a temperatura, pH e os nutrientes (ALMEIDA, 2021).

O sistema é mantido por reações químicas e bioquímicas que necessitam de temperaturas ótimas, entre 15 °C e 65 °C. Este é o intervalo de temperaturas ótimas de crescimento da maioria dos microrganismos, incluindo as bactérias psicrófilas (temperatura ótima de crescimento abaixo de 20° C), mesófilas (entre 30 °C e 40 °C) e termófilas (entre 50 °C e 65 °C). Embora sejam essas as faixas de atividades dos microrganismos, convém salientar que, à temperatura

de 37 °C, o processo de biodigestão se torna mais efetivo. Assim, quando ocorre uma mudança brusca na temperatura, o crescimento e metabolismo das bactérias digestoras podem ser afetados e, em algumas situações, pode até mesmo levá-las à morte. Percebe-se, portanto, que a biodigestão é uma das formas de desativar microrganismos patógenos (CRAVEIRA, 1982; SILVA, CONTRERA, 2019).

O intervalo de pH ideal para o processo de fermentação deve situar-se em torno do pH neutro, ou seja, entre 6,5 e 7,2, favorecendo o crescimento das bactérias denominadas neutrófilas. A sobrecarga de matéria no sistema pode alterá-lo, tornando-o mais ácido devido aos metabólitos da fase de acidificação (SCHALCH *et al.* 2019, ALMEIDA, 2021)). Alguns íons são essenciais para o metabolismo bacteriano, logo, além do material orgânico que é metabolizado pelos microrganismos, como nutrientes, é necessária a presença de íons inorgânicos, como fosfato, cálcio, magnésio, ferro, para que o processo de fermentação seja realizado e não afete negativamente a produção dos efluentes (SCHALCH *et al.* 2019, ALMEIDA, 2021).

### 3.6 EFLUENTES: BIOGÁS E O BIOFERTILIZANTE

#### 3.6.1 Biogás

Após as etapas de fermentação, a biomassa transformada gera dois subprodutos, o biogás, que inclui CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> e outros gases, e o biofertilizante (efluente pastoso), que são muito importantes para a manutenção de uma agropecuária sustentável, uma vez que ambos são reutilizados no sistema agrícola, reduzindo gastos com energia e adubação do solo.

O biogás, conhecido popularmente como gás dos pântanos, foi descoberto em 1667, mas só ganhou visibilidade em 1884, quando Pasteur e seu aluno fizeram um experimento misturando estrume e água a 35 °C e obtiveram uma produção de 100 L de gás por m<sup>3</sup> de matéria, apontado como produto resultante da fermentação (PECORA, 2006).

Desde o final da década de 60, a comunidade científica tem pautado com mais frequência e preocupação o esgotamento do ecossistema terrestre. Com as revoluções industriais da segunda metade do século XIX e da primeira metade do século XX, os avanços tecnológicos, juntamente com o crescimento populacional e a globalização, trouxeram melhorias para o setor agroindustrial. Entretanto, ocorreu aumento do uso dos recursos não-renováveis, o esgotamento do solo pela monocultura e o desmatamento e a poluição de ar e corpos da água.

Com intuito de diminuir os impactos ambientais, a comunidade científica postulou uma nova forma de desenvolvimento econômico, embasada na sustentabilidade, cujo cerne é redução dos impactos ambientais, por meio da utilização de energias renováveis e reaproveitando os resíduos gerados pelas ações antropogênicas. Nesse sentido, a produção e o uso do biogás tornaram-se uma forma de reduzir os impactos gerados pela agropecuária, que é responsável pela maior fonte de emissão de gás metano para a atmosfera, um dos principais gases responsáveis pelo efeito estufa. Paralelamente, os gastos com energias não-renováveis são reduzidos, gerando o Certificado de Emissão Reduzidas, denominado também crédito de carbono (IEA, 2020).

O biogás gerado nos sistemas de digestão anaeróbia é composto de 65% metano, 35% CO<sub>2</sub> e 5% de outros gases, e, além de possuir um alto poder calorífico, é uma alternativa de energia renovável viável para aproveitamento dos resíduos orgânicos, uma vez que sua queima não gera gases tóxicos. Apesar de liberar o CO<sub>2</sub>, este é 21 vezes menos prejudicial que o metano, e ainda se reaproveita a biomassa do subproduto como fertilizante (SCHALCH *et al.* 2019).

### 3.6.2 Biofertilizante

A China e a Índia são os maiores produtores de biofertilizante, possuindo umas das maiores quantidades de biodigestores de pequena escala, utilizados principalmente em áreas rurais (VASCO-CORREA *et al.*, 2018, IEA 2020). O biofertilizante, um subproduto da fermentação anaeróbia, é rico em matéria orgânica e, por isso, utilizado como adubo em diversas culturas. Por ser efluente da biodigestão, possui um baixo custo para o produtor, não acarreta danos ao solo, como acidez, devido à baixa alcalinidade e, além disso, o modo de preparo da matéria orgânica, tempo de decomposição, população microbiana, temperatura, pH e a material de origem influenciam a composição química desse fertilizante (VITAL *et al.*, 2018).

Outros diferenciais encontrados nesse efluente pastoso são a ausência de defensivos agrícolas e a promoção da retenção de umidade pelo solo, possibilitando o crescimento de plantas no período de seca, estimulando a oxidação da matéria orgânica pelos microrganismos e aumentando a velocidade de assimilação dos nutrientes pelas plantas. Outro fator importante é o alto potencial de atividade microbiana e bioativa que proporciona proteção e resistência à planta contra ação externa de pragas e doenças, com promoção da antibiose, competição, indução de resistência e preservação do equilíbrio nutricional das plantas (SOUZA; LAGE FILHO, 2014).

O uso dos resíduos orgânicos de reatores biológicos como o fertilizante, é uma importante forma de alterar a fonte de contaminação do solo e diminuir os impactos causados pelos dejetos da agropecuária (VITAL *et al.*, 2018)

### 3.7 MICRORGANISMOS NO BIOFERTILIZANTE

No processo de biodigestão anaeróbia, realizada em sistemas de biodigestores, são encontrados organismos procaríotos que pertencem aos domínios *Archaea* e *Bacteria*.

As *Archaeas* metanogênicas são responsáveis pela produção de metano, possuem crescimento lento, são extremamente dependentes de condições ótimas de crescimento e necessitam de vitaminas, minerais, fonte de enxofre. As bactérias presentes nas outras fases da biodigestão que pertencem ao domínio *Bacteria*, são anaeróbias estritas e/ou fermentadoras facultativas, e estão distribuídas em vários gêneros, como *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, entre outros encontrados na fase de acidogênese (SCHALCH *et al.* 2019; ROCHA, 2020).

É necessário conhecer a microbiota e a cinética da biodigestão para estimular corretamente o crescimento dos microrganismos e a produção de efluente. Fatores físico-químicos e nutricionais também auxiliam na seleção dos microrganismos mais bem adaptados.

A microbiota presente nos biodigestores é proveniente dos dejetos suínos que são compostos principalmente por fezes, urina, água dos bebedouros e da higienização, resíduos de ração, pelos, poeiras e outros compostos do criadouro que acabam sendo lixiviados juntos no tanque de dejetos (RIZONNI *et al.*, 2012). É de suma importância que o tratamento anaeróbio seja eficiente na desativação, principalmente, de patógenos que ameacem a saúde pública (Tabela 1), de forma a evitar disseminação ambiental desses patógenos que poderiam atingir plantas, animais e humanos.

**Tabela 1-** Patógenos de importância para a saúde pública, desativados na Biodigestão

| Organismos                               | Temperatura °C | Tempo de retenção (dias) | Morte % |
|------------------------------------------|----------------|--------------------------|---------|
| <i>Poliovírus</i>                        | 35             | 2                        | 98.5    |
| <i>Salmonella spp.</i>                   | 22-37          | 6-20                     | 82-96   |
| <i>Salmonella enterica sorovar Typhi</i> | 22-37          | 6                        | 99      |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i>        | 30             | -                        | 100     |
| <i>Ascaris spp.</i>                      | 29             | 15                       | 90      |
| <i>Cisto de parasitas</i>                | 30             | 10                       | 100     |

Fonte: CRAVEIRO *et al.* (1982)

### 3.8 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO E TIPAGEM MOLECULAR BACTERIANA

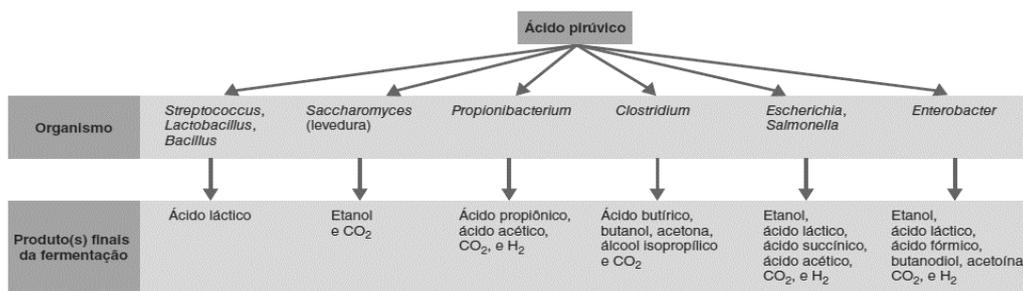
Os métodos usados na discriminação e caracterização de microrganismos podem ser divididos em fenotípicos e genotípicos (ou moleculares). Os métodos fenotípicos envolvem as principais técnicas clássicas de microbiologia e baseiam-se em características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, enquanto os métodos moleculares detectam variações genotípicas e proteicas dos microrganismos.

Atualmente, os métodos moleculares estão amplamente difundidos e sofreram uma notável evolução com relação ao diagnóstico e à caracterização bacteriana. No entanto, é importante destacar que os métodos fenotípicos ainda são primordiais e de extrema relevância na bacteriologia, pois, muitas vezes, produzem resultados satisfatórios, reproduzíveis, de alta confiabilidade e com baixo custo. Com base nesse princípio, o desenvolvimento do estudo foi elaborado buscando-se os métodos mais adequados para a caracterização de bactérias isoladas de biofertilizantes, de modo que foram utilizados tanto os fenotípicos como os moleculares.

A classificação e identificação bacteriana pode ocorrer por aspectos macro e micro, pelo crescimento, metabolismo, pela antigenicidade e pelo genótipo. As bactérias crescem e formam agregados denominados colônias, com mais de um milhão de indivíduos que se dividem da mesma forma, com mesmo tamanho e cor. Essas características podem ser identificadas de acordo com o meio de crescimento e técnicas de coloração da membrana (MURRAY, 2017; VÁRADI *et al.*, 2017).

Algumas formas de diferenciar espécies bacterianas são pelo tipo de parede celular por meio da coloração de Gram, a qual possibilita identificar bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Outra forma de identificar bactérias é pelo metabolismo, pois diferentes espécies produzem enzimas diferentes. Dessa maneira, são realizadas provas bioquímicas que são meios seletivos e diferenciais elaborados para impedir o crescimento de alguns microrganismos e favorecer o crescimento de outros (Figura 6), diminuindo, assim, a possibilidade de equívocos e otimizando a identificação (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; VÁRADI *et al.*, 2017).

Figura 6- Relação dos produtos de várias fermentações microbianas x microrganismos.



Fonte: TORTORA, FUNKE, CASE (2017).

O ágar *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB) é um meio utilizado para diferenciação e isolamento de bacilos e bastonetes entéricos Gram-negativos, enquanto o Manitol serve para identificar cocos Gram-positivos, catalase positiva (CGP/C+), mais especificamente utilizado no isolamento e diferenciação de estafilococos. A catalase é uma enzima responsável por degradar o peróxido de oxigênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que pode ser tóxico para a célula bacteriana (MOURA, 2017).

O ágar Tioglicolato é um meio oxirredutor que possibilita o crescimento de diversos microrganismos, sendo eles anaeróbios estritos ou facultativos. Essa característica deve-se à L-cistina presente no meio que é um agente redutor, o qual atua como quelante para possíveis metais presentes no meio, propiciando a anaerobiose. Além disso, o meio possui resazurina, indicador da presença de oxigênio (LABORCLIN, 2019), sendo esse meio importante para seleção de bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas.

O Ágar Muller Hinton (MH) é um meio comum de crescimento na microbiologia, não sendo seletivo e nem diferencial, contudo, é o meio preconizado para os experimentos relacionados à susceptibilidade antimicrobiana, e pode ser acrescido ou não de antimicrobianos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Além dos métodos macroscópicos e microscópicos clássicos, métodos moleculares têm sido utilizados para a triagem bacteriana, caracterização, estudos epidemiológicos e taxonômicos bacterianos. Os estudos moleculares e epidemiológicos têm auxiliado na compreensão da estrutura clonal de diferentes patógenos.

Os métodos de tipagem moleculares são diversos e, dentre eles, os utilizados neste estudo foram: identificação do gene ribossomal 16s por *Polimerase Chain Reaction* (PCR) e genes intrínsecos, análise de massa proteômica por *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight* (MALDI-TOF), tipagem molecular por Sequências Repetitivas Extragênicas palindrômicas (REP), *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC). (DINGLE, BUTLER-WU, 2013; KLINDWORTH *et al.* 2012; GANDRA *et al.*, 2008; OLIVER-BEAN, 1999).

A tipagem molecular bacteriana utiliza as relações genéticas para identificação de gêneros, espécies e subespécies. A partir dessas técnicas, é possível compreender e avaliar a relação genética entre as bactérias, possibilitando traçar rotas de transmissão e disseminação em hospitais, na comunidade e no ambiente. Além disso, é possível identificar fontes e surtos, identificar cepas virulentas, permitindo as ações eficazes de vigilância epidemiológica e de planejamento controles microbiológicos melhores.

Os elementos intergênicos repetitivos são sequências genômicas repetitivas, conservadas, denominadas ERIC. As sequências ERIC são elementos gênicos localizados em regiões extragênicas do genoma bacteriano, possuem em torno de 126pb e foram definidos por dados bases de estudo em *E. coli* e *Salmonella typhimurium*. Os elementos ERIC são considerados *fingerprinting*, ou seja, digitais do material genético bacteriano, perfis específicos que são encontrados em cada espécie e que são utilizados como tipagem molecular, estabelecendo a relação genética entre populações bacterianas (STERN *et al.*, 1984; OLIVER-BEAN, 1999; ALJINDAN *et al.*, 2018)

Tais métodos permitem identificar espécies gerando informações para uma melhor compreensão acerca dos mecanismos envolvidos na evolução da virulência e resistência bacterianas, além de revelar o surgimento e a prevalência de potenciais patógenos, avaliando a similaridade genética e epidemiológica entre as bactérias analisadas.

### 3.9 PATÓGENOS OPORTUNISTAS

Os microrganismos são considerados os primeiros seres que se desenvolveram e habitaram a Terra. Estimativas apontam que o primeiro microrganismo surgiu há 3,5 milhões de anos, quando ainda não existia atmosfera, e foi devido às suas ações metabólicas durante milhões de anos é que se tornou possível o desenvolvimento de uma atmosfera rica em oxigênio e o surgimento de vidas aeróbias, como plantas e animais complexos. Por dispor de uma morfologia simples, grande diversidade genética e metabólica, eles são encontrados em diversos *habitats*, desde os com alta pressão, alta concentração salina, sob diferentes valores de pH, sob temperaturas elevadas, no interior de rochas, em fontes termais, em fendas vulcânicas, em regiões polares e muitos outros (EMBRAPA, 1994).

A caracterização das funções dos microrganismos no ambiente ainda não foi totalmente descrita, no entanto, sabe-se que eles atuam em processos biológicos como fotossíntese, ciclagem de matéria orgânica, ciclos biogeoquímicos, manutenção da fertilidade e composição do solo. Nos seres mais complexos, do grande reino *Eucakaria*, encontram-se diversas relações interespecíficas desses microrganismos, principalmente, as bactérias. Apesar de serem benéficos e possuírem papéis fundamentais na produção de nutrientes, como na microbiota intestinal de invertebrados e cordados, frequentemente, esses microrganismos são associados a doenças do homem, de diversos animais e de plantas (MORAN, 2006).

A *Escherichia coli*, um bacilo Gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é uma enterobactéria comensal amplamente estudada, e um importante patógeno, o qual é

responsável por causar diversas doenças, como infecções do trato urinário e bacteremias em humanos, mamíferos e aves. É uma espécie encontrada em diversas microbiotas intestinais de animais, bem como no ambiente, principalmente, em rotas contaminadas por esgoto doméstico e de produção animal (solo, água e alimentos) (BLOUNT, 2015).

A espécie *E. coli*, foi descrita pela primeira vez, em 1885, por Theodor Escherich, que a isolou de fezes de crianças com diarreia. Essa bactéria apresenta sorotipos patogênicos para mamíferos e pássaros, que foram observados em 1893 por um veterinário dinamarquês. Atualmente, são classificadas em mais de cinco sorotipos de acordo com as síndromes clínicas que podem causar. Segundo a OMS (1980), as primeiras classificações dos sorotipos foram realizadas na década de 40, utilizando antígenos de superfície O (lipolissacarídeo), K (Capsular) e H (flagelar). As três primeiras classes descritas foram *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* Enteropatogênica (EPEC).

Outros sorotipos foram descobertos e classificados nas décadas de 80 e 90, de acordo com adesinas e toxinas produzidas, hospedeiro infectado, órgão afetado e tipo de aderência causada em células, sendo elas: Shiga/Verotoxigênica (Stx/VTEC), Enterohemorrágica (EHEC), Enteroaderente (AAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC), Necrotoxigênica (NTEC), Uropatogênica (UPEC), Associadas a meningites neonatal (NMEC), *Escherichia coli* Patogênica Aviária (APEC), entre outros patotipos (DENAMOUR *et al.*, 2021; VILAS *et al.*, 2016, BLOUNT, 2015; MAINIL, 2013)

Os patotipos de *E. coli* possuem fatores de virulência especializados como adesinas, toxinas, sistema de aquisição de ferro (sideróforos), revestimentos polissacarídeo e invasinas em algumas cepas. Além disso, esses microrganismos podem apresentar alta resistência a antimicrobianos utilizados para tratamento na clínica humana e veterinária, levando a óbito mais de 40 mil pessoas, anualmente, nos Estados Unidos. São responsáveis também por prejuízos na produção animal, sendo um dos principais agentes de diarreia neonatal de suínos, causando colibacilose e levando 25% dos animais a óbito, se nenhuma medida for adotada (VILAS *et al.*, 2016; ZANELLA, MORÉS, BARCELLOS, 2016).

Segundo Denamour *et al.* (2021), diferentes populações de *E. coli* existem tanto no intestino de vertebrados, como no ambiente e ambas podem ser comensais ou patogênicas. As cepas de *E. coli* patogênicas Extraintestinais (ExPEC) e de *E. coli* patogênicas inaintestinais (InPEC) teriam evoluídos para melhorar a colonização e a persistência no ambiente, sendo a diarreia uma forma eficiente de chegar ao ambiente. Para melhorar a permanência na mucosa intestinal, a virulência é um mecanismo em comum, apontando, assim, a importância das ilhas de

patogenicidade que podem estar presentes tanto nas *E. coli* comensais como nas patogênicas ExPEC ou InPEC.

Além da virulência, cepas *E. coli* multirresistentes (EC-MDR) a antimicrobianos estão amplamente dispersadas no mundo todo e são um problema global de saúde pública. Essas cepas, usualmente, possuem mecanismos de resistências consolidados como as  $\beta$ -lactamases de Espectro Estendido (ESBLs), carbapenemases, mecanismos de resistência a quinolonas mediados por plasmídeo (PMQR) e outros mecanismos, como metilases ribossomais que afetam a resistência à fosfomicina, mediada por aminoglicosídeos. Esses mecanismos têm sido associados a clones de alto risco, que possuem alta disseminação e já são encontrados em humanos, animais e no ambiente, tornando *E. coli* uma problemática em diversas áreas (VILAS *et al.*, 2016).

*Enterococcus* são bactérias Gram-positivas com forma de cocos e comensais dos aparelhos digestivo e urinário. Essas bactérias podem se apresentar em pares ou cadeias e são, comumente, associadas a Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), causando infecções do trato-urinário, bacteremias, endocardites, queimaduras e cirurgias, bem como um dos principais causadores de infecções nosocomiais (SPARO *et al.* 2018).

Espécies de *Enterococcus* são frequentemente encontradas em diversas superfícies e na microbiota de invertebrados e vertebrados, também são associadas às plantas e à fermentação de alimentos. Em meados da década de 80, eram classificados como grupo D de *Streptococci*, entretanto, devido às distâncias genótípicas encontradas entre família *Streptococci*, ganhou um gênero separado e, atualmente, são descritas mais de 50 espécies de *Enterococcus* (FIORE; VAN TYNE; GILMORE, 2019).

O êxito dos *Enterococcus* em ser um dos principais agentes de infecções hospitalares está principalmente associado à resistência intrínseca às cefalosporinas, aminoglicosídeos, lincosamidas, estreptomicinas e à ciprofloxacina e à vancomicina. Além dos mecanismos de resistência intrínseca que dificultam tratamentos e favorecem a sobrevivência dessas bactérias comensais, temos a patogenicidade (ARIAS, MURRAY; 2012, CONWELL *et al.* 2017).

Por vezes, esses patógenos não possuem habilidade de produzir toxinas, contudo, apresentam alta capacidade de evadir do sistema imune, atacar células hospedeiras, a matriz extracelular e matéria inerte como medicamento, produzir adesinas e formar biofilmes que aumentam a capacidade de resistência aos antimicrobianos, funcionando como barreira física e beneficiando a sobrevivência do patógeno. (GARCIA-SOLACHE, RICE, 2019).

Entre os *Enterococcus*, as espécies mais comuns encontradas na área clínica são *E. faecium* e *E. faecalis*. *E. faecium* foi classificado juntamente com outros oito patógenos com alto risco de apresentar multirresistência. Em conjunto, essas duas espécies são responsáveis por 75% das IRAS de *Enterococcus*, cuja alta resistência está relacionada, principalmente, com a disseminação de cepas *Enterococcus* Resistentes à Vancomicina (ERV) (GARCIA-SOLACHE; RICE, 2019; DE OLIVEIRA *et al.* 2020).

Estudos recentes apontam que uma resistência cruzada de Vancomicina (de uso humano) e Avoparcina (de uso animal) pode ter surgido em animais de produção. Nesses animais, antimicrobianos, como glicopeptídeos, macrolídeos e oligossacarídeos, são utilizados como promotores de crescimento e profilático, principalmente, a Avoparcina, desde 1975. Até 2008, não tinham sido isoladas cepas ERV em animais, entretanto, logo que se descobriu o cruzamento de resistências, a Avoparcina foi proibida de ser usada como promotor de crescimento em diversos países (GARCIA-SOLACHE; RICE, 2019; DE OLIVEIRA *et al.* 2020).

Entre as décadas de 70 e 80, emergiram infecções causadas por espécies de *Enterococcus* multirresistentes e, atualmente, estão entre as maiores responsáveis pelas IRAS, sendo o terceiro maior responsável pela endocardite em humanos (GARCÍA-SOLACHE, RICE, 2019; BRÄIEK, SMAOUI; 2019). A Vancomicina foi um antimicrobiano utilizado, principalmente, de forma intravenosa, em hospitais para combate de cepas resistentes aos macrolídeos, entretanto, na metade dos anos 80, surgiram cepas resistentes à Vancomicina (RV). Atualmente, 80% dos *E. faecium* isolados de hospitais são ERV e estão amplamente disseminados no globo, alarmando a Saúde Pública mundial, que perdeu um importante antimicrobiano, como último recurso terapêutico (LEBRETON F., WILLEMS R.J.L., GILMORE M.S., 2014, FIORE; VAN TYNE; GILMORE, 2019).

### 3.10 PATOGENICIDADE E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Historicamente, as bactérias têm sido uma das grandes preocupações da comunidade científica, da área de saúde e da sociedade em geral. Esses microrganismos compõem a microbiota de todos os organismos complexos e têm importância na manutenção, proteção e, em alguns casos, produção de nutrientes essenciais para os processos biológicos, como produção de vitaminas. Por outro lado, são considerados patógenos em potencial quando estão em meio ambiente propício para sua reprodução descontrolada, pois possuem mecanismos,

como os fatores de virulência, que desequilibram a fisiologia do hospedeiro e o levam ao estado de doenças (MORAN, 2006; ERKEN *et al.* 2013).

Os fatores de virulência são mecanismos codificados por genes que, geralmente, estão localizados em ilhas de patogenicidade e são responsáveis por auxiliar na colonização, manutenção e proteção do patógeno no hospedeiro. Dentre os fatores de virulência, são destacadas as adesinas fimbriais e não fimbriais, que promovem a fixação, adesão e formação de biofilmes e citotoxinas que podem alterar o citoesqueleto da célula hospedeira e culminar na morte celular (RUSSO; MARR, 2019).

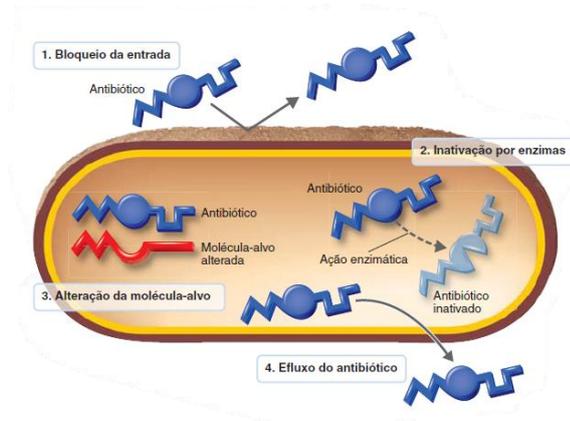
Há também os sistemas de captação de ferro (sideróforos) que são moléculas responsáveis pela captura de ferro do organismo hospedeiro, o qual é essencial para a sobrevivência das bactérias, uma vez que esse elemento é cofator essencial para seu metabolismo. A cápsula possui o papel de proteção contra o sistema imune do hospedeiro, protegendo a célula bacteriana contra a fagocitose por células eucarióticas, como os macrófagos e neutrófilos, além de auxiliar na adesão bacteriana e diminuir a penetração de agentes agressores à célula, incluindo antimicrobianos (CLEGG; MURPHY, 2016).

Com a descoberta da penicilina, em 1928, foi possível o uso de fármacos para o tratamento de infecções bacterianas. Atualmente, várias classes de antimicrobianos são descritas e amplamente utilizadas na medicina humana e veterinária e na agropecuária. Na pecuária, os antibióticos têm sido utilizados também para promoção do crescimento animal.

O uso contínuo desses antimicrobianos proporcionou a seleção de indivíduos resistentes e alguns estudos apontam que animais domésticos, equinos e crianças que nunca tiveram contato com antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas e glicopeptídeos apresentaram bactérias resistentes a eles (ARIAS; CARRILHO, 2012).

As bactérias podem possuir diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos, dentre eles, destruição ou inibição enzimática dos fármacos (1), prevenção da entrada do sítio alvo (2), alteração do sítio alvo do fármaco (3), efluxo rápido do antibiótico (4) como demonstrado na figura 7 abaixo. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017, CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

Figura 7- Mecanismos de resistências aos antimicrobianos.



Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE (2017).

### 3.11 USO DE ANTIMICROBIANOS NA PECUÁRIA

Os antimicrobianos são indispensáveis para a pecuária e têm sido aplicados para a promoção do bem-estar animal, prevenção de doenças epidêmicas contagiosas, melhoria na produtividade animal, prevenção na transferência de zoonoses de animais aos seres humanos, seguridade de produtos de origem animal e prevenção de doenças de origem alimentar. Estima-se que 50% dos antibióticos produzidos mundialmente sejam empregados na profilaxia e tratamento de animais de companhia, extermínio de pragas na agricultura e na promoção de crescimento animal. Ressalta-se que eles pertencem às mesmas classes dos prescritos para seres humanos (ARIAS; CARRILHO, 2012).

Segundo o relatório anual de uso de antimicrobianos destinados aos animais que compilou dados referente aos anos de 2017, 2018, 2019 (OIE, 2021), estimou-se que foram utilizadas 93 t, e que 60% foram utilizados na Ásia e Oriente Médio. De acordo com Martinez (2009), calcula-se que, entre 1997 e 1999 o consumo de antibióticos em animais aumentou 10% em dois anos na terapêutica veterinária na Europa.

Atualmente segundo OIE (2021), 26% do uso de antimicrobianos em 160 países é como promotor de crescimento e 70% para uso terapêutico e em 2017 estima-se que foram utilizadas 93 toneladas de antimicrobianos, indo na contramão dos alertas da FAO (do inglês *Food and Agriculture Organisation*), OIE (do inglês *World Organisation for Animal Health*) e OMS. Essas entidades, desde 2015, possuem comitê de combate à resistência aos antimicrobianos e à promoção do uso consciente de antimicrobianos.

De acordo com os levantamentos feitos, as classes de antibiótico mais utilizadas foram as tetraciclina (33,9%), polipeptídios (11,1%) penicilinas (10,9%), macrolídeos (10,4%),

anfenicóis (4,8%), aminoglicosídeos (4,4%), glicofosfolipídeos (3,3%), fluoroquinolonas (3%) (OIE, 2021).

As preocupações com aumento da resistência bacteriana devido ao uso clínico e não clínico dos antimicrobianos pela veterinária se intensificaram na década de 70, uma vez que essas bactérias podem ser reservatórios de genes de resistência e potentes disseminadores para bactérias patogênicas e comensais. O resultado do uso de antimicrobianos em animais não difere do uso humano, a quantidade e o uso padrão determinam a taxa de resistência (MARTINEZ, 2009; GILMORE *et al.*, 2014). O uso de antibióticos em hospitais, na agricultura e na veterinária geram dois tipos de resíduos: os metabólitos antimicrobianos e os genes de resistência, que são liberados nos ecossistemas naturais e influenciam a microbiota local.

Deve ser destacado que antimicrobianos não são biodegradáveis e são liberados em grandes quantidades nos efluentes de fazendas e hospitais, tornando-se, assim, contaminantes de águas superficiais, subterrâneas e do solo. No entanto, no solo, é possível encontrar uma grande quantidade de antimicrobianos que são originados de bactérias e fungos, necessários para manter o dinamismo do ecossistema. Muitos dos genes de resistência já eram presentes em bactérias primitivas, que utilizavam esse mecanismo para competir e selecionar os indivíduos mais adaptados ao ecossistema (MARTINEZ, 2009, ERKEN; LUTZ; MCDOUGALD, 2013).

A resistência aos antimicrobianos é caracterizada como problema quando ocorre a migração constante desses genes de resistência em diversos meios. As atividades comerciais e o transporte e intercâmbio de pessoas entre países foram um facilitador para que bactérias resistentes alcançassem locais remotos. Além disso, o relacionamento próximo de humanos, animais domésticos e de abate permitiu a transição desses patógenos resistentes em diferentes hospedeiros (ARIAS, CARRILHO, 2012; GILMORE *et al.*, 2014).

A sociedade tem buscado cada vez mais formas de diminuir os impactos causados pelas ações humanas no ecossistema planetário que, desde as revoluções industriais e avanços tecnológicos na agroindústria, foi desmatado e poluído desenfreadamente. Contudo, as mudanças climáticas, o esgotamento do solo e o desequilíbrio ecológico decorrentes da ação irresponsável da humanidade, colocam em risco não somente a produção de alimentos e criação de animais, como também a estabilidade do ecossistema global e a sobrevivência da população humana. Assim como outros setores, a agropecuária vem buscando formas sustentáveis de plantio e criação de animais.

No Brasil, com intuito de prevenir e mitigar os impactos, já visualizados, da resistência antimicrobiana, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em conjunto

com Ministério da Saúde e diversas outras secretárias, publicaram o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (PAN-BR-2018). Tal iniciativa vai ao encontro das ações da OMS, OIE e FAO. Além disso, normatiza, sempre que necessário, portarias restringindo uso de diversos antimicrobianos como promotores de crescimento animal que apresentam elevados índices de resistência bacteriana (Quadro 3). Foi colocado em discussão, inclusive por meio de uma consulta pública, uma maior restrição aos antimicrobianos pela veterinária.

**Quadro 3-** Normas de uso de antimicrobianos na pecuária brasileiras

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1, DE 13 DE JANEIRO DE 2020</b> -Proibir, em todo território nacional, a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de aditivos melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina, e tiamulina, classificados como importantes na medicina humana, na forma desta Instrução Normativa. |
| <b>INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 54, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2018</b> -Aprova o Regulamento Técnico para o registro de Aditivos Antimicrobianos Melhoradores de Desempenho e Aditivos Anticoccidianos administrados via alimentação animal.                                                                                                                         |
| <b>INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 45, DE 22 DE NOVEMBRO DE 2016</b> - Proíbe, em todo o território nacional, a importação e fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal, na forma desta Instrução Normativa.                                              |
| <b>INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 14, DE 17 DE MAIO DE 2012</b> - Proíbe em todo o território nacional a importação, fabricação e o uso das substâncias antimicrobianas espiramicina e eritromicina com finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal.                                                                          |

FONTE: Brasil, 2018.

A pecuária é um setor de grande importância socioeconômica para o Brasil. Em 2020, foi responsável por 30% do PIB (Cepea\CNA, 2020). Apesar disso, é também um dos maiores poluidores do meio ambiente devido à bovinocultura, suinocultura, entre outros. A quantidade de dejetos produzida e seu descarte e manejo incorreto são responsáveis pela poluição de solos, águas superficiais e subterrâneas, além da contaminação por patógenos provenientes dos dejetos.

Visando diminuir esse impacto, os agropecuaristas têm investido no uso de uma tecnologia ambiental que foi implementada no país em meados de 1960, quando também se iniciaram as discussões mundiais de ecodesenvolvimento, os sistemas de digestão anaeróbia de matéria orgânica, os biodigestores.

A aplicabilidade dos biofertilizantes produzido nos biodigestores possui incontáveis vantagens, desde o baixo custo à melhoria da qualidade da cultura. No entanto, faz se necessária uma avaliação de sua contaminação, visto que alguns estudos apontam a sobrevivência e permanência de patógenos significativos no efluente posterior à digestão anaeróbia (GUAN;

HOLLEY, 2003; DUCEY; RASHASH; SZOGI, 2019). Além disso, o uso de antimicrobianos na veterinária é inevitável, entretanto, estimativas apontam que de 40% a 80% desse uso seja desnecessário, com o agravante que o uso indiscriminado contribui para a resistência bacteriana (ARIAS, CARRILHO, 2012). Logo, se faz necessário o emprego de metodologias que permitam a identificação e a caracterização fenotípica e molecular desses microrganismos, auxiliando na caracterização para a comparação com os isolados, fontes de contaminação, rotas e mecanismos de transmissão, contribuindo para uma melhor vigilância sanitária ambiental.

Portanto, é de suma importância, que se identifique a microbiota encontrada em efluentes de fazendas de criação de animais, voltadas, principalmente, para a indústria alimentícia, caracterizando o seu potencial patogênico e perfil de resistência dos antimicrobianos. Essa abordagem possibilitaria o manejo e tratamento correto desse produto, eliminando potenciais patógenos e evitando a disseminação deles no ambiente que poderia provocar a contaminação de lavouras, de criações e da comunidade humana local. Isso poderia ocorrer visto que há uma integração de áreas ambientais, humanas e animais, essa é uma problemática que de ver pensada como Saúde Única- *One Health*.

### 3.12 *ONE HEALTH* NA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

O *One Health* surgiu pela necessidade de se integrar as grandes problemáticas que perpassam a saúde humana, animal e ambiental. O termo tem sido utilizado com frequência, principalmente, devido às grandes urgências globais relacionadas as mudanças climáticas, desmatamento, saturação de solo pela agropecuária, criação extensiva de animais, disseminação de doenças e globalização, que afetam a saúde planetária e colocam em risco a existência de todos. De acordo com Carneiro e Pettan-Brewer. (2021):

*One Health* é um conceito cientificamente estabelecido e validado de grande importância social que inicialmente emergiu do estudo integrado de zoonoses. Atualmente, abrange as interconexões entre saúde humana, animal, ambiental e plantas em uma abordagem interdisciplinar representada por um complexo sistema biológico e social, que envolve múltiplos atores e processos e suas interações ao longo do tempo a nível local, nacional e global. (CARNEIRO; PETTAN-BREWER., p.222, 2021)

Em 2008, a OMS, OIE e FAO propuseram uma iniciativa “Um mundo, uma saúde”, na qual é pontuada a inseparabilidade da saúde humana-animal-ambiental, e que medidas interdisciplinares e intersetoriais devem ser realizadas com objetivo de melhoria da saúde única planetária e do cumprimento da Agenda 2030 que visa ao desenvolvimento sustentável do mundo.

Uma das problemáticas que é abordada no âmbito do *One Health* é a resistência aos antimicrobianos, é uma das maiores preocupações da saúde pública mundial desde o século XX, a era atual é considerada por muitos pesquisadores como pós-antibiótica. O uso de antimicrobiano deve ser feito de forma cautelosa e precisa, entretanto, não é isso que tem ocorrido, principalmente, devido à grande demanda de proteína animal pelos consumidores. (COHEN, 1992; HANSSON, BRENTHEL, 2022)

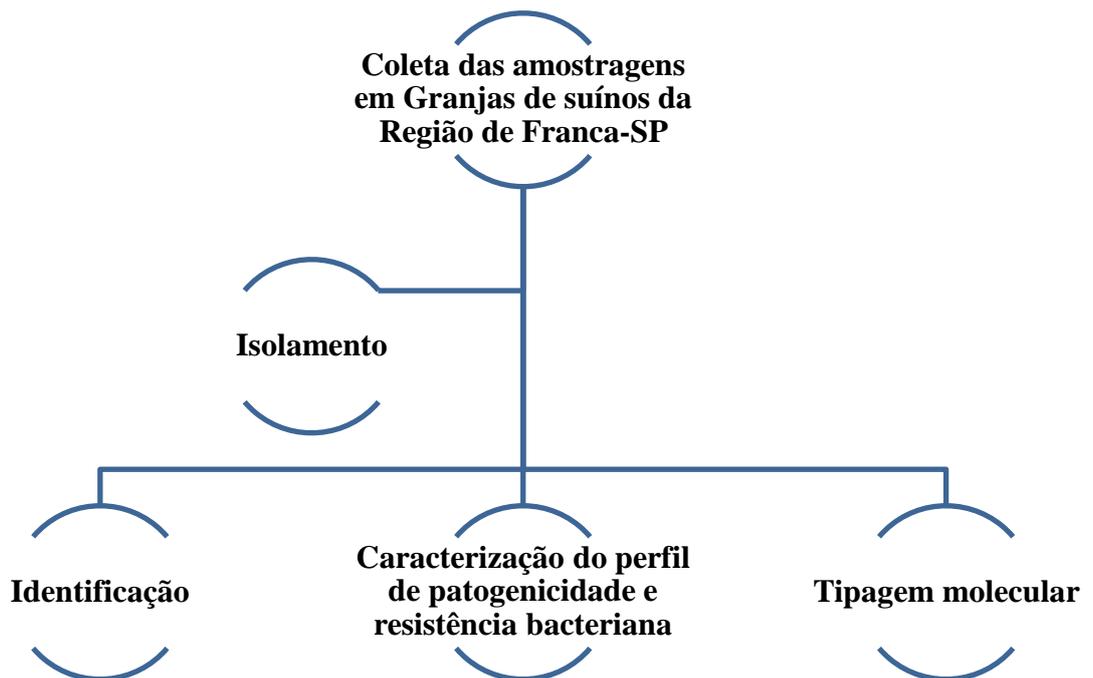
O uso de antimicrobianos para o bem-estar animal, como a promoção de crescimento e profilaxia, reduz as perdas do setor e, na agricultura, evita a ação dos fitopatógenos, também se estendeu o uso da terapia para animais de estimação que, além de cuidados, necessitam dos antimicrobianos para tratamentos de doenças e melhoramento da qualidade de vida (GILBERT et al. 2021; RHOUMA et al. 2022). Assim, a temática da resistência aos antimicrobianos, precisa ser pensada e ações devem ser tomadas em diversas áreas.

Portanto, discutir a questão dos antimicrobianos relativa à saúde única é o caminho mais adequado e sensato a ser tomado. Uma vez que esse tema é interdisciplinar e abrange diversos profissionais, é possível melhorar a vigilância epidemiológica e, conseqüentemente, a disponibilização de dados confiáveis para as tomadas de decisão que permitam mitigar os problemas derivados do uso indiscriminado dos antimicrobianos nas respectivas áreas de demanda.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular da UNAERP, em parceria com as granjas de suíno A e B, situadas na região metropolitana de Franca - SP, foi desenvolvido se acordo com as etapas apontadas na figura 8.

Figura 8- Fluxograma 1 metodologia geral da estudo, na qual aponta as etapas realizadas conforme com os resultados eram obtidos.



Fonte: Autora.

##### 4.1 BIODIGESTORES

As fazendas possuem biodigestores que utilizam o modelo Biodigestor de Lagoa Coberta de fluxo contínuo (BLC) ou modelo Canadense, como também é popularmente conhecido (Figura 9). Esse modelo é caracterizado por ser cavado no chão e impermeabilizado, possuindo uma base retangular, maior que sua largura, aumentando, assim, a superfície de exposição ao sol, o que auxilia na manutenção da temperatura e do processo de digestão anaeróbia.

Figura 9- Biodigestores- BLC de Fluxo contínuos tubulares-Modelo Canadense das Granja A<sub>1</sub>, Granja B<sub>1</sub> e lagoas de estabilização Granja A<sub>2</sub>, Granja B<sub>2</sub>.



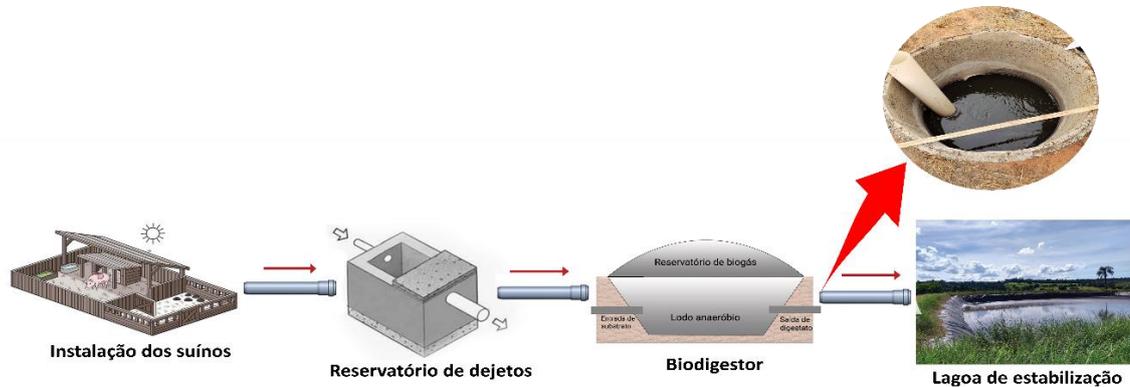
Fonte: fotos do acervo da autora, 2019 (A<sub>1,2</sub>) e 2020 (B<sub>1,2</sub>)

#### 4.2 COLETA DOS BIOFERTILIZANTES LÍQUIDOS

As coletas dos biofertilizantes foram realizadas em biodigestores, alimentados por dejetos suínos, em março de 2019 e em setembro de 2020, sendo a primeira coleta na Granja A e a segunda, na Granja B (Figura 11). O sistema de biodigestão dessas granjas eram compostos pela instalação dos suínos, reservatório dejetos, local para onde os dejetos eram lavados, e ao misturar com a água o estado do dejetos, antes semissólido, passava a ser líquido. E com auxílio de uma bomba os dejetos agora líquidos eram levados até o biodigestor por canos, após o processo de digestão anaeróbia, o efluente era depositado em uma lagoa de estabilização conforme pode ser observado na figura 10.

O intervalo de tempo entre as coletas da granja A e B deveu-se, primeiramente, à dificuldade de encontrar biodigestores na região e aos protocolos de biossegurança adotados pelos criadores de animais de abate para consumo durante a pandemia de COVID-19. Esses protocolos visavam evitar a exposição tanto dos pesquisadores, quanto dos colaboradores das fazendas. Assim, as amostras foram obtidas em locais e intervalos de tempo distintos, sendo a coleta realizada de acordo com manual de amostragem de biodigestores de Kunz e Palhares (2004).

Figura 10- Ilustração do sistema de biodigestão das granjas indicando o ponto do sistema, o qual foi realizada a coleta. Esse sistema de biodigestão contém: Instalação dos suínos, reservatório dos dejetos animais, Biodigestor e a Lagoa de estabilização.



Fonte: Autora.

O período de coleta foi delimitado de acordo com a retenção hidráulica necessária para a produção do subproduto da biodigestão, o biofertilizante. No entanto, o sistema contínuo de biodigestão libera diariamente os produtos da biodigestão, facilitando as coletas. Estas foram realizadas em três subamostragens, espaçadas em intervalos de 5 min, tomando-se um volume de 50 mL empregando tubos cônicos esterilizados tipos Falcon (Figura 11). Posteriormente, as amostras coletadas foram homogêneas, formando um *pool* único, e despejadas em frascos devidamente esterilizados. Em seguida, foram acondicionadas sob refrigeração para transporte e posterior análise.

Os frascos esterilizados e utilizados na coleta sofreram tríplice lavagem com a própria amostra coletada. As amostras foram colocadas nos frascos de forma a completá-los e isto evitou a perda de gases. Em seguida os frascos foram bem fechados e rotulados com informações claras de sua origem, local e data de coleta e a identificação do responsável pela coleta.

Figura 11- Coletas de Biofertilizantes Granja A: A<sub>1</sub>: lavagem do recipiente coleta com biofertilizante, A<sub>2</sub>: coleta de três amostras de 50 mL de biofertilizante a cada 5 minutos e A<sub>3</sub>: mistura do *pool*, armazenamento em recipiente esterilizado com e sem meios de cultura. Granja B: B<sub>1</sub>: lavagem do recipiente coleta com biofertilizante, B<sub>2</sub>: coleta de três amostras de 50 mL de biofertilizante a cada 5 minutos B<sub>3</sub>: armazenamento em recipiente esterilizado com e sem meios de cultura



Fonte: Autora, 2019(A<sub>1,2,3</sub>) e 2020 (B<sub>1,2,3</sub>)

No traslado do local de coleta ao laboratório, o frasco foi mantido sob refrigeração e longe da exposição solar para se evitar a degradação dos microrganismos presentes. Após as coletas, foi realizado o isolamento, identificação e caracterização das bactérias presentes nas amostras.

#### 4.3 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

Para realização do isolamento e identificação das bactérias presentes nas amostras dos biofertilizantes, foram feitas diluições seriadas dos biofertilizantes e semeadura por espalhamento (*spread plate*) em diferentes tipos de meios de cultura. As diluições seriadas ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ) foram feitas em solução fisiológica (NaCl 0,9% massa/volume), em tubos tipo *Eppendorf* de 1,5 mL. Posteriormente, com auxílio de uma micropipeta, foram inoculados 100  $\mu$ L das diluições em meios de cultura, que foram espalhados com alça de Drigalski, realizando semeadura por inundação (Figura 12) (BUCK; CLEVERDON, 1960).

Figura 12- Isolamento de bactérias por diluição seriada e *spread plate*



Fonte: Autora

Os meios de cultura utilizados foram Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), Ágar Sal Manitol (MAN), Ágar Maconkey (MC), Ágar tioglicolato (TIO) e Ágar Mueller Hinton (MH), acrescentado de um antibiótico carbapenêmico, como imipenem. Este atua como meio de cultura que foi adaptado no próprio laboratório, com a finalidade de selecionar bactérias resistentes aos antibióticos carbapenêmicos, muito utilizados no combate às infecções bacterianas (Figura 13).

Após semeadura, as placas foram transferidas para estufas de aerobiose e anaerobiose (10% de CO<sub>2</sub>) e incubadas por um intervalo de tempo de 18 a 24h a 37 °C. Após esse período, foram observadas as unidades formadoras de colônia (UFCs) em seus respectivos meios e, em seguida, foram selecionadas de seis a dez UFCs semelhantes de cada meio/placa, de acordo com a morfologia da colônia. Após a seleção das colônias, elas foram novamente inoculadas com auxílio da agulha de uma alça descartável de 10 µl em novos meios de cultura MH para o isolamento de cada colônia, com a finalidade de se obter culturas puras.

Em seguida, as placas foram incubadas nas mesmas condições e, no dia seguinte, após confirmação da pureza, as culturas bacterianas foram semeadas e estocadas em criotubos contendo 2 mL de *Brain Heart Infusion* (BHI), acrescidos de 15% glicerol e em 2 mL de caldo Tioglicolato com 15% de glicerol, para as cepas crescidas em condições de anaerobiose e, posteriormente, armazenadas em freezer -80 °C (Figura 14). Sempre que necessário, para os experimentos deste estudo, os isolados foram reativados em meio contendo 4,5 mL de BHI líquido e incubados na estufa a 37°C por 24 h.

Figura 13- Crescimento de culturas puras em Agar MH (A), Tioglicolato (B), EMB (C) e McConkey (D)



Fonte: Autora

Figura 14- Frasco com BHI, acrescido de 15% Glicerol, Criotubos para estocar os isolados e caixa de armazenamento



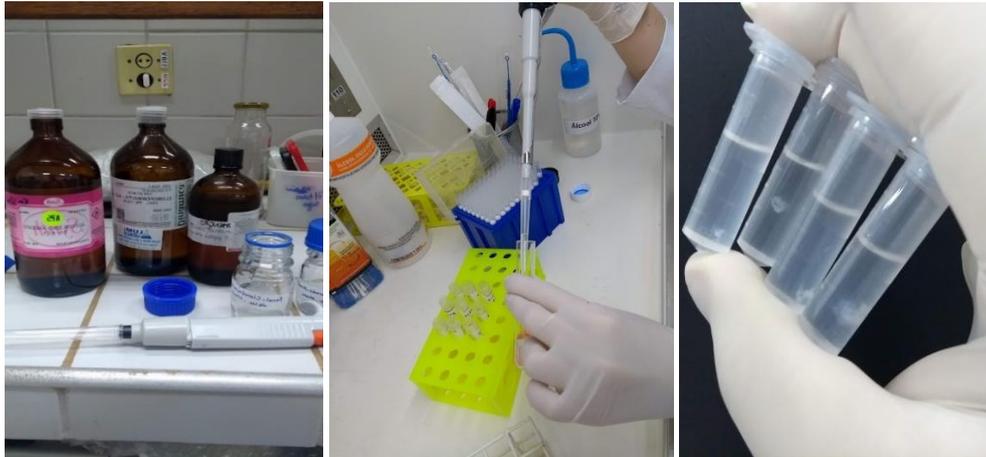
Fonte: Autora

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

##### 4.4.1 Extração do DNA Genômico

Após o isolamento das bactérias, o DNA genômico de cada isolado bacteriano foi extraído para ser utilizado como molde nas reações de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). A extração do DNA genômico foi realizada pelo método Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico, segundo Covone *et al.* (1998) (Figura 15). Após a extração, a concentração e a pureza do DNA genômico foram determinadas por análise espectrofotométrica empregando os comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 260 e 280 nm. As extrações de DNA obtidas com razão entre 1,6 e 1,9 foram consideradas de boa qualidade devido ao baixo nível de impurezas (proteínas e RNAs).

Figura 15- Extração de DNA genômico pelo método Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico



Fontes: Autora

#### 4.4.2 Identificação dos isolados bacterianos

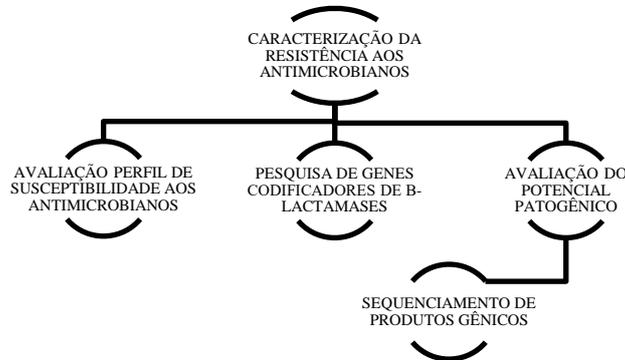
A identificação dos isolados bacterianos foi realizada em parceria com a EMBRAPA Tabuleiros Costeiros, localizada em Aracaju - SE, pela técnica de MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*), determinando-se a massa molecular das proteínas ribossomais (< 500000 Dalton) por um pulso de laser 260-337 nm (KARAS; HILLENKAMP, 1988).

Para o envio dos isolados bacterianos e posterior identificação, as cepas foram reativadas em BHI e semeadas em Ágar MH. Após verificar o crescimento e a pureza, com o auxílio da alça de 10  $\mu$ l, foi realizada uma raspagem da cultura, que foi transferida para um tubo tipo *Eppendorf* de 1,5 mL, o qual foi submetido ao vórtex durante 30 s. Em seguida, foram acrescentados 900  $\mu$ L de etanol ao tubo, que foi novamente agitado em vórtex para homogeneização, formando uma suspensão etanólica.

A confirmação de alguns dos isolados foi realizada utilizando a técnica de biologia molecular pelo sequenciamento de parte do gene 16S do rRNA, por se tratar de uma região conservada e, portanto, espécie-específica. Primeiramente, na amplificação do gene foi realizada a técnica de PCR, empregando os iniciadores fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') e rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT - 3'), segundo descrito por Weisburg *et al.* (1991). Em seguida, os *amplicons* foram purificados e sequenciados, para que sua sequência fosse comparada por meio do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a todas as sequências disponíveis no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Figura 16- Fluxograma 2 Caracterização da resistência antimicrobianos e perfil de patogenicidade.



Fonte: Autora

### 4.5.1 Avaliação perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados pelo método de disco-difusão em Ágar Mueller Hinton (Oxoid), em concordância com as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021) e com o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2021), utilizando diferentes discos impregnados com antimicrobianos recomendados para cada espécie bacteriana identificada. Os critérios para interpretação dos halos de inibição respeitaram os *breakpoints* estipulados também pelo CLSI e EUCAST (2021). Os isolados foram considerados susceptíveis ou não susceptíveis (isolados resistentes ou com resistência intermediária) aos antimicrobianos. As linhagens *E. coli* ATCC 25922 e ATCC 35218, e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram utilizadas como controles deste experimento.

O CLSI preconiza que os teste de susceptibilidade à vancomicina sejam realizados pelo método de microdiluição. Portanto, todos os isolados foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por esse método conforme descrito por Zeng *et al.* (2022). Nesse teste, foram considerados resistentes à Vancomicina os isolados que apresentaram CIM a partir de 32 µg/mL (CLSI, 2021)

Com base nos resultados dos antibiogramas, os isolados bacterianos foram classificados como multirresistente (MDR) quando apresentassem não-susceptibilidade para um ou mais antimicrobianos em três ou mais classes.

### 4.5.2 Pesquisa de genes de resistência

Todos os isolados bacterianos foram submetidos a reações de PCR para detecção dos genes codificadores de β-lactamases. A metodologia foi executada de acordo com a literatura

descrita por Pitout *et al.* (2005), Dallenne *et al.* (2010), Peirano *et al.* (2011) e Doyle *et al.* (2012) (Tabela 2). Foram pesquisados genes responsáveis pelo fenótipo de  $\beta$ -lactamases, incluindo as carbapenemases, apontados na tabela.

Tabela 2- Genes codificadores de resistência produtores de  $\beta$ -lactamases e outros

| Genes                            | Produto (pb) | Temp. de pareamento(°C) | Primers (5'-3') F/R                               | Referência                    |
|----------------------------------|--------------|-------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>bla<sub>KPC</sub></i>         | 538          | 55                      | CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC<br>ACGACGGCATAGTCATTTGC    | Dallenne <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>bla<sub>IMP</sub></i>         | 587          | 54                      | CTCAGTGCTCTACAGAAAACC<br>GAAGGCGTTTATGTTTCATAC    | Pitout <i>et al.</i> , 2005   |
| <i>bla<sub>NDM</sub></i>         | 782          | 65*                     | GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC<br>GGTCGCGAAGCTGAGCACCGCAT | Peirano <i>et al.</i> , 2011  |
| <i>bla<sub>VIM</sub></i>         | 389          | 58                      | GTTTGGTTCGCATATCGCAAC<br>AATGCGCAGCACCAGGATAG     | Pitout <i>et al.</i> , 2005   |
| <i>bla<sub>CTX-M-Gp1</sub></i>   | 688          | 60                      | TTAGGAARTGTGCCGCTGYA<br>CGATATCGTTGGTGGTRCCAT     | Dallenne <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>bla<sub>CTX-M-Gp2</sub></i>   | 404          | 57*                     | CGTTAACGGCACGATGAC<br>CGATATCGTTGGTGGTRCCAT       | Dallenne <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>bla<sub>CTX-M-G8</sub></i>    | 326          | 60                      | AACRCRCAGACGCTCTAC<br>TCGAGCCGGAASGTGYAT          | Dallenne <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>bla<sub>CTX-M-Gp9</sub></i>   | 561          | 57                      | TCAAGCCTGCCGATCTGGT<br>TGATTCTCGCCGCTGAAG         | Dallenne <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>bla<sub>OXA-48-like</sub></i> | 281          | 57                      | GCTTGATCGCCCTCGATT<br>GATTTGCTCCGTGGCCGAAA        | Dallenne <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>bla<sub>OXA-58</sub></i>      | 934          | 52                      | TTATCAAAAATCCAATCGGC                              | Frech e Schwarz, 2000         |
| <i>tet(G)</i>                    | 1141         | 56                      | CTGCTGATCGTGGGTCT<br>TTGCGAATGGTCTGCGT            | Kikui <i>et al.</i> , 2007    |
| <i>catA1</i>                     | 551          | 50                      | GGCATTTCAGTCAGTTG<br>CATTAAGCATTCTGCCG            | Jensen, <i>et al.</i> , 2006  |
| <i>aac(3)IVa</i>                 | 627          | 57                      | GTGTGCTGCTGGTCCACAGC<br>AGTTGACCCAGGGCTGTGCG      | Jensen, <i>et al.</i> , 2006  |
| <i>aph(3)Ia</i>                  | 669          | 59                      | AACGTCTTGCTCGAGGCCGCG<br>GGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGC | Brisola <i>et al.</i> 2019    |
| <i>qnrB</i>                      | 469          | 53                      | GATCGTGAAAGCCAGAAAGG<br>ACGATGCCTGGTAGTTGTCC      | Frech e Schwarz, 2000         |

Fonte: Autora.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PATOGENICO

A caracterização da patogenicidade dos isolados foi realizada a partir da identificação de genes de virulência. Para isso, foram utilizados pares de *primers* específicos encontrados na literatura, específicos para Enterobactérias e para os *Enterococcus* (Tabela 3, 4 e 5). Os genes foram amplificados por PCR, seguida de eletroforese horizontal em gel de agarose 1% e fotodocumentação (L-PIX TOUCH 20×20) para visualizar a presença ou ausência das bandas correspondente aos mesmos.

Tabela 3- Primers utilizados no presente estudo para investigação de genes de virulência por PCR

(continua)

| Gene                | Fenótipo                                 | Primers (5'-3', F/R)                                     | Pareamento (°C) | Prod. (pb) | Referência                       |
|---------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------|------------|----------------------------------|
| <i>rmpA</i>         | <i>regulator of the mucoid phenotype</i> | ACTGGGCTACCTCTGCTTCACTTGCATGAGCCA<br>TCTTCA              | 53              | 536        | Yu et al. (2007)                 |
| <i>Aerobactin 2</i> | <i>Siderophore</i>                       | CTGTCGGCATCGGTTTTATTGGCGTGTGATTA<br>TTACCA               | 53              | 531        | Yu et al. (2008)                 |
| <i>kfu</i>          | <i>Iron uptake system</i>                | GAAGTGACGCTGTTTCTGGC<br>TTTCGTGTGGCCAGTGACTC             | 57              | 797        | Ma et al. (2005)                 |
| <i>Kfu 2</i>        | <i>Iron uptake system</i>                | ATAGTAGGCGAGCACCGAGA<br>AGAACCCTCCTCGCTGAACA             | 55              | 520        | Yu et al. (2008)                 |
| <i>allS</i>         | <i>allantoin metabolism</i>              | CCGAAACATTACGCACCTTT<br>ATCACGAAGAGCCAGGTAC              | 57              | 508        | Yu et al. (2008)                 |
| <i>fimH-1</i>       | <i>type 1 adhesins</i>                   | ATGAACGCCTGGTCCTTTGC<br>GCTGAACGCCTATCCCCTGC             | 55              | 688        | Fertas-Aissani et al.<br>(2012)  |
| <i>fimA</i>         | <i>type 1 adhesins</i>                   | CGGACGGTACGCTGTATTT<br>GCTTCGGCGTTGTCTTTATC              | 62              | 500        | Alcántar-Curiel et<br>al. (2013) |
| <i>mrkD</i>         | <i>type 3 adhesins</i>                   | CCACCAACTATTCCTCGAA<br>ATGGAACCCACATCGACATT              | 52              | 240        | Sahly et al. (2008)              |
| <i>mrkA</i>         | <i>type 3 adhesins</i>                   | CGGTAAAGTTACCGACGTATCTTGTACTG<br>GCTGTAAACCACCCGGTGGTAAC | 62              | 498        | Alcántar-Curiel et<br>al. (2013) |
| <i>kpn</i>          | <i>FimH-like adhesin</i>                 | GTATGACTCGGGGAAGATTA<br>CAGAAGCAGCCACCACACG              | 55              | 626        | Fertas-Aissani et al.<br>(2012)  |
| <i>ecpA</i>         | <i>E. coli common pillus</i>             | GCAACAGCCAAAAAAGACACC<br>CCAGGTCGCGTCAACTG               | 62              | 477        | Alcántar-Curiel et<br>al. (2013) |

Tabela 3- Primers utilizados no presente estudo para investigação de genes de virulência por PCR

(Conclusão)

| Gene         | Fenótipo                                                      | Primers (5'-3', F/R)                                   | Pareamento (°C) | Prod. (pb) | Referência                         |
|--------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------|------------|------------------------------------|
| <i>ycfM</i>  | <i>outer membrane lipoprotein</i>                             | ATCAGCAGTCGGGTCAGC<br>CTTCTCCAGCATTTCAGCG              | 55              | 160        | Fertas-Aissani et al.<br>(2012)    |
| <i>entB</i>  | <i>enterobactin biosynthesis</i>                              | ATTTCTCAACTTCTGGGGC<br>AGCATCGGTGGCGGTGGTCA            | 57              | 371        | Fertas-Aissani et al.<br>(2012)    |
| <i>iutA</i>  | <i>aerobactin receptor</i>                                    | GGCTGGACATCATGGGAAGTGG<br>CGTCGGGAACGGGTAGAAATCG       | 63              | 300        | Mamlouk et al<br>(2006)            |
| <i>Irp-1</i> | <i>yersiniabactin biosynthesis</i>                            | TGAATCGCGGGTGTCTTATGC<br>TCCCTCAATAAAGCCCACGCT         | 57              | 238        | Schubert <i>et al.</i> ,<br>(2000) |
| <i>Irp-2</i> | <i>yersiniabactin biosynthesis</i>                            | AAGGATTCGCTGTTACCGGAC<br>TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT         | 57              | 287        | Schubert <i>et al.</i> ,<br>(2000) |
| <i>ybtS</i>  | <i>yersiniabactin biosynthesis</i>                            | AGTGGTGCGTTCTGCGTC<br>ATTTCTACATCTGGCGTTA              | 50              | 477        | Fertas-Aissani et al.<br>(2012)    |
| <i>fyuA</i>  | <i>yersiniabactin receptor</i>                                | GCGACGGGAAGCGATGATTTA<br>TAAATGCCAGGTCAGGTCAGT         | 56              | 547        | Schubert <i>et al.</i> ,<br>(2000) |
| <i>iroN</i>  | <i>catecholate siderophores receptor</i>                      | AAGTCAAAGCAGGGTTGCCCG<br>GACGCCGACATTAAGACGCAG         | 63              | 665        | Mamlouk et al,<br>(2006)           |
| <i>traT</i>  | <i>serum resistance-associated outer membrane lipoprotein</i> | GGTGTGGTGCGATGAGCACAG<br>CACGGTTCAGCCATCCCTGAG         | 63              | 290        | Mamlouk et al,<br>(2006)           |
| <i>rmpA</i>  | <i>regulator of mucoid phenotype A</i>                        | ACTGGGCTACCTCTGCTTCA<br>CTTGCATGAGCCATCTTTCA           | 50              | 535        | Yeh <i>et al.</i> , (2007)         |
| <i>magA</i>  | <i>mucoviscosity-associated gene A</i>                        | GGTGCTCTTTACATCATTGC<br>GCAATGGCCATTTGCGTTAG           | 59              | 1282       | Turton <i>et al.</i> , (2008)      |
| <i>hlyA</i>  | <i>α-hemolysin</i>                                            | AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT<br>ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA | 63              | 1177       | Mamlouk et al,<br>(2006)           |
| <i>Cnf-1</i> | <i>cytotoxic necrotizing factor-1</i>                         | AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG<br>CATTTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT  | 56              | 498        | Mamlouk et al,<br>(2006)           |
| <i>rmpA</i>  | <i>regulator of mucoid phenotype A</i>                        | ACTGGGCTACCTCTGCTTCA<br>CTTGCATGAGCCATCTTTCA           | 50              | 535        | Yeh <i>et al.</i> , (2007)         |

Fonte: Autora.

Tabela 4- Genes pesquisados e sequência de iniciadores para patotigem de *E.coli*

| Genes           | Sequencia iniciadores                                     | Referência                    |
|-----------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>AA probe</i> | CTGGCGAAAGACTGTATC AT<br>CAATGTATAGAAATCCGCTGTT           | Cerna <i>et al.</i> (2003)    |
| <i>aaiC</i>     | TGGTGACTIONTTGATGGACATTGT<br>GACACTCTCTTCTGGGGTAAACGA     | Lima <i>et al.</i> (2013)     |
| <i>aap</i>      | CTTGGGTATCAGCCTGAA TG<br>AACCCATTCGGTTAGAGCA              | Cerna <i>et al.</i> (2003)    |
| <i>aatA</i>     | CTGGCGAAAGACTGTATCAT<br>CAATGTATAGAAATCCGCTGTT            | Andrade <i>et al.</i> (2014)  |
| <i>aggR</i>     | CTAATTGTACAATCGATGTA<br>AGAGTCCATCTTTTGATAAG              | Cerna <i>et al.</i> (2003)    |
| <i>bfpA</i>     | AATGGTGCTTGCCTTGCTGC<br>GCCGCTTTATCCAACCTGGTA             | Aranda <i>et al.</i> (2007)   |
| <i>eae</i>      | CTGAACGGCGATTACGCGAA<br>CGAGACGATACGATCCAG                | Aranda <i>et al.</i> (2007)   |
| <i>ehxA</i>     | GCATCATCAAGCGTACGTTCC<br>AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT           | Paton & Paton (1998)          |
| <i>elt</i>      | GGCGACAGATTATACCGTGC<br>CGGTCTCTATATCCCTGTT               | Aranda <i>et al.</i> (2007)   |
| <i>estA</i>     | TCTGTATTATCTTTCCCCTC<br>ATAACATCCAGCACAGGC                | Schultsz <i>et al.</i> (1994) |
| <i>estB</i>     | CCCTCAGGATGCTAAACCAG<br>TTAATAGCACCCGGTACAAGC             | Schultsz <i>et al.</i> (1994) |
| <i>ipaH</i>     | G TTCCTTGACCGCTTTCCGATACCGTC<br>GCCGGTCAGCCACCTCTGAGAGTAC | Aranda <i>et al.</i> (2007)   |
| <i>stx1</i>     | ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC<br>AGAACGCCCACTGAGATCATC          | Paton & Paton (1998)          |
| <i>stx2</i>     | GGCACTGTCTGAAACTGCTCC<br>TCGCCAGTTATCTGACATTCTG           | Paton & Paton (1998)          |

Fonte: Autora.

Tabela 5- Genes de virulência de *Enterococcus* pesquisados, primers e tamanho dos produtos de PCR amplificados.

(continua)

| Gene (produto)    | Priers (F/R)                                          | Temp. Pareamento (°C) | Produto amplificado (pb) | Referência                           |
|-------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| <i>Ace</i>        | AAAGTAGAATTAGATCACAC<br>TCTATCACATTCGGTTGCG           | 56                    | 320                      | Zoletti <i>et al.</i> , 2011         |
| <i>Asa</i>        | CCAGCCAACCTATGGCGGACTAC<br>CTGGGTGTGATCCGCTGTTA       | 58                    | 619                      | Barbosa-Ribeiro <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>cylA</i>       | TGGATGATAGTGATAGGAAGT<br>GCTGCTAAAGCTGCGCTTAC         | 58                    | 688                      | Barbosa-Ribeiro <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>cylB</i>       | GGAGAATTAGTGTTTAGAGCG<br>GCTTCATAACCATTGTTACTATAGAAAC | 52                    | 522                      | McBride <i>et al.</i> , 2007         |
| <i>cylM</i>       | AAGATTGTCTGTGCCATGGA<br>TACTCACTTCCGGCAACCTT          | 52                    | 159                      | McBride <i>et al.</i> , 2007         |
| <i>cylLL</i>      | GATGGAGGGTAAGAATTATGG<br>GCTTCACCTCACTAAGTTTATAG      | 52                    | 253                      | Hallgren <i>et al.</i> , 2009        |
| <i>cylLS</i>      | TGCTAAATAAGGAAAATCAAG<br>CCTAAGCCTATGGTAAAACA         | 52                    | 157                      | Hallgren <i>et al.</i> , 2009        |
| <i>efaA</i>       | CTGGAGAAAGAAATGGAGGA<br>CTACTAACACGTCACCAATG          | 56                    | 499                      | Zoletti <i>et al.</i> , 2011         |
| <i>Esp</i>        | TTGCTAATGCTAGTCCACGACC<br>GCGTCAACACTTGCATTGCCGA      | 56                    | 932                      | Zoletti <i>et al.</i> , 2011         |
| <i>gelE</i>       | ACCCCGTATCATTGGTTT<br>ACGCATTGCTTTTCCATC              | 56                    | 405                      | Zoletti <i>et al.</i> , 2011         |
| <i>gls24-like</i> | GCATTAGATGAGATTGATGGTC<br>GCGAGGTTACAGTTTCTTC         | 52                    | 446                      | McBride <i>et al.</i> , 2007         |

Tabela 5- Genes de virulência de *Enterococcus* pesquisados, primers e tamanho dos produtos de PCR amplificados.

(conclusão)

| Gene (produto)        | Priers (F/R)                                                   | Temp. Anelamento (°C) | Produto amplificado pb) | Referência           |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|
| <i>nuc-1</i>          | GTGAAAAGAAGTFACTGAAAATGTTACTC<br>GCGTTTTTTGTAGTAATGTTCCATCTACG | 52                    | 332                     | McBride et al., 2007 |
| <i>psaA</i>           | CTATTTTGCAGCAAGTGATG<br>CGCATAGTAACTATCACCATCTTG               | 52                    | 540                     | McBride et al., 2007 |
| <i>Cbh</i>            | CTCATAGGATCCATCACCACATCAC<br>TGGCTGGAATTCACITTTTCAGGCTAT       | 52                    | 580                     | Zoletti et al., 2011 |
| <i>ef1841/fsrC</i>    | GATCAAGAAGGGAAGCCACC<br>CCAACCGTGCTCTTCTGGA                    | 56                    | 1050                    | Zoletti et al., 2011 |
| <i>Agg</i>            | AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC<br>AAACGGCAAGACAAGTAAATA                 | 56                    | 1553                    | Zoletti et al., 2011 |
| <i>cpsB5/hcp1</i>     | CCAGGACATGGTGGTATTTTAGATC<br>CGCCAATAAACAATCTTACCAGAGC         | 52                    | 950                     | McBride et al., 2007 |
| <i>cpsEend/59cpsG</i> | GAACCTACAACAATTAATAAAGC<br>GCATAGTATGTTAAGATTGATCCA            | 52                    | 1098/199                | McBride et al., 2007 |

Fonte: Autora

#### 4.7 SEQUENCIAMENTO DE MATERIAL GENÉTICOS

Para a confirmação da identidade dos produtos gênicos de virulência e resistência amplificados por PCR, foi selecionado um exemplar de cada gene amplificado para sequenciamento, realizado no sequenciador ABI 3500XLGeneticAnalyser (*Applied Biosystems*). As sequências obtidas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos por meio do programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para comparação com sequências homólogas, depositadas no banco mundial de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). As sequências confirmadas foram depositadas no GenBank.

#### 4.8 TIPAGEM MOLECULAR

A relação genética entre os isolados bacterianos foi realizada pela técnica de *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR* (ERIC-PCR), que detecta sequências de genes repetidas e conservadas no genoma bacteriano. O conjunto dessas sequências permite relacionar as cepas com maiores similaridades genéticas, auxiliando na investigação da relação genética entre os isolados bacterianos (GILLINGS, 1991; HOLLEY, 1997).

As reações de PCR foram realizadas segundo Versalovic *et al.* (1991), utilizando 0,5 µL da enzima TaKaRa Ex Taq DNA polimerase (5 U/µL) (Takara, Japão) e seus respectivos produtos diluídos em 10x: 2,5 µL de Buffer, 2,5 µL de dNTPs (2,5 mmol/L), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 1 µL de cada primer (100 mmol /L) (F: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-

3'e R: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), 1 µL da amostra de DNA e adição de água ultrapura para atingir volume final de 25 µL. Todas as reações de PCR foram realizadas de acordo com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min e 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 54 °C por 1 min e 72 °C por 5 min, seguido por uma extensão final de 72°C por 10 min.

Após as reações, os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x, em corrida de eletroforese por 140 min a 60 V e, em seguida, corados com brometo de etídio. O marcador utilizado foi 1 Kb DNA Lader (*Invitrogen*, Brasil). Um dendrograma de similaridade genética foi construído utilizando o *software* Bionumerics 7.5 (*Applied Math*), por meio de uma análise de matriz de similaridade, gerada a partir das bandas amplificadas para os diferentes isolados, com a utilização do algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*) e coeficiente de similaridade DICE, com 1% de tolerância.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

O método de tratamento de dejetos por digestão anaeróbia tem sido apontado como uma importante tecnologia ambiental e econômica nos tratamentos de dejetos, uma vez que, além de diminuir o impacto dos dejetos animais, transformando a biomassa em biogás e fertilizante, também diminui a presença de microrganismos patogênicos no efluente da biodigestão.

No entanto, a eficiência do processo depende de diversas características que vão além das condições estruturais do biodigestor, como as condições físico-químicas dos dejetos, principalmente, a quantidade água, como também do manejo correto dos animais, uso de antimicrobianos, desinfetantes, inseticidas, probióticos, água acrescida de cloro, ou seja, todo o ciclo da suinocultura. Tais aspectos impactam diretamente na microbiota presente no efluente, que pode ser intoxicada e perder a viabilidade (RIZZONI *et al.*, 2012, SARTO *et al.*, 2017).

Há também de se ponderar que o sucesso da biodigestão é influenciado pelo equilíbrio populacional de *Archaea* metanogênicas, que são produtoras de gás metano, e que dependem de ácidos orgânicos, produzidos pelas bactérias acidogênicas, sendo que essa produção ocorre de acordo com a demanda de sólidos orgânicos adentrados no sistema. Assim, a biodigestão se torna eficiente em reduzir patógenos devido ao tempo de retenção da biomassa em anaerobiose, desativando alguns dos principais patógenos de importância para a saúde pública (Tabela 1). Apesar da desativação de muitos microrganismos, devido a alterações de fatores ambientais e da competição entre os microrganismos dentro do sistema, pode ocorrer a sobrevivência de alguns que ainda conseguem permanecer viáveis e voltar a se multiplicar no efluente final, principalmente, quando há lagoas de estabilização (GUAN, HOLLEY, 2003; DUCEY; RASHASH; SZOGI, 2019; MEERSCHKE *et al.* 2020; SHI *et al.*, 2021).

No atual estudo, foram identificados 125 isolados bacterianos de efluentes de biodigestão de duas granjas de suínos distintas, os quais foram divididos em três grupos, a fim de facilitar a caracterização, estudo e análise, sendo a maioria das espécies bacterianas pertencente à família *Enterobacteriaceae* (Tabela 5) e do gênero *Enterococcus* (Tabela 4 e 6).

Estudos como os de Silva *et al.* (2014), Ducey; Rashash; Szogi (2019), Zhan *et al.* (2021) relacionados a análises amostrais de sistemas de biodigestão, identificam a comunidade bacteriana e *Archaea* presentes ao longo do sistema, resíduos antimicrobianos e genes de resistência presentes. No entanto, em tais análises, não são investigados a fundo, a quais gêneros-espécies, os genes detectados pertencem, também não sendo possível a identificação espécie-específica, de acordo com métodos utilizados, dificultando a caracterização e

identificação de patógenos potenciais residuais em efluentes de biodigestão. Estes podem ser multirresistentes a antimicrobianos e carreadores de genes de resistência, logo, a identificação, caracterização e análises dos isolados, de maneira minuciosa, é de extrema necessidade.

No grupo das *Enterobacteriaceae*, foram identificados 28 isolados da espécie *Escherichia coli*, dois isolados *Klebsiella pneumoniae* e um isolado *Klebsiella aerogenes*, totalizando 31 Enterobactérias (Apêndice 5). No grupo *Enterococcus*, foram identificados 66 isolados *Enterococcus* de oito espécies distintas: *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* e *E. pseudoavium* (Apêndice 6). Por fim, foram identificadas 28 bactérias de dez diferentes espécies, agrupadas em grupo Diversos, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6- Espécies identificadas pelo MALDI-TOF

| Grupo                     | Espécies                          | Isolados                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Escherichia coli</i>           | M4-KA*, M5-EC*, M7-EC, M8-EC, M10-EC, M12-EC, M13-EC, M15-EC, M16-EC, M18-EC, M19-EC, M20-EC, M21-EC, M22-EC, M23-EC, M24-EC, M25-EC, M26-EC, M28-EC, M29-EC, M30-EC, M31-EC, M32-EC, M33-EC, M34-EC, M35-EC, M36-EC, M131-EC, M148-EC, M156-KP*, M157-KP (n= 31)                                                                                                                            |
|                           | <i>Klebsiella aerogene</i>        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                           | <i>Klebsiella pneumoniae</i>      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <i>Enterococcaceae</i>    | <i>Enterococcus avium</i>         | M57, M61, M62, M63, M64, M65, M66, M70, M74, M80, M81, M82, M84, M88, M89, M90, M91, M92, M94, M95, M96, M98; M104, M106, M107, M115, M117, M118, M119, M120, M121, M122, M123, M124, M125, M126, M127, M128, M129, M130, M132, M133, M136, M137, M138, M139, M140, M143, M145, M146, M149, M151, M152, M153, M154, M155, M158, M160, M161, M162, M163, M165, M166, M167, M170, M171. (n=66) |
|                           | <i>Enterococcus casseliflavus</i> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                           | <i>Enterococcus durans</i>        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                           | <i>Enterococcus faecalis</i>      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                           | <i>Enterococcus faecium</i>       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                           | <i>Enterococcus hirae</i>         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                           | <i>Enterococcus pseudoavium</i>   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Diversos                  | <i>Bhargavaea ginsengi</i>        | M41, M42, M43, M51, M52, M60, M67, M68, M69, M71, M75, M77, M78, M83, M87, M93, M97, M102, M108, M109, M110, M111, M141, M144, M147, M164, M168, M169. (n=28)                                                                                                                                                                                                                                |
|                           | <i>Kurthia gibsonii</i>           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                           | <i>Kurthia huakuii</i>            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                           | <i>Lactobacillus brevis</i>       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                           | <i>Lactococcus garvieae</i>       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                           | <i>Lactococcus lactis</i>         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                           | <i>Pediococcus pentosaceus</i>    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                           | <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                           | <i>Weissella cibaria</i>          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <i>Weissella confusa</i>  |                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

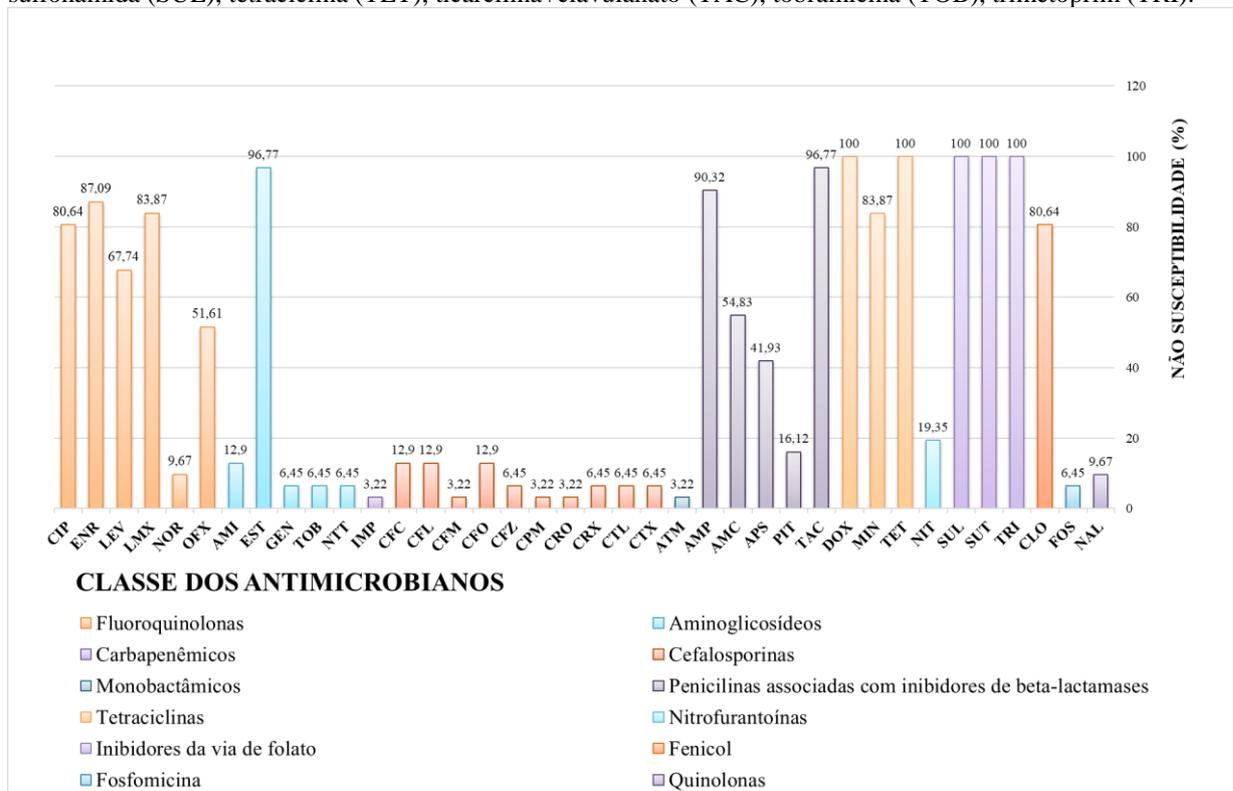
Fonte: autora. \*KA- *Klebsiella aerogenes*; KP- *Klebsiella pneumoniae*; EC- *Escherichia coli*

## 5.2 ENTEROBACTÉRIAS

A Figura 16 mostra a frequência em porcentagem da susceptibilidade para cada um dos antimicrobianos pesquisados, para esses testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, para as

enterobactérias, foram testados 42 diferentes antimicrobianos pertencentes a 12 classes distintas, de acordo com *CLSI* e *EUCAST* (2021). Convém salientar que, das 31 enterobactérias isoladas, todas foram classificadas como multirresistentes (MDR) (Figura 17, Tabela 7- Apêndice 1).

Figura 17- Frequência de não-susceptibilidade encontrada nos 31 isolados pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Antimicrobianos testados: ácido nalidíxico (NAL), amicacina (AMI), amoxicilina+clavulanato (AMC), ampicilina (AMP), ampicilina+sulbactam (APS), aztreonam (ATM), cefaclor (CFC), cefalotina (CFL), cefazolina (CFZ), cefixima (CFM), ceftazidima (CFO), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), cefepima (CPM), ceftriaxona (CRO), cefuroxima (CRX), ceftarolina (CTL), cefotaxima (CTX), doxiciclina (DOX), enrofloxacin (ENR), estreptomicina (EST), fosfomicina (FOS), gentamicina (GEN), imipenem (IMP), levofloxacina (LEV), lomefloxacina (LMX), minociclina (MIN), nitrofurantoina (NIT), norfloxacina (NOR), Netilmicina (NTT), ofloxacina (OFX), piperacilina+tazobactam (PIT), sulfametazol+trimetoprim (SUT), sulfonamida (SUL), tetraciclina (TET), ticarcilina+clavulanato (TAC), tobramicina (TOB), trimetoprim (TRI).



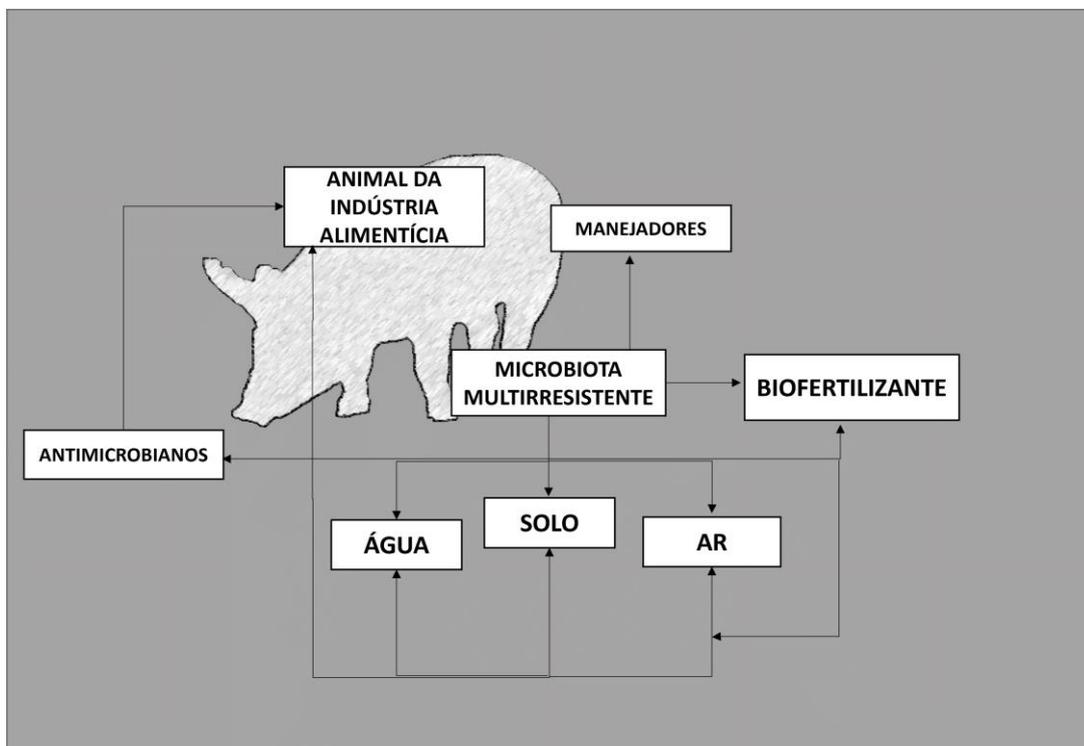
Fonte: autora

Foram encontradas, nas amostras de biofertilizantes, enterobactérias, dentre as quais, estão *E. coli* (n=28), *K. pneumoniae* (n=2) e *K. aerogenes* (n=1), bactérias que estão presentes nas microbiotas animal, humana e ambiental. Os isolados de enterobactérias apresentaram alta não-susceptibilidade à ciprofloxacina 80,64% (n=25), cloranfenicol 80,64% (n=25), lomefloxacina 83,87% (n=26), enrofloxacin 87,09% (n=27), ampicilina 90,32% (n=28), estreptomicina 96,77% (n=30), ticarcilina + ácido clavulânico 96,77% (n=30), doxiciclina 100% (n=31), tetraciclina 100% (n=31), sulfonamida 100% (n=31) e sulfazotrim 100% (n=31).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos já era uma realidade mesmo antes do uso dos primeiros antimicrobianos, na natureza, já era possível encontrar bactérias resistentes a eles, devido ao ambiente de competitividade de uma comunidade, desenvolver toxinas e mecanismos de sobrevivência a essas toxinas era a forma de se manter vivo e preservar a espécie. Essa resistência pode ser classificada em diversas categorias, de acordo com a classe do antimicrobiano e do mecanismo da resistência. Esses mecanismos podem ser influenciados pela pressão seletiva do meio e pelas mutações do material genético bacteriano, que podem ser compartilhados via horizontal, por conjugação ou transdução, e carregadas por elementos móveis, como plasmídeos e transposons (WAGLECHNER; WRIGHT, 2017; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A desativação de microrganismos patogênicos dá segurança ao processo da biodigestão, no entanto, ao final do tratamento, ainda foi possível encontrar bactérias oportunistas com perfil de multirresistência aos antimicrobianos. Tal fato levanta certa preocupação, uma vez que o material analisado compõe o efluente que pode ser destinado à irrigação de solos, lavouras ou atingir corpos da água que, muitas vezes, são utilizados pela própria fazenda, agricultores e populações circunvizinhas (figura 18).

Figura 18- Rota de disseminação de antimicrobianos e microbiota multirresistente

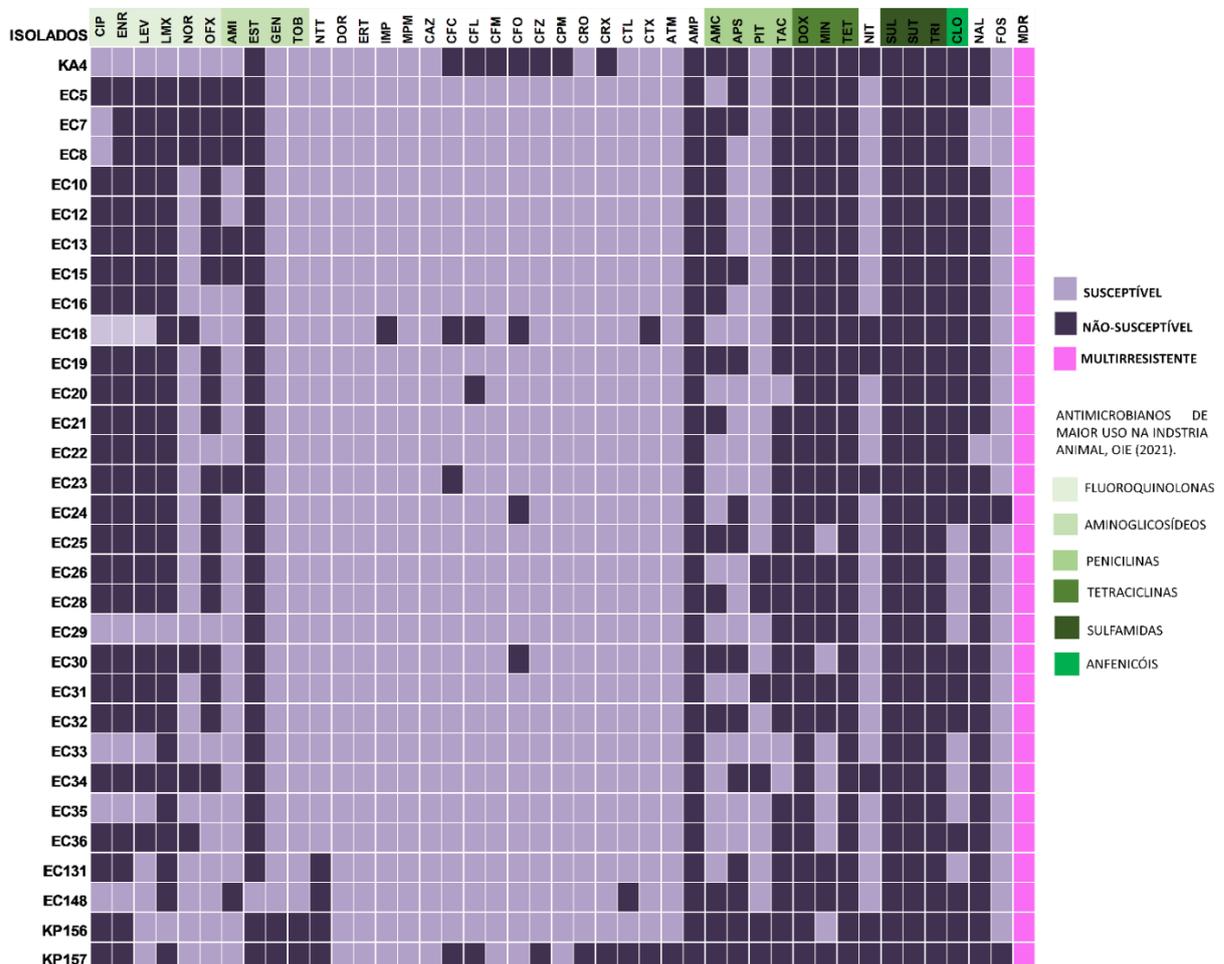


Fonte: Autora.

Segundo a OMS (2017), as enterobactérias, incluindo *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, são consideradas grupo emergente de bactérias resistentes às cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos. Entretanto, embora as enterobactérias do presente estudo tenham sido classificadas como multirresistentes, não foram encontradas altas taxas de não-susceptibilidade às cefalosporinas e carbapenêmicos (Figura 19). A resistência não encontrada nessas classes pode ser explicada pelo fato de não ser comum seu uso na rotina de crescimento e tratamento dos animais, como apontou o relatório da OIE (2021).

As classes mais utilizadas pela agropecuária mundial, de acordo com a OIE (2021), são as tetraciclina (33,9%), penicilinas (10,9%), macrolídeos (10,4%) polipeptídios (11,1%), sulfonamidas (incluindo trimetopim) (5,4%), anfenicóis (4,8%), aminoglicosídeos (4,4%) e fluoroquinolonas (3%). Neste estudo, observou-se que as bactérias apresentaram resistência justamente a essas classes, tendo sido verificado que os isolados foram 100% resistentes às tetraciclina e às sulfonamidas (figura 19).

Figura 19- Heatmap do perfil de Resistência aos antimicrobianos de Enterobactérias



Fonte: Autora

Dawangpa *et al.* (2021) analisaram 196 *E. coli* isoladas de amostras de água de poço artesiano, água potável, águas residuais, águas de poças e amostras de fezes de cinco granjas suínas, na Tailândia, com plantas de biogás e outras três sem biogás. Os pesquisadores encontraram alta resistência à ampicilina, amoxicilina, tetraciclina, cloranfenicol e piperacilina, sendo que a 91,79% (n=176) das *E. coli* foram resistentes a mais de 10 antimicrobianos distintos. Nesse mesmo estudo, foram ainda caracterizadas cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), sendo que estas foram mais encontradas nas fazendas com sistema de biodigestão.

Wu *et al.* (2019) isolaram 130 *E. coli* de diversas amostras de fezes, ar, rio, lodo e solo de uma granja de suínos na China e encontraram elevados índices de cepas multirresistentes. Foram testados 19 antimicrobianos, e os isolados apresentaram alta não-susceptibilidade às fluoroquinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina, ácido nadixílico), aminoglicosídeos (gentamicina, kanamicina, estreptomicina), tetraciclina, sulfametazol e ampicilina. Além da caracterização da multirresistência, no estudo, foi realizada a detecção de genes de resistência por PCR, seguida de sequenciamento e análises da blastagens dos genes em um banco de dados para confirmação. Foi realizada ainda uma análise por *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), demonstrando-se a similaridade genética entre os isolados e apontando que as cepas *E. coli*, carregadas de plasmídeos portadores de genes de resistência a quinolonas, provenientes das fezes dos suínos, estavam amplamente distribuídas pela fazenda.

Outros estudos como de Brisola *et al.* (2019) demonstraram, apoiados nos resultados obtidos, a contaminação do ambiente de fazenda de porcos no sul da Brasil com *E. coli* MDR. Foram isoladas 306 *E. coli* de amostras de fezes de suínos, água e solo de 100 fazendas produtoras. As cepas foram submetidas a teste de susceptibilidade e apresentaram alta resistência a sulfametazol associado com trimetropim (60,74%), colistina (45,19%) e enrofloxacina (39,26%). Além disso, 37% dos isolados apresentaram multirresistência a três ou mais classes de antimicrobianos, sendo o perfil de resistência mais observado GEN-SUT-ENR-COL.

Furlan *et al.* (2020) também encontraram multirresistência em 22 *E. coli* isoladas de amostras de fezes e solo, de uma fazenda de suínos de pequeno porte, que não faz uso de antimicrobianos. Os isolados apresentaram alta resistência a estreptomicina, sulfametazol, sulfametazol associado com trimetropim, assim como os relatados neste estudo. Esses dados que indicaram a presença de cepas *E. coli* multirresistentes em fazendas de suínos reforçam a necessidade de caracterização de isolados oriundos de biofertilizantes, visto que pode estar

ocorrendo não só a sobrevivência como também a disseminação dessas cepas MDR no ambiente.

Diversas infecções humanas são relacionadas a *E. coli*, sendo uma espécie responsável por mais de dois milhões de óbitos anuais (JANG *et al.*, 2017). Nos suínos, essas bactérias apresentam alta capacidade em desenvolver resistência aos antimicrobianos, além de estarem associadas às diferentes categorias diarreio gênicas, como a ETEC, que são capazes de causar diarreia neonatal em suínos e sua evolução pode levar à morte, ocasionando prejuízo econômico. De acordo com Bacarro *et al.* (2002), no Brasil, 15% a 20% das mortes em leitões são causadas por diarreia, que são de difícil tratamento devido, principalmente, à resistência a antimicrobianos desenvolvida pela comunidade bacteriana.

A suinocultura, no contexto da indústria animal, é a que mais utiliza medicamentos. Segundo Park *et al* (2017), 60% do uso de antimicrobianos da indústria animal é absorvido pela suinocultura. Somente na Coreia do Sul, entre 2011 e 2015, foram utilizadas 900 t de antimicrobianos na pecuária. O uso de antimicrobianos em culturas animais, para promoção de crescimento e profilaxia em suínos, tem contribuído para o surgimento de *E. coli* multirresistente em toda a Europa (BARTON, 2014).

No atual estudo, para as enterobactérias, foram investigados 10 genes de resistência relacionados à síntese de enzimas capazes de clivar o anel  $\beta$ -lactâmico, denominadas  $\beta$ -lactamases, sendo eles *bla<sub>CTXM-1</sub>*, *bla<sub>CTXM-2</sub>*, *bla<sub>CTXM-8</sub>*, *bla<sub>CTXM-9</sub>*, *bla<sub>OXA-48-like</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-58-like</sub>* e cinco outros genes de resistência, *tet(G)*, *catA1*, *aac(3)Iva*, *aph(3)Ia*, *qnrB*. Esses genes estão associados às classes antimicrobianas tetraciclina, anfenicol, aminoglicosídeo e fluoroquinolonas. Contudo, apenas *aac(3)Iva* e *catA1* foram amplificados em 14,28% (n=4) dos isolados para cada gene, e nenhum dos outros foi detectado pelo método de PCR convencional (Tabela 7), apresentando amplificação apenas dos controles positivos. Isso sugere que a resistência pode ser mediada por outros genes de resistência que não a síntese de  $\beta$ -lactamases e que podem ser identificados com sequências de *primers* distintos dos que foram pesquisados ou por outras técnicas, como metagenômica. Esta técnica, apesar de identificar genes de resistência antimicrobianos (GRA), tem a desvantagem de não caracterizar o isolado individualmente, uma vez que analisa um *pool* de amostra. Isso inviabiliza a identificação de quais espécies que estão carregando esses genes, apenas a família ou gênero.

Utilizando as análises metagenômicas, Zhang *et al.* (2021) demonstraram que, apesar da biodigestão reduzir o número de microrganismos potencialmente patogênicos em aproximadamente 25%, ainda há uma dispersão considerável de genes de resistência aos

antimicrobianos (GRAs,) nos solos agrícolas das granjas. No estudo de Zhang *et al.* (2021), foram analisadas amostras de fezes, solo e águas residuais de três granjas de suínos, e os GRAs predominantes encontrados foram para os antimicrobianos tetraciclinas (28,13%), aminoglicosídeos (23,64%), macrolídeo-lincosamidas-estreptogramina B (MLS) (12,17%), sulfonamidas (11,53%), multidrogas (8,74%) e cloranfenicol (6,18%). No estudo, foi encontrado ainda uma predominância dos GRAs em determinados locais, GRA de tetraciclina (fezes > águas residuais > solo), GRA de sulfonamida (solo>águas residuais>fezes) e GRA MLS (fezes>águas residuais>solo). Foi possível também relacionar os hospedeiros dos GRAs, apontando uma heterogeneidade nos GRAs e sua distribuição nos sistemas de biodigestão. Os genes detectados correspondem aos antimicrobianos de maior uso na indústria animal, como apontado pela OIE (2021), e a resistência a esses antimicrobianos também foi encontrada nas cepas do presente estudo.

Já Whang *et al.* (2019) fizeram uma investigação e quantificação por espectrometria de massa de alta resolução HRMS, (*High Resolution Mass Spectrometry*) dos resíduos de antimicrobianos em dois tipos de sistemas de tratamento de digestão anaeróbia. No primeiro, Suinocultura 1, digestão anaeróbia com tratamento de lagoa; e no segundo, Suinocultura 2, digestão anaeróbia com tratamento anóxico e tratamento biológico aeróbio. Os resultados demonstraram que, dos 115 antimicrobianos utilizados na suinocultura, 11 foram identificados, entre eles, as tetraciclinas (tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina), que foram os principais resíduos antimicrobianos encontrados (58% em média) e as sulfonamidas que, apesar da degradação de 80% dos resíduos, ao longo do sistema, ainda persistiram em grandes porcentagens dos resíduos (60%).

Esses dados encontrados na literatura podem sugerir que tanto a presença dos GRAs como dos resíduos antimicrobianos ao longo dos sistemas de tratamento anaeróbios em granjas suínas são fatores que podem contribuir para a sobrevivência de bactérias multirresistentes. Tais fatores favorecem e estimulam a transferência horizontal dos genes após o tratamento, além do ambiente com larga presença de metabólitos antimicrobianos, elevando o nível de estresse bacteriano e, portanto, possibilitando mutações e o surgimento da multirresistência e a presença de bactérias MDR, após o processo da biodigestão.

Ainda com relação às enterobactérias, visando caracterizar o potencial patogênico dos isolados bacterianos, foram investigados 23 genes de virulência por PCR: *allS*, *magA*, *Kfu*, *rmpA*, *entB*, *iutA*, *mrkD*, *K2*, *ybtS*, *fimH*, *ycfm*, *ecpA*, *kpN*, *irp-1*, *irp-2*, *aerobactin2*, *fimA*, *fyuA*, *cnf-1*, *iroN*, *traT*, *hly-A*, *mrkA*. Dos 23 genes pesquisados, foram identificados com maior

frequência os genes *ecpA* 83,87% (n= 26), *ybtS* em 35,48% (n=11), seguido de *traT* em 19,35% (n=6), *AllS* 12,90% (n= 4), *mrkD* 12,90% (n=4), *irp-1*, *iutA* e *rmpA* 6,45% (n=2), *Kfu*, *entB*, *rmpA* e *fimA* com 3,22% (n=1) cada (Tabela 7). Tais genes são frequentemente relatados para espécies de *Klebsiella* e, para uma melhor compreensão do potencial patogênico de *E. coli*, foi preciso investigar outros genes de virulência mais específicos para a espécie. Visando caracterizar possíveis patótipos, foram investigados 14 outros genes (tabela 3), relacionados à virulência de InpEC de *E. coli* diarreio gênicas (*AA probe*, *aaiC*, *aap*, *aatA*, *aggR*, *bfpA*, *aea*, *ehxA*, *elt*, *esta*, *estB*, *ipaH*, *stx1*, *stx2*). No entanto, não foi detectada a presença de nenhum deles, sendo amplificado apenas o controle positivo de cada um.

As comunidades bacterianas das granjas de suíno são altamente influenciadas pelo manejo dos animais. Assim, os resultados obtidos por Dawangpa *et al.* (2021), que não encontraram genes de virulência, ou por Prapasawat *et al.* (2017), que mostraram que 70% das *E. coli* isoladas de suínos sem diarreia não apresentaram virulência, reforçam a sugestão de que a manutenção de ambiente saudável para o animal influencia na comunidade bacteriana, além de assegurar a efetividade do processo da biodigestão.

Os genes de virulência são responsáveis por codificarem fatores de virulência que auxiliam na sobrevivência da célula bacteriana no hospedeiro ou em superfícies, como fímbrias-adesinas, sideróforos, toxinas, cápsulas, hemolisinas e lipopolissacarídeos (LPS). Denamour *et al.* (2021) apontaram a patogenicidade como uma estratégia evolutiva para melhorar a colonização e a persistência na microbiota intestinal, que também auxilia na sobrevivência à predação de amebas. Essa seria uma possível explicação para a coexistência de cepas *E. coli* comensais e patogênicas.

Os patótipos de *E. coli* são responsáveis por causar inúmeras doenças intestinais e extraintestinais em humanos e animais. Em humanos, é responsável por 90% das pielonefrites (SILVA, OLIVEIRA, MAK; 2019). Na suinocultura, é a maior causa de morte em suínos neonatais após o desmame, provocando diarreia, patogenicidade que está associada, principalmente, com a presença de fímbrias F18 (DUBREUI *et al.* 2016; RENZHAMMER, 2020). Apesar da baixa presença de genes de virulência observada no atual estudo, não foram detectados fímbrias F18, as quais foram indiretamente pesquisadas pelos genes de ETEC. Por outro lado, foi identificado, em mais de 50% dos isolados, o gene *E. coli. common pillus (ecpA)* que, associado ao potencial de aderência e virulência, tem sido relatado em diversos patótipos de *E. coli* EPEC, AAEC, ETEC, UPEC e APEC, e em cepas comensais (MUNHOZ *et al.* 2018; RENDON *et al.* 2007).

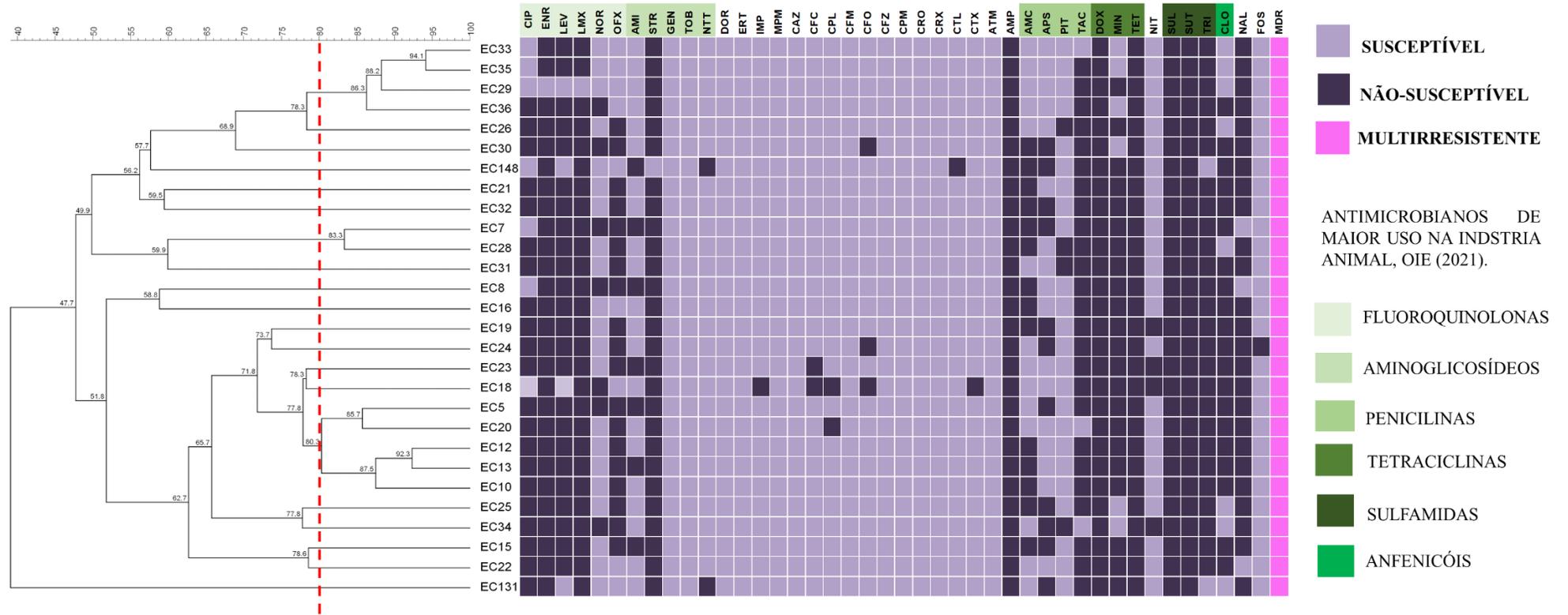
A técnica de ERIC-PCR é utilizada para tipagem molecular, sendo possível estabelecer a relação genética entre os isolados bacterianos, de acordo com as repetições intergênicas. No presente estudo, no dendrograma de similaridade genética, gerado a partir dos dados de ERIC-PCR (Figura 20), foi demonstrado que os isolados de *E. coli* possuem uma grande diversidade genética entre si. Nessa análise, verificou-se a formação de um grande *cluster*, agrupando quase que a totalidade dos isolados (27 isolados), *cluster* B, cujos isolados compartilham 47,7% de similaridade genética, o qual é subdividido em diversos outros *subclusters*.

No *cluster* A, foi agrupado apenas um isolado (EC131), formando um grupo parafilético (Figura 19). Também foi observada uma similaridade acima de 80% (pontilhado vermelho na Figura 19) em 11/28 dos isolados (EC5, EC7, EC10, EC12, EC13, EC20, EC28, EC29, EC33, EC35 e EC36). A diversidade genética apontada pela baixa similaridade sugere uma heterogeneidade de *E. coli*, sendo que os 2/28 dos isolados pertencem a uma segunda coleta realizada em outra granja. A diversificação gênica é muito comum em *E. coli*, que possui um dos genomas mais plásticos, devido à possibilidade de aquisição de plasmídeos, pela ampla quantidade de alelos encontrados, principalmente, nos genes de virulência e mutações, que ocasionam a evolução vertical (DENAMOUR *et al.* 2021).

A técnica de ERIC-PCR é bastante utilizada na tipagem molecular de *E. coli* para avaliar a similaridade genética dos isolados bacterianos pertencentes à espécie. Duan *et al.* (2009), por meio de ERIC-PCR, avaliaram a similaridade entre 120 cepas de *E. coli* isoladas de diversas amostras, como ar e fezes, em cinco granjas de suínos. Os pesquisadores demonstraram que 48% das cepas compartilhavam 90% de similaridade entre isolados do ar e de fezes, apontando uma possível dispersão das cepas via aerossóis. Em outro estudo, Gao *et al.* (2015) analisaram 42 cepas de *E. coli* MDR isoladas de fezes de suíno, biofertilizantes e solo, indicando 90% de similaridade entre isolados do solo e das fezes.

Tais resultados sugerem que clones multirresistentes estão sendo dispersos por meio dos dejetos da suinocultura. Logo, investigar, pela tipagem molecular, os isolados permitem avaliar se essas cepas com similaridade e multirresistência estão sendo dispersas por meio do uso do biofertilizante.

Figura 20- Dendrograma de similaridade genética gerado com dados de ERIC-PCR dos 28 isolados de *Escherichia coli* de biofertilizante construído pelo Bionumerics 7.5 (*Applied Math*), usando método UPGMA e coeficientes de similaridade DICE com 1% de tolerância para as bandas.



Fonte: Autora.

### 5.3 ENTEROCOCCI

Na suinocultura, o uso de antimicrobianos é comum por melhorar a qualidade de vida dos animais, influenciando seu crescimento e prevenindo doenças. Por outro lado, tem sido adotado cada vez mais o uso de probióticos, uma vez que são uma alternativa ao uso indiscriminado de antimicrobianos. Além disso, os probióticos apresentam diversos benefícios para o intestino animal, como instigar equilíbrio na microbiota intestinal, competindo com os patógenos por sítio no epitélio intestinal e por nutrientes, produzindo bacteriocinas e estimulando o sistema imune (CHO, ZHAO, KIM; 2011).

Os probióticos são compostos de bactérias que, geralmente, fazem parte da microbiota intestinal, são capazes de sobreviver à acidez estomacal e ao suco biliar, e possuem capacidade de colonizar intestino, antagonizando os patógenos. Dentre os gêneros bacterianos utilizados, estão *Lactobacillus*, *Enterococci*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium* e algumas espécies fúngicas (SILVA, NÖRNBERG, 2003; AMACHAWADI *et al.*, 2018).

Os *Enterococcus* são residentes naturais do intestino humano, de animais domésticos de companhias, de produção de alimentos e demais vertebrados, facilitando seu uso como probiótico. Lan e Kim (2020) avaliaram os efeitos da suplementação com probiótico de *E. faecium* em porcas gestantes e apontaram que a dieta com enriquecimento de probiótico melhora a performance nutricional e o ganho de peso, além de reduzir a mortalidade dos recém-nascidos. Tal fato deve-se à colonização intestinal com a microbiota rica em *E. faecium* das fezes maternas. Foi observada ainda uma redução da quantidade de *E. coli* na microbiota fecal, diminuindo proporcionalmente a incidência de diarreia.

Nos resultados deste estudo foi encontrada uma diferença significativa entre as espécies sendo predominante o gênero *Enterococcus* na segunda coleta. Sugere-se, portanto, de acordo com esses resultados, que as diferenças de microbiota encontradas na coleta dos biofertilizantes podem ser atribuídas também aos cuidados de suplementação probiótica adotados por cada suinocultor.

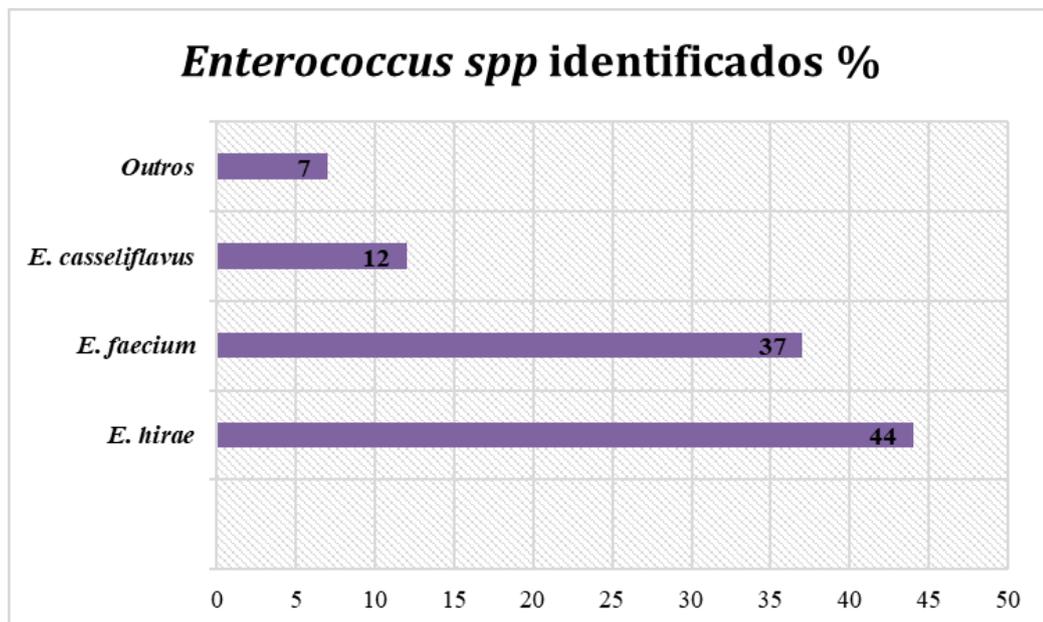
Os *Enterococcus* são amplamente dispersados no meio ambiente, fazem parte da microbiota intestinal e são considerados indicadores de contaminação fecal, uma vez que 90% dos alimentos de origem animal são contaminados por *Enterococcus*. Esses microrganismos são patógenos oportunistas responsáveis por causar infecções nosocomiais e comunidade-adquirida como endocardites, septicemias, infecções de trato urinários, entre outros. O gênero possui mais de 50 espécies, sendo os mais comuns *E. faecalis* e *E. faecium*, além de outros

como *E. hirae*, *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus* (GILMORE *et al.*, 2014).

O grupo de *Enterococcus*, analisado neste estudo, apresentou oito espécies (Figura 21). Todos os 66 isolados (Tabela 8) são provenientes de amostras de biofertilizante da segunda coleta, sinalizando uma possível diferença da microbiota presente nas granjas, uma vez que, a microbiota da digestão anaeróbia é influenciada pelos dejetos suínos e estes são definidos pela alimentação, saúde animal e manejo do suinocultor.

Nas amostras de biofertilizante, foram isoladas em maiores percentuais *E. faecium* e *E. hirae* (Figura 21), sendo uma microbiota distinta da isolada na primeira coleta. As espécies predominantes, entre os 66 isolados do gênero *Enterococcus*, foram *E. hirae*, compreendendo 44% (n=29) dos isolados, seguido de *E. faecium* com 37% (n=25), *Enterococcus casseliflavus* com 12% (n=8), e *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. avisi*, *E. durans* e *E. faecalis* com um isolado de cada espécie, compreendendo 7% (n=5) (Tabela 8) (Figura 21).

Figura 21- Percentual das diferentes espécies de *Enterococcus* encontradas entre os 66 isolados



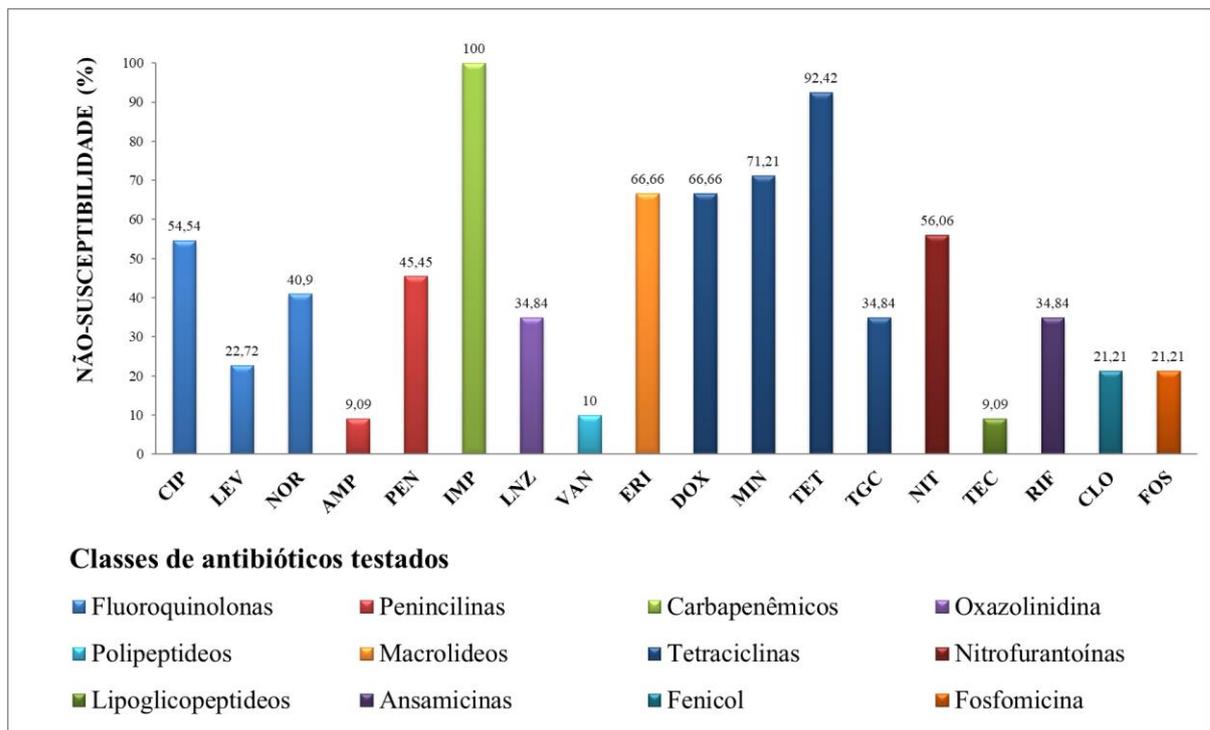
Fonte: dados da autora.

A crescente resistência intrínseca a inúmeros antimicrobianos tem causado dificuldades no tratamento terapêutico de *Enterococcus* que possui uma facilidade em sobreviver a diversos ambientes devido a características ácido-láticas fermentativas. Além disso, o gênero é uma das maiores fontes de clones de resistência aos antimicrobianos, observados principalmente em animais de estimação e de fazendas de criação para a indústria alimentícia. *E. faecium*, *E.*

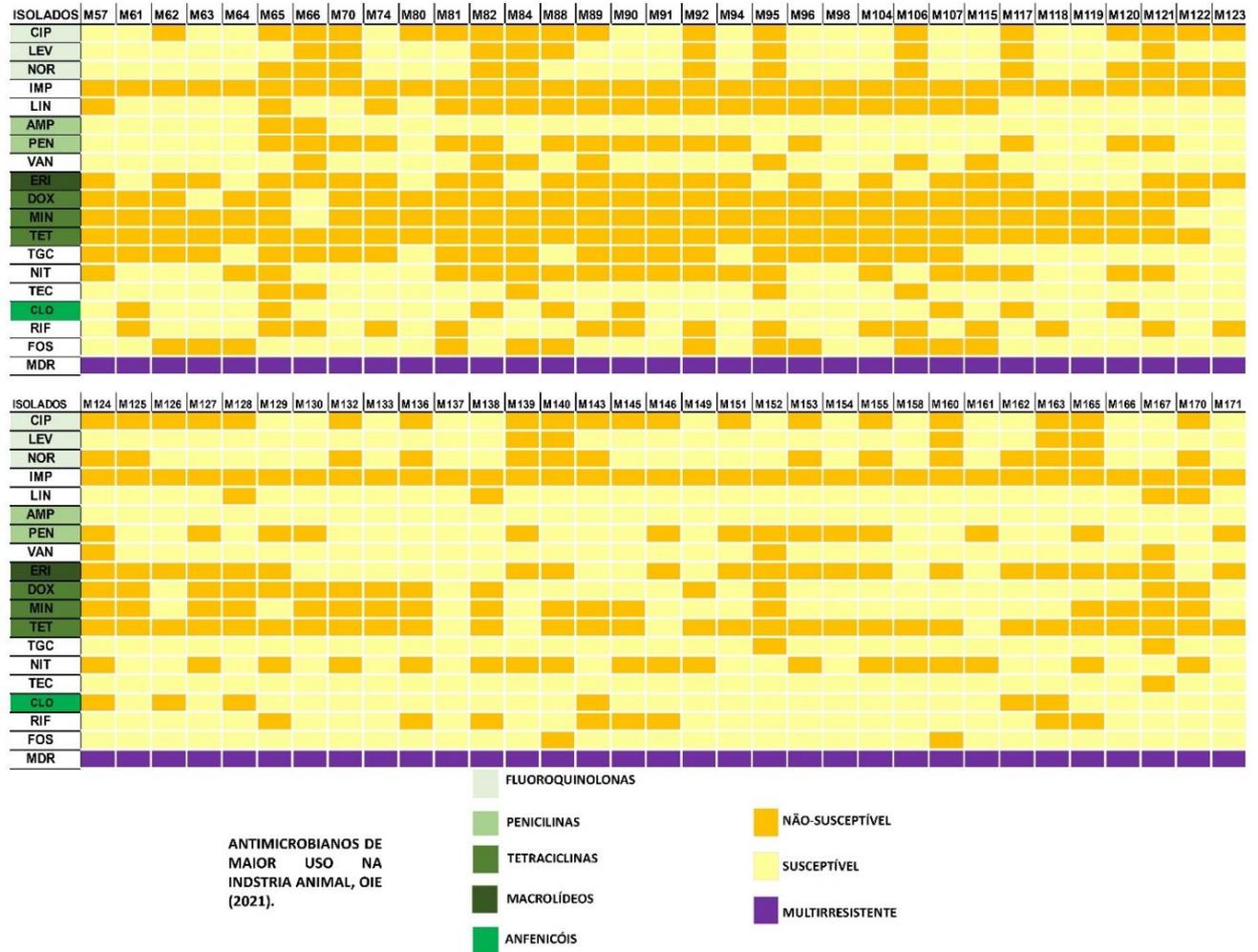
*faecalis*, *E. hirae*, e *E. durans* são as espécies mais comuns em suínos e bovinos, podendo ocorrer uma variação na predominância da microbiota de acordo com a localização geográfica (TORRES *et al.*, 2018).

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos para os isolados *Enterococcus* foram realizados com 18 diferentes antimicrobianos pertencentes a 12 classes distintas, como demonstrado na figura 22. Todos os isolados foram classificados como MDR (Figura 23). Os isolados apresentaram maiores índices de não-susceptibilidade para imipenem, 100% (n=66); tetraciclina, 92,42% (n=61); minociclina 71,21% (n=47); doxiciclina 66,66% (n=44); eritromicina, 66,66% (n=44); nitrofurantoína, 56,06% (n=37); ciprofloxacina, 54,54% (n=36); e penicilina, 45,45% (n=30). Por outro lado, os isolados apresentaram menores índices de não-susceptibilidade para teicoplanina e a ampicilina, com 9,09% (n=6) (figura 22 e figura 23).

Figura 22- Frequência de não-susceptibilidade aos antimicrobianos dos 29 isolados pertencentes ao grupo *Enterococcus*. Ampicilina (AMP), Ciprofloxacina (CIP), Cloranfenicol (CLO), Doxiciclina (DOX), Eritromicina (ERI), Fosfomicina (FOS), Imipenem (IMP), Levofloxacina (LEV), Linezolida (LNZ), Minociclina (MIN), Nitrofurantoína (NIT), Norfloxacina (NOR), Penicilina (PEN), Rifampicina (RIF), Teicoplanina (TEC), Tetraciclina (TET), Tigeciclina (TGG), Vancomicina (VAN).



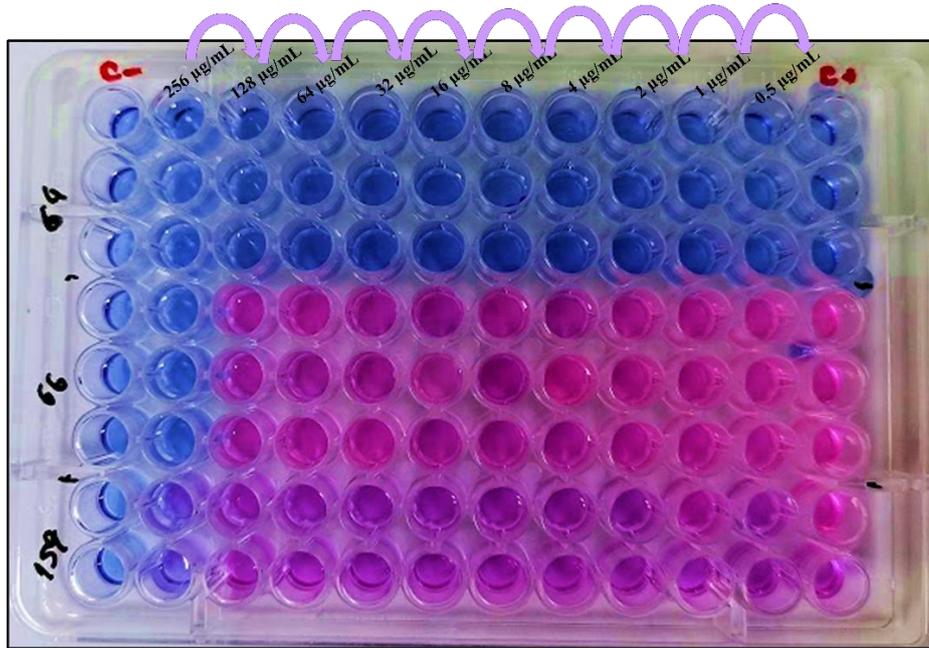
Fonte: Autora

Figura 23- Heatmap de Resistência aos antimicrobianos de *Enterococci*

Fonte: Autora

Os resultados dos antibiogramas mostram que 100% das cepas (n=66) de *Enterococcus* deste estudo foram MDR, além de 15% (n=10) delas serem resistente à vancomicina (ERV) (Figura 23). Para os isolados ERV, foram realizados o teste de CIM e foi confirmada a resistência de acordo com o preconizado pelo *CLSI* (2021). Foram considerados resistentes os isolados que obtiveram crescimento nas concentrações  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ . A visualização de crescimento bacteriano foi possível com auxílio do corante biológico resazurina (0,02% m/v). Ao se empregar esse corante, os poços com a coloração rosa-lilás apresentam células bacterianas viáveis, ou seja, neles houve crescimento. Já os poços com a coloração azul não apresentam células bacterianas viáveis, ou seja, neles não houve crescimento (figura 24).

Figura 24- Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Vancomicina em placa de 96 poços em isolados de *Enterococcus*.



Fonte: Autora (2023)

A multirresistência de *Enterococcus* é discutida desde a introdução de antimicrobianos como promotor de crescimento e prevenção de doenças em animais da indústria alimentícia. Desde a década de 50, muitos dos agentes antimicrobianos utilizados em animais são idênticos ou similares aos utilizados na terapia humana, como é o caso da avopracina e vancomicina. Estas possuem resistência cruzada, uma vez que são da mesma família dos aminoglicosídeos e possuem moléculas similares, mesmo mecanismo de ação, facilitando ainda mais o surgimento de resistência em *Enterococcus* (HAMMERUM *et al.*; 2010; GILMORE *et al.*, 2018).

Além disso, de acordo com Torres *et al.* (2018), a transmissão horizontal de genes, principalmente, em ambientes da indústria alimentício-animal tem intensificado a disseminação de *Enterococcus* MDR. Os genes que codificam resistência à vancomicina, macrolídeos, fenicóis e linezolida têm sido extensivamente documentado em animais, frequentemente, em resposta à forte seleção por antimicrobianos (antibióticos e metais pesados), usados na profilaxia ou como promotores de crescimento, sendo essas classes antimicrobianas as mais utilizadas na agropecuária, segundo a OIE (2021).

Terceiro patógeno mais associado às IRAS e o segundo mais comum em bacteremias, *Enterococcus* possui mecanismos de resistência aos antimicrobianos e alta plasticidade no genoma e facilidade na aquisição de genes de resistência. Segundo Yim *et al.* (2017), houve um expressivo aumento do índice de resistência à Vancomicina que passou de 0%, na década 80,

para 83% em 2016, principalmente, para *E. faecium*, microrganismo presente em mais de 37% (n=25) das espécies isoladas neste estudo.

As primeiras resistências à Vancomicina (RV) foram detectadas em infecções humanas no final dos anos 80. Seu mecanismo de resistência é modulado pelo *operon* do gene *van*, desde então, diversos genes desse *operon* (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, and *vanN*) e também o *vanC*, que é considerado um gene intrínseco, foram detectados em distintas espécies do grupo *Enterococci*. A RV, na Europa, foi atribuída ao uso da avopracina, como promotor de crescimento animal, uma vez que a prevalência de ERV era mais comum em animais, até seu uso ser proibido. Apesar disso, a disseminação de cepas ERV se manteve.

Na América do Norte, por sua vez, a prevalência de cepas ERV era mais comum em humanos. Isso foi atribuído ao intenso uso de vancomicina nas terapias. A alta prevalência de cepas ERV em humanos também foi atribuída ao uso de outros antimicrobianos, como tetraciclina e eritromicina, e à profilaxia e promoção de crescimento em animais. Nestes, foi detectada a presença dos genes promotores de resistência (*vanA* e *ermB*) no mesmo plasmídeo, indicando outra rota de resistência das cepas ERV (TORRES *et al.*, 2018).

As cepas *ver*, além da resistência à vancomicina, mostraram resistência compartilhada com outros medicamentos anti-*Enterococcus*, como a linezolida, ampicilina e aminoglicosídeos. Isso demonstrou claramente a urgência em adotar novas alternativas para diminuir o uso indiscriminado de antimicrobianos. Deve ser destacado que os fármacos de última linha de tratamento hospitalar já não são funcionais devido à resistência. Além disso, a escolha adequada de antimicrobianos com ação efetiva contra *Enterococcus* favorece o êxito da terapia, em casos de pacientes com bacteremia, endocardites e outras infecções, principalmente, os imunocomprometidos (KHAN *et al.*; 2022).

Os resultados relacionados à multiresistência encontrados neste trabalho para os isolados de *Enterococcus* corroboram os apresentados por Tan *et al.* (2018) que analisaram, entre outros aspectos, a virulência e a resistência antimicrobiana em 212 cepas de *E. faecalis* e 42 de *E. faecium*. Essas bactérias foram isoladas de amostras ambientais de sete fazendas de suínos, incluindo amostras nasais, fezes e urina de 140 suínos, e de 34 colaboradores locais, a fim de relacionar a influência de genótipos, virulência e fatores ambientais, como localização e práticas de higiene. Os pesquisadores demonstraram que 90% dos *Enterococcus* foram multiresistentes, incluindo resistência a cloranfenicol, tetraciclina, ciprofloxacina e eritromicina, os quais, segundo a OIE (2021), fazem parte das classes de antimicrobianos mais

utilizadas na indústria animal. Os genes com maior prevalência detectados por PCR foram *efa* e *asaI*, presentes em 90% dos *E. faecalis* e em 43% dos *E. faecium*.

Neste trabalho, na detecção de genes de virulência por PCR para o grupo *Enterococci*, foram investigados 18 genes relacionados a fatores de virulência, comumente presentes em *Enterococcus* (tabela 5), para averiguar o potencial patogênico dos isolados. Dos genes pesquisados, foram identificados nove genes em somente quatro isolados bacterianos (M107, M119, M121 e M122), sendo que o isolado M122 apresentou seis desses genes, *ace*, *efa*, *esp*, *gls-like-24*, *psaA*, *cbh* e, no isolado M121, foram detectados dois genes *gel E* e *gls-like-24* e, por fim, nos isolados M107 e M119, foi detectado o gene *cpsEnd/cpsG*. Os genes identificados são relacionados a fatores de virulência, como a produção de adesinas colágeno (*ace*), adesinas da parede celular (*efa*), proteína de superfície (*esp*), gelatinase (*gel E*), proteínas de estresse (*gls-like-24*), sideróforo (*psaA*), hidrólise de sais biliares (*Cbh*) e parede polissacarídica (*cpsEnd/cpsG*).

No entanto, apesar da presença dos genes nesses quatro isolados, os demais isolados (n=62) de *Enterococcus* do atual estudo não apresentaram virulência, corroborando os resultados de Amachawadi *et al.* (2018) que não encontraram nenhum gene de virulência em 22 amostras de *Enterococcus*, que eram provindos de probióticos bovinos e suínos. Isso reforça a sugestão de que os isolados obtidos neste estudo, em sua maioria, podem ser de fonte de dietas ricas em probióticos ou de uma microbiota saudável-comensal. Segundo Lebreton *et al.* (2014), os *Enterococcus* estão presentes em mais de 70% do microbiota gastrointestinal e nas fezes de mamíferos. Além disso, os *Enterococcus* podem possuir baixa virulência devido à eficiência da biodigestão no processo de eliminação de bactérias virulentas, ou ainda devido ao manejo do suinocultor e ao estado de saúde do animal. Obviamente, quanto mais saudável for o animal, mais saudável sua microbiota se apresentará (GRESSE *et al.* 2017; CHEN *et al.*, 2022). Além disso, estudos vêm apontando o uso de algumas cepas de *Enterococcus* como vantajosas para uso probiótico, devido às suas características de baixa virulência e sensibilidade aos antimicrobianos (GRESSE *et al.* 2017; LAN, KIM, 2020; ANJUM *et al.*, 2022).

Por outro lado, diferentemente dos resultados anteriores, Beshiru *et al.* (2017) encontrou um alto índice de presença de três genes de virulência, *ace*, *gelE* e *esp*, que foram detectados em 98%, 93% e 68% dos isolados de *Enterococcus*, respectivamente. Esses genes são associados à produção de adesinas, de gelatinase e de proteína de superfície.

Esses fatores são essenciais para a sobrevivência dos microrganismos e a colonização do hospedeiro, o fator de virulência *gelE*, por exemplo, auxilia na sobrevivência da célula bacteriana

a diversos componentes do sistema imune, e ocasiona clivagem de proteínas, fibrinogênio, fibrina e colágenos. O gene *gelE* também apresenta importante papel na formação de biofilme juntamente com as proteínas de superfície (PILLAY *et al.*, 2018).

A presença dos fatores de virulência encontrados por Beshiru *et al.* (2017) são suficientes para auxiliar a sobrevivência das bactérias no hospedeiro, assim como os fatores detectados neste estudo (*ace, efa, esp, gls-like-24, psaA, cbh*) nas amostras M107, M119, M121 e M122., Deve ser salientado que o grupo dos *Enterococci* possui uma facilidade na formação de biofilmes devido à presença desses fatores de virulência que são essenciais na fase de fixação inicial do biofilme. Ch'ng *et al.* (2019), em sua revisão sobre biofilmes de *Enterococcus* associados a infecções, apontaram a importância desses fatores na fase inicial de formação do biofilme.

Os *Enterococcus* estão entre os patógenos oportunistas mais frequentes em infecções nosocomiais e são responsáveis por 25% das infecções urinárias associadas a cateteres. Além disso, 75% das IRAS são associadas às espécies de *E. faecium* e *E. faecalis*. A alta capacidade de provocar infecções se deve à facilidade de formação de biofilmes, juntamente com a alta capacidade de adquirir resistência aos antimicrobianos. Os genes de resistência aos antimicrobianos podem ser compartilhados nos biofilmes os quais, além de serem uma barreira física aos antimicrobianos, são também ambientes de trocas genéticas (ALI *et al.*, 2017; CH'NG *et al.*, 2019; GARCIA-SOLACHE; RICE, 2019)

Em outro estudo, Amachawadi *et al.* (2018) analisaram a resistência a antimicrobianos, a virulência e a diversidade genética por PFGE em 22 isolados de *E. faecium*, utilizados como probióticos em suínos e bovinos. Os autores mostraram que, quando as cepas apresentaram resistência, estas foram resistentes a, no máximo, um antimicrobiano e que dez delas eram 100% similares, sugerindo que cepas de *Enterococcus* podem também ser bons probióticos devido à baixa resistência e à baixa virulência encontrada.

A dualidade apresentada pelos *Enterococcus* entre probiótico e patógeno vem sendo discutida na literatura. A humanidade tem feito uso de alimentos fermentados por bactérias centenas de anos. *Enterococcus* estão entre os grupos de bactérias mais presentes nos probióticos e, além disso, também são utilizados para prevenir e/ou tratar a diarreia em suínos, aves, gado e animais de estimação, também para tratar doenças recorrentes nas vias respiratórias superiores de humanos. (ZOMMITI *et al.*, 2022)

Os *Enterococci* possuem características que os favorecem nos processos de fermentação e de deterioração de alimentos, possuem funções ácido-láctea, de produção de bacteriocinas,

que auxiliam na sobrevivência à diversos ambientes, principalmente, em intestinos de humanos e de animais (SUVOROV, 2020).

Além disso, podem fazer parte da microbiota comensal intestinal e contribuir com diversos complexos metabólicos, auxiliando no combate de patógenos, logo a maioria dos probióticos enterocócicos produzem várias bacteriocinas que inibem o crescimento de patógenos e têm múltiplos benefícios imunomodulador, metabólico, anti-inflamatório, propriedades antivirais ou mesmo anticancerígenas de acordo com Suvorov (2020).

Nos últimos anos, o uso de algumas cepas de probióticos enterocócicos tem sido desaconselhado devido a duas importantes preocupações: a disseminação de cepas ERV, e a alta capacidade de troca genética com patógenos intestinais, adquirindo genes de virulência e resistência (SUVOROV, 2020; XU *et al.*, 2021).

Nos resultados deste estudo, todos os 66 *Enterococcus* caracterizados foram MDR, e 15% são cepas ERV. Zhao *et al.* (2022) também encontraram alta multirresistência em *Enterococcus* e cepas ERV na cadeia de produção de suínos. As infecções relacionadas a *Enterococcus* têm sido associadas, principalmente, às cepas ERV. Tal fato se deve à sua capacidade de sobreviver por longos períodos em superfícies ambientais, à sua tolerância ao calor, cloro e, até mesmo, em locais contaminados com antibióticos (GILMORE *et al.*, 2018). Essa versatilidade torna seu controle uma tarefa crítica e altamente desafiadora, uma vez que, estabelecida em ambientes hospitalares, cepas com tais características podem ocasionar muitas infecções e levar a óbito.

Dessa forma, estudos têm sido desenvolvidos para avaliar a capacidade probiótica e patogênica de determinadas espécies enterocócicas de modo a validar seu uso seguro como probiótico. Os probióticos têm sido uma das principais alternativas ao uso de antimicrobianos, principalmente, nas indústrias animal e alimentícia (SUVOROV, 2020; XU *et al.*, 2021, ZOMMITI *et al.*, 2022). Logo, fazer a caracterização de cepas enterocócicas de ambientes de fazenda de produção, é de extrema importância para a avaliação da patogenicidade, uma vez que o uso de probióticos é rotina nesses ambientes.

Os resultados mostraram a sobrevivência de bactérias multirresistentes no biofertilizante provindo de dejetos suínos e contribuem para a urgente e necessária caracterização de microbiota de biofertilizantes, sobreviventes a processos de biodigestão. O Brasil é um dos maiores produtores de animais para a indústria alimentícia, sendo o terceiro maior produtor mundial na suinocultura, um setor que vem crescendo e requerendo cada vez mais cuidado com a saúde animal e ambiental. Portanto, é de suma importância que sistemas

efetivos de tratamento dos dejetos animais, especialmente de suínos, sejam implementados, visando o reaproveitamento útil dos dejetos que são produzidos em grande escala. Porém, de igual importância, há a preocupação de garantir a eficiência dos processos da biodigestão com a devida segurança para a saúde humana, animal, das plantas e do meio ambiente, especialmente, no que se refere às bactérias potencialmente patogênicas e multirresistentes presentes nos biofertilizantes.

## 6. CONCLUSÕES

- Foram identificadas 125 espécies bacterianas distintas nos biofertilizantes analisados, apontando uma diferença na microbiota dos suínos das granjas. A maioria das espécies bacterianas identificadas foi associada duas grandes famílias: *Enterobacteriaceae* (n=31), *Enterococcaceae* (n=66) e diversos (n=28), respectivamente.
- Entre as enterobactérias identificadas, as espécies encontradas foram *E. coli* (n=28), *K. pneumoniae* (n=2) e *K. aerogenes*(n=1), que são comumente encontradas em animais da indústria alimentícia, no meio ambiente e em ambientes hospitalares.
- As principais espécies identificadas da família *Enterococcaceae* (n=66) foram *E. hirae*, *E. faecium* e *E. casseliflavus*, que são comumente encontradas em animais da indústria alimentícia e no meio ambiente.
- Todos os isolados das famílias *Enterobacteriaceae* (n=31) e *Enterococcaceae* (n=66) foram classificados como multirresistentes aos antimicrobianos.
- As enterobactérias, apesar da multirresistência, não apresentaram nenhum dos genes de resistência pesquisados, sugerindo que a resistência pode ser mediada por outros genes e/ou mecanismos de resistência a antimicrobianos.
- Os isolados pertencentes ao gênero *Enterococcus* apresentaram alta resistência aos antimicrobianos, principalmente, pertencentes às classes das tetraciclina, fluoroquinolonas, macrolídeos, fenicol. Além disso, *Enterococcus*, 15% foram caracterizados como resistentes à Vancomicina.
- Embora tenha sido encontrados poucos genes de virulência, eles podem possuir potencial patogênico.
- Foram detectados apenas seis genes em quatro isolados de *Enterococcus*, também indicando que apesar do baixo número de genes encontrados pode haver potencial patogênico nestes isolados.
- Os isolados de *E. coli* apresentaram uma alta diversidade genética quando analisados por ERIC-PCR

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 10004**: Resíduos Sólidos – Classificação. Rio de Janeiro-RJ, 2004.

ALLOCATI, N.; MASULLI, M.; ALEXEYEV, M.; ILIO, C. di. *Escherichia coli* in Europe: an overview. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 6235-6254, 25 nov. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph10126235>.

ALMEIDA, R.M.B. **Novas oportunidades de aproveitamento do biogás no Brasil**. 2021. 71 f. Monografia (Especialização) – Curso de Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 202

ALMOND, R. E. A., GROOTEN, M., JUFFE BIGNOLI, D., PETERSEN, T.. Living Planet Report 2022–Building a nature-positive society. **WWF, Gland, Switzerland**, 2022. Disponível em: [https://wwflpr.awsassets.panda.org/downloads/lpr\\_2022\\_full\\_report.pdf](https://wwflpr.awsassets.panda.org/downloads/lpr_2022_full_report.pdf)

AMARAL, C. M. C.; AMARAL, L. A.; L.JÔNIO, J.; NASCIMENTO, A. A.; FERREIRA, D. s; MACHADO, M. R. F.. Biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros submetidos a diferentes tempos de retenção hidráulica. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 1897-1902, dez. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782004000600035>.

ANDRADE, Fernanda B.; GOMES, Tânia A. T.; ELIAS, Waldir P. A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 106, p. 16-18, Nov. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.030>

ARANDA, Katia R. S. et al. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 267, no. 2, p. 145-150, Feb. 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00580.x>

ARIAS, Cesar C. A.; MURRAY, Barbara B. E.. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 266-278, 16 mar. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2761>.

ARIAS, M. V. B; CARRILHO, C. M. D. de M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação. **Semina: Ciências Agrárias**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 775-790, 15 maio 2012. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n2p775>.

BACCARO, M. R., MORENO, A. M., CORRÊA, A., FERREIRA, A. J. P., CALDERARO, F. F.. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivos do Instituto Biológico [Internet]**. V.69, n.2, p. 15-18, abril-jun, 2002. ISSN:1808-1657. Disponível em

[http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V69\\_2/baccaro.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V69_2/baccaro.pdf). Acessado em 20 jan 2022

BARKO, P. C., MCMICHAEL, M. A., SWANSON, K. S., & WILLIAMS, D. A. The gastrointestinal microbiome: a review. **Journal of veterinary internal medicine**. v. 32, n. 1, p. 9-25, 2018. <https://doi.org/10.1111/jvim.14875>

BARTON, Mary D. Impact of antibiotic use in the swine industry. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 19, p. 9-15, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2014.05.017>.

BERNSTEIN, J.; DUTKIEWICZ, J. A public health ethics case for mitigating zoonotic disease risk in food production. **Food ethics**, v. 6, n. 2, p. 9, 2021. <https://doi.org/10.1007/s41055-021-00089-6>

BLOUNT, Zachary D. The unexhausted potential of *E. coli*. **Elife**, [S.L.], v. 4, n. 05826, p. 1-12, 25 mar. 2015. Elife Sciences Publications, Ltd. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.05826>.

BRASIL M DA, S.; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM, Saúde; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS, Transmissíveis. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR)**. 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/antimicrobianos/plano-nacional-antimicrobianos-pan-br-14fev19-isbn.pdf/view>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano setorial para adaptação à mudança do clima e baixa emissão de carbono na agropecuária com vistas ao desenvolvimento sustentável (2020-2030): visão estratégica para um novo ciclo / Secretaria de Inovação, Desenvolvimento Rural e Irrigação**. – Brasília: MAPA, 2021.

BRASIL. Institui, no âmbito do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o Plano Setorial para Adaptação à Mudança do Clima e Baixa Emissão de Carbono na Agropecuária - ABC+ para o período 2020-2030. **Portaria Mapa Nº 471, de 10 de Agosto de 2022**. BRASIL, 11 ago. 2022.

BRASIL. Lei nº 12305, de 02 de agosto de 2010. **Plano Nacional de Resíduos Sólidos**. BRASIL, Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2010/lei/112305.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/112305.htm). Acesso em: 23 fev. 2022.

BRASIL. Lei nº 6.938, de 31 de fevereiro de 1981. BRASIL, Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l6938.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6938.htm). Acesso em: 23 fev. 2022.

BRASIL. Lei nº 9605, de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Lei de Crimes Ambientais**. BRASIL, 1998. Seção 3. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l9605.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9605.htm). Acessado em: 21 set. 2022

BERNDTSSON, M. **Circular Economy and Sustainable Development**. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Sustainable Development, Department of Earth Science, Uppsala University, Suécia, 2015.

BRISOLA, M.C.; CRECENCIO, R. B.; BITNER, D. S.; FRIGO, A.; RAMPAZZO, L.; STEFANI, L. M.; FARIA, G. A.. *Escherichia coli* used as a biomarker of antimicrobial resistance in pig farms of Southern Brazil. **Science of Total Environment**, [S.L.], v. 647, p. 362-368, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.438>.

BUCK, J. D.; CLEVERDON, R. C. The effect of tween 80 on the enumeration of marine bacteria by the spread and pour plate methods 1, 2. **Limnology and Oceanography**, v. 6, n. 1, p. 42-44, 1961. <https://doi.org/10.4319/lo.1960.5.1.0078>

BUDIÑO, F.E.L. Probióticos e prebióticos na alimentação de leitões. 2007. **Artigo em Hypertexto**. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2007\\_4/suinos/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2007_4/suinos/index.htm)>. Acesso em: 22/2/2022

BUROW, E., ROSTALSKI, A., HARLIZIUS, J., GANGL, A., SIMONEIT, C., GROBBEL, M., KOLLASA, C., TENHAGENA, B-L., KÄSBOHRER, A. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment. **Preventive veterinary medicine**, v. 165, p. 52-62, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.02.008>

BUSH, K.; JACOBY, G. A.. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 969-976, mar. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01009-09>. BUSH K,

BUSH, K.; JACOBY, G. A.. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 969-976, mar. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01009-09>.

CARDOSO, B. F.; OYAMADA, G. C.; DA SILVA, C.M. Produção, tratamento e uso dos dejetos suínos no Brasil. **Desenvolvimento em questão**, v. 13, n. 32, p. 127-145, 2015. Disponível: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=75241745007?>

CARNEIRO, L.A; PETTAN-BREWER, C. *One Health*: conceito, história e questões relacionadas—revisão e reflexão. Pesquisa em Saúde & Ambiente na Amazônia: **Perspectivas para sustentabilidade humana e ambiental na região**, v. 1, n. 1, p. 219-240, 2021.

CEPEA, Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, CNA, Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil -. **PIB do agronegócio brasileiro**: sustentado por safra recorde no campo, pib do agronegócio tem alta modesta no primeiro trimestre. Piracicaba: Cepea, 2022. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/PIB-DO-AGRO-27JUN2023.pdf. Acesso em: 11 set. 2023.

CERNA, J. F.; NATARO, J. P.; ESTRADA-GARCIA, T. Multiplex PCR for Detection of Three Plasmid- Borne Genes of Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 41, no. 5, p. 2138-2140, 1 May 2003. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2138-2140.2003>

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. **Journal of molecular evolution**, v. 88, p. 26-40, 2020. doi: 10.1007/s00239-019-09914-3.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>

CLEGG, S.; MURPHY, C. N.. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-17, 29 jan. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0005-2012>.CLEGG, S.;

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Seventh Informational Supplement. CLSI document M100-S27. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2021

COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post—antimicrobial era. **Science**, v. 257, n. 5073, p. 1050-1055, 1992. doi: 10.1126/science.257.5073.1050

CONWELL, M., DANIELS, V., NAUGHTON, P. J., DOOLEY, J. S. G. Interspecies transfer of vancomycin, erythromycin and tetracycline resistance among *Enterococcus* species recovered from agrarian sources. **BMC microbiology**, v. 17, p. 1-8, 2017. Doi: 10.1186/s12866-017-0928-3

COVONE, M. G.; BROCCHI, M.; PALLA, E.; SILVEIRA, W. D.; RAPPUOLI, R.; GALEOTTI, Cesira L. Levels of Expression and Immunogenicity of Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strains Expressing *Escherichia coli* Mutant Heat-Labile Enterotoxin. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 66, n. 1, p. 224-231, jan. 1998. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.66.1.224-231.1998>.

CRAVEIRO, A. M.; LA IGLESIA, M. R. de; HIRATA, Y. S. **Manual de biodigestores rurais**. São Paulo: Ipt, 1982. 61 p.

DA SILVA, M. J., NUNES, R. P., SILVA, B. M., SANTOS, L. M. L., & DE LIMA, C. M. D. Extensão rural e tecnologia sustentável: utilização de biodigestor na agricultura familiar. **Diversitas Journal**, v. 3, n. 3, p. 867-876, 2018.  
<https://doi.org/10.17648/diversitas-journal-v3i3.687>

DALLENNE, C.; COSTA, A.; DECRE´, D.; FAVIER, C.; ARLET, G.. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 65, n. 3, p. 490-495, 12 jan. 2010. Oxford University Press (OUP).  
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp498>.

DAWANGPA, A., LERTWATCHARASARAKUL, P., RAMASOOTA, P., BOONSOONGNERN, A., RATANAVANICHROJN, N., SANGUANKIAT, A., TULAYAKUL, P. Genotypic and phenotypic situation of antimicrobial drug resistance of *Escherichia coli* in water and manure between biogas and non-biogas swine farms in

central Thailand. **Journal of Environmental Management**. V.279, p. 1-12. 2021. 279, 111659.10.1016/j.jenvman.2020.111659

DUBREUIL, J. D.; ISAACSON, R. E.; SCHIFFERLI, D M. Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, v. 7, n. 1, 2016. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0006-2016>

DEGANUTTI, R., PALHACI, M. D. C. J. P., ROSSI, M. Biodigestores rurais: modelo indiano, chinês e batelada [Internet]. **Pernambuco of the 4<sup>th</sup> Encontro de Energia no Meio Rural**, 2002. Disponível em : [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Biodigestores\\_000g76qdzev02wx5okOwtedt3spdi71p.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Biodigestores_000g76qdzev02wx5okOwtedt3spdi71p.pdf). Acessado em 20 jan 2022.

DENAMUR, E.; CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; GORDON, D.. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 37-54, 21 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>.

DINGLE, T. C.; BUTLER-WU, S. M. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. **Clinics In Laboratory Medicine**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 589-609, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2013.03.001>.

DOS SANTOS, S. J.; SANTOS, E. L.; SANTOS, E. L.; BARBOSA, J. H.; JUNIOR, D. A. P.; DA CONCEIÇÃO PONTES, E.; , & SANTANA FILHO, E.. Construção de um biodigestor caseiro como uma tecnologia acessível a suinocultores da agricultura familiar. **Pubvet**, v. 11, p. 207-312, 2016. <http://dx.doi.org/10.22256/pubvet.v11n3.290-297>

DUAN, H., CHAI, T., LIU, J., ZHANG, X., QI, C., GAO, J., ... & SCHLENKER, G. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental research**, v. 109, n. 5, p. 511-517, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.02.014>

DUCEY, T. F.; RASHASH, D.M. C.; SZOGI, A. A. Differences in Microbial Communities and Pathogen Survival Between a Covered and Uncovered Anaerobic Lagoon. **Environments**, [S.L.], v. 6, n. 8, p. 91, 6 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/environments6080091>.

DUCEY, Thomas T. F.; RASHASH, Diana D. M. C.; SZOGI, Ariel A. A.. Differences in Microbial Communities and Pathogen Survival Between a Covered and Uncovered Anaerobic Lagoon. **Environments**, [S.L.], v. 6, n. 8, p. 91, 6 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/environments6080091>.

ELHADI, N.; ALJINDAN, R.; ALSAMMAN, K.. ERIC-PCR genotyping of *Acinetobacter baumannii* isolated from different clinical specimens. **Saudi Journal Of Medicine And Medical Sciences**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 13, 2018. Medknow. [http://dx.doi.org/10.4103/sjmms.sjmms\\_138\\_16](http://dx.doi.org/10.4103/sjmms.sjmms_138_16).

ELHADI, N; ALJINDAN, R; ALSAMMAN, K. ERIC-PCR genotyping of *Acinetobacter baumannii* isolated from different clinical specimens. **Saudi Journal Of Medicine**

**And Medical Sciences**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 13, 2018. Medknow.  
[http://dx.doi.org/10.4103/sjmms.sjmms\\_138\\_1](http://dx.doi.org/10.4103/sjmms.sjmms_138_1)

EMBRAPA. **Estatística**. 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>. Acesso em: 20 fev. 2022.

EMBRAPA. **Agricultura de baixa emissão de carbono**: Plano ABC – Plano Setorial de Mitigação e de Adaptação às Mudanças Climáticas Visando à Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura. 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-agricultura-de-baixo-carbono/sobre-o-tema>. Acesso em: 11 jun. 2023.

ERKEN, M.; LUTZ, C.; MCDOUGALD, D.. The rise of pathogens: predation as a factor driving the evolution of human pathogens in the environment. **Microbial ecology**, v. 65, p. 860-868, 2013. doi: 10.1007/s00248-013-0189-0.

FARFÁN-GARCÍA, Ana A. ElviraE.; ARIZA-ROJAS, Sandra S. CatherineC.; VARGAS-CÁRDENAS, Fabiola F. AndreaA.; VARGAS-REMOLINA, Lizeth L. VivianaV.. Mecanismos de 90ernambuco de *Escherichia coli* enteropatógena. **Revista Chilena de Infectología**, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 438-450, ago. 2016. SciELO Agência Nacional de Investigacion y Desarrollo (ANID). <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182016000400009>.

FERREIRA, A. H., CARRARO, B., DALLANORA, D., MACHADO, G., MACHADO, I. P., PINHEIRO, R., & ROHR, S. Produção de suínos: teoria e prática. **Brasília: ABCS**, 2014.

FERNANDEZ, J. A. B.; CASTRO, M. A. S. Resíduos Agrossilvolpastorid. In: SCHALCH, V.; LEITE, W. C. A.; CASTRO, M. C. A. A.; CÓRDOBA, R. E.; CASTRO, M. A. S. **RESÍDUOS SÓLIDOS**: conceito, gestão e gerenciamento. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019. Cap. 9. P. 333-348.

FIORE, Elizabeth; VAN TYNE, Daria; GILMORE, Michael S.. Pathogenicity of *Enterococci*. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 1-23, 19 jul. 2019. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0053-2018>.

FREITAS, M.F.L. de; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.s. de A.; SILVA, D.R. da; SILVEIRA FILHO, V.M. da; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J. de; MOTA, R.A.. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S.L.], v. 72, n. 2, p. 173-179, abr. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657v72p1732005>.

FURLAN, J. P. R.; FERREIRA, M. E. S.; STEHLING, E. G. Genetic Diversity of Multidrug-Resistant CMY-Producing *Escherichia coli* from Feces and Soil in a Small-Scale Pig Farm. **Microbial Drug Resistance**, [S.L.], v. 26, n. 11, p. 1365-1371, 1 nov. 2020. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2020.0090>.

GANDRA, E.R. Á.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W. S. de; GODOI, H. S.. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum. Technology**,

[S.L.], v. 30, n. 1, p. 109-118, 8 maio 2008. Universidade Estadual de Maringá.  
<http://dx.doi.org/10.4025/actascitechnol.v30i1.3245>.

GAO, L.; HU, J.; ZHANG, X.; WEI, L.; LI, S.; MIAO, Z.; CHAI, T.. Application of swine manure on agricultural fields contributes to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* spread in Tai'an, China. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 313, p. 1-7, 14 abr. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00313>.

GARCÍA-SOLACHE, Mónica; RICE, Louis B.. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 1-28, 20 mar. 2019. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00058-18>.

GILBERT, W., THOMAS, L. F., COYNE, L., RUSHTON, J.. Mitigating the risks posed by intensification in livestock production: the examples of antimicrobial resistance and zoonoses. **Animal**, v. 15, n. 2, p. 100123, 2021.  
<https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100123>

GILLINGS, M.; HOLLEY, M.. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. **Letters In Applied Microbiology**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 17-21, jul. 1997. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765x.1997.00162.x>.

GILMORE MS, CLEWELL DB, IKE Y, SHANKAR N, editors. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014-. PMID: 24649510.

GISKE, C. G., TURNIDGE, J., CANTÓN, R., & KAHLMETER, G. Update From The European Committee On Antimicrobial Suseptibility Testing (EUCAST). **Journal of Clinical Microbiology**, JCM-00276. 2021.

GUAN, T. Y.; HOLLEY, R. A.. Pathogen Survival in Swine Manure Environments and Transmission of Human Enteric Illness-A Review. **Journal Of Environmental Quality**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 383-392, mar. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2134/jeq2003.3830>.

GUIMARÃES, D. D., AMARAL, G. F., MAIA, G. B. D. S., LEMOS, M. L. F., ITO, M., CUSTODIO, S.. **Suinocultura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES**. 2017.

HANSSON, K.; BRENTHEL, A.. Imagining a post-antibiotic era: a cultural analysis of crisis and antibiotic resistance. **Medical Humanities**, v. 48, n. 3, p. 381-388, 2022.  
<http://dx.doi.org/10.1136/medhum-2022-012409>

HIDALGO, C.M. R.; K., A.; B.ANDRÉ, M. C. D.P.; VIEIRA, C. A. S.; JAYME, L. B.; SANTOS, P. P.; SERAFINI, Á. B.. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 1221-1227, ago. 2006. FapUNIFESP (SciELO).  
<http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782006000400027>.

HOORNWEG, D.; BHADA-TATA, P. **What a waste: a global review of solid waste management**. 2012. Disponível em:

HUNGRIA, M., VARGAS, M. A. T., SUHET, A., & PERES, J. R. R. *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília: **Embrapa/SPI**, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE **Indicadores. Estatística da produção pecuária.**, 2018. Acessado em 10 de jan de 2018. Disponível em [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp\\_2018\\_3tri.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2018_3tri.pdf). Acesso em 20 fev. 2022.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA-IPEA (org.). **Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas:** relatório de pesquisa. Brasília: BNDEs, 2012. 134 p.

International Energy Agency. Outlook for Biogas and Biomethane: Prospects for Organic Growth. **World Energy Outlook Special Report**. França. 93p. 2020.

JANG, J.; HUR, H.-G.; SADOWSKY, M.J.; BYAPPANAHALLI, M.N.; YAN, T.; ISHII, S.. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 123, n. 3, p. 570-581, 3 jul. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.13468>.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 15, p. 2299-2301, out. 1988. <https://doi.org/10.1021/ac00171a028>

KASTENHOFER, Jens; RAJAMANICKAM, Vignesh; LIBISELLER-EGGER, Julian; SPADIUT, Oliver. Monitoring and control of *E. coli* cell integrity. **Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 329, p. 1-12, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.01.009>.

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; J. PEPLIES; QUAST, C.; HORN, M.; GLÖCKNER, F.O.. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 1-11, 28 ago. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks808>.

KUNZ, A.; HIGARASHI, Martha Mayumi; DE OLIVEIRA, Paulo Armando. Tecnologias de manejo e tratamento de dejetos de suínos estudadas no Brasil. **Área de Informação da Sede-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2007.

KUNZ, A.; PALHARES, J. C. P. **A importância do correto procedimento de amostragem para avaliação das características dos dejetos suínos**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2004. 4 p. (Embrapa Suínos e Aves, Comunicado Técnico, 362).

KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; DO AMARAL, A. C. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. Embrapa Suínos e Aves-Livro científico (ALICE), 2019.

LAN, R.; KIM, I. *Enterococcus faecium* supplementation in sows during gestation and lactation improves the performance of suckling piglets. **Veterinary Medicine And Science**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 92-99, 25 nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/vms3.215>.

LARSSON, J.; LINDBERG, R.; ASPÁN, A.; GRANDON, R.; WESTERGREN, E.; JACOBSON, M. Neonatal Piglet Diarrhoea Associated with Enteroadherent *Enterococcus hirae*. **Journal Of Comparative Pathology**, [S.L.], v. 151, n. 2-3, p. 137-147, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.04.003>.

LEBRETON F., WILLEMS R.J.L., GILMORE M.S. **Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization**. In: Gilmore M.S, Clewell DB, Ikey, E.D.S. editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, p. 5-63, 2014.; pp 5-63

LIMA, Ila Fernanda Nunes et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence- related genes in a case–control study among children from north-eastern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, vol. 62, no. 5, p. 683-693, 1 May 2013. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.054262-0>

LUIZ, L. M. P. **Identificação e agrupamento genético por MLST e PFGE de isolados bacterianos obtidos de fazendas da região do Campo das Vertentes**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Disponível em <http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/467/texto%20completo.pdf?sequenc e=1> . Acessado em 10 de jan de 2019.

MAINIL, Jacques. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology And Immunopathology**, [S.L.], v. 152, n. 1-2, p. 2-12, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.032>.

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 157, n. 11, p. 2893-2902, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.051>

MATEU, E.; MARTIN, M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well?. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, v. 48, n. 8, p. 569-581, 2001. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2001.00475.x>

MEERSCHÉ, T. V. D.; RASSCHAERT, G. G.; NEST, T. T. V.V.; HAESEBROUCK, F.; HERMAN, L. L.; VAN COILLIE, E.; VAN WEYENBERG, S.; DAESELEIRE, E.; HEYNDRIKX, M. Longitudinal screening of antibiotic residues, antibiotic resistance genes and zoonotic bacteria in soils fertilized with pig manure. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 27, n. 22, p. 28016-28029, 14 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-020-09119-y>.

MESSA, R. V., MARCHESAN, C., SILVA, T. F. V., SILVA, C. R., BORTOLINI, J. O **biodigestor e seus benefícios na propriedade rural**. 2016. Disponível em <https://www.fag.edu.br/upload/revista/seagro/58348e88893f0.pdf>. Acessado em 11 de Jan de 2018.

MIELE, M., SANTOS FILHO, J. D., MARTINS, F. M., SANDI, A. J. O desenvolvimento da suinocultura brasileira nos últimos 35 anos. **Sonho, desafio e tecnologia**, v. 35, p. 85-102, 2011.

MORAN, N. A. Symbiosis. **Current Biology**. v.16, n.20, R866-71. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.019>

MOURA, S. C. N. **Identificação e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de biodigestores anaeróbios operados com dejetos suínos e com dejetos bovinos.** Dissertação. 2017. Disponível em <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/4595> . Acessado em 10 de jan de 2018.

MUNHOZ, D. D.; NARA, J. M.; FREITAS, N.C.; MORAES, C. T. P.; NUNES, K. O.; YAMAMOTO, B. B.; VASCONCELLOS, F. M.; MARTÍNEZ-LAGUNA, Y.; GIRÓN, J. A.; MARTINS, F. H.. Distribution of Major Pilin Subunit Genes Among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* and Influence of Growth Media on Expression of the *ecp* Operon. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 9, p. 1-10, 15 maio 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00942>.

NOVAIS, C., FREITAS, A. R., SILVEIRA, E., ANTUNES, P., SILVA, R., COQUE, T. M., & PEIXE, L. Spread of multidrug-resistant *Enterococcus* to animals and humans: an underestimated role for the pig farm environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.68, n.12, 2746-2754, 2013. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt289>

OBSERVATÓRIO DO CLIMA. SEEG 9—**Análise das emissões de gases de efeito estufa do Brasil (1970-2020)**. 2021. Acessível em <https://www.oc.eco.br/seeq-9-analise-das-emissoes-de-gases-de-efeito-estufa-dobrasil-1970-2020>

OIE. World Organisation Animal Health. **OIE Annual Report on Antimicrobial Agents Intended for Use in Animals**: fifth report. Paris: Oie, 2021. 136 p.

PALHARES, J. C. P. **Licenciamento ambiental na suinocultura: os casos brasileiro e mundial.** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2008. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/58228/1/doc123.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2022.

PARK, J. H.; KIM, Y. J.; KIM, B.; SEO, K. H.. Spread of multidrug-resistant *Escherichia coli* harboring integron via swine farm wastewater treatment plant. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 149, p. 36-42, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.071>.

PATON, Adrienne W.; PATON, James C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 36, no. 2, p. 598-602, 1998. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.2.598-602.1998>

PECORA, V. **Implantação de uma unidade demonstrativa de geração de energia elétrica a partir do biogás de tratamento do esgoto residencial da USP.** Estudo de Caso. Universidade de São Paulo: São Paulo, v. 18, p. 19-20, 2006.

PPM(IBGE), **Prod. Pec. Munic.**, Rio de Janeiro, v. 48, p.1-12, 2020

PRAPASAWAT, W., INTARAPUK, A., CHOMPOOK, P., NAKAJIMA, C., SUZUKI, Y., SUTHIENKUL, O. Antimicrobial resistance, integron, virulence gene, and multilocus sequence typing of *Escherichia coli* isolates from postweaning piglets with and without diarrhea. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.**, 2017, v.48, n.5, p.: 1042-1055, 2017. Disponível em <https://www.tm.mahidol.ac.th/seameo/2017-48-5/10-72735-1042.pdf>. Acesso em 20 dez 2021

REN21. **Renewables 2021 Global Status Report**. Paris: Ren21 Secretariat, 2021. 371 p. (ISBN 978-3-948393-03-8).

RENDÓN, M. A., SALDAÑA, Z., ERDEM, A. L., MONTEIRO-NETO, V., VÁZQUEZ, A., KAPER, J. B., PUENTE, J. L., GIRÓN, J. A. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 25, p. 10637-10642, 2007.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0704104104>

RENZHAMMER, R., LONCARIC, I., ROCH, F. F., PINIOR, B., KÄSBOHRER, A., SPERGSE, J., UNTERWEGER, C. Prevalence of virulence genes and antimicrobial resistances in *E. coli* associated with neonatal diarrhea, postweaning diarrhea, and edema disease in pigs from Austria. **Antibiotics**. 2020, v.9, n.4 p.: 208., 2020.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9040208>

RHOUMA, M., SOUFI, L., CENATUS, S., ARCHAMBAULT, M., BUTAYE, P. Current Insights Regarding the Role of Farm Animals in the Spread of Antimicrobial Resistance from a One Health Perspective. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 9, p. 480, 2022.  
<https://doi.org/10.3390/vetsci9090480>

ROCHA, M. C. V. **Microbiologia ambiental**. P. 260. Editora: Editora Intersaberes Edição: 1ª. 2020.

ROMA, J. C. Os objetivos de desenvolvimento do milênio e sua transição para os objetivos de desenvolvimento sustentável. **Ciência e cultura**, v. 71, n. 1, p. 33-39, 2019.

RUSSO, Thomas A.; MARR, Candace M. Hypervirulent *klebsiella pneumoniae*. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 3, p. 10.1128/cmr. 00001-19, 2019. doi: 10.1128/CMR.00001-19.

SÃO PAULO. **Decreto nº 63.296**, de 21 de março de 2018. São Paulo, SP, Disponível em: <https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/decreto/2018/decreto-63296-21.03.2018.html>. Acesso em: 23 fev. 2022.

SARTO, J. R. W.; NERES, M. A.; SUNAHARA, S. M. M.; NATH, C. D.; STANGARLIN, J. R.; SARTO, M V.M. Microbiota in swine wastewater treatment plant and area of Tifton 85 grass production. **Semina: Ciências Agrárias**. Vol. 39. No. 2, 2018, March-April, pp. 797-807, 2018. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n2p797>

SCHALCH, V. LEITE, W. C. A, CASTRO, M. C. A. A., CÓRDOBA, R. E., CASTRO, M. A. S. **Resíduos Sólidos: Conceitos, Gestão e Gerenciamento**. 1ed. Rio de Janeiro. Elsevier Editora Ltda., pag. 581, 2019.

SCHULTSZ, C. et al. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 32, no. 10, p. 2393-2397, 1994.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.32.10.2393-2397.1994>

SEBRAE-ESPM. Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas. Estudo de mercado. **Relatório**. A história da suinocultura no mundo. Disponível em:

<[http://www.sebrae.com.br/setor/carne/o-setor/suinos2/caracteristicas/a-historia-da-suinocultura-no-mundo/BIA\\_120000873](http://www.sebrae.com.br/setor/carne/o-setor/suinos2/caracteristicas/a-historia-da-suinocultura-no-mundo/BIA_120000873)>. Acesso em: 5 janabr. 202214

SHI, Lin; LIU, Naiyuan; LIU, Gang; FANG, Jun. Bacterial Community Structure and Dynamic Changes in Different Functional Areas of a Piggery Wastewater Treatment System. **Microorganisms**, [S.L.], v. 9, n. 10, p. 2134, 11 out. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9102134>.

SILVA, A. C. S.; OLIVEIRA, E. A.; MAK, R. H.. Urinary tract infection in pediatrics: an overview. **Jornal de Pediatria**, [S.L.], v. 96, p. 65-79, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2019.10.006>.

SILVA, K.C.C., CONTRETA, R.C. **Biometanização (Digestão Anaeróbia da Matéria Orgânica)**. In: SCHALCH, V. LEITE, W. C. A, CASTRO, M. C. A. A., CÓRDOBA, R. E., CASTRO, M. A. S. Resíduos Sólidos: Conceitos, Gestão e Gerenciamento. 1ed. Rio de Janeiro. Elsevier Editora Ltda., pag. 581, 2019.

SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Pré-bióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 33, n. 5, p. 983-990, out. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782003000500029>.

SILVA, Marcio M. Luis L. Busi B.; CANTÃO, Mauricio M. EgídioE.; MEZZARI, Melissa M. PaolaP.; MA, JieJ.; NOSSA, Carlos C. WolfgangW. Assessment of *Bacterial* and *Archaeal* Community Structure in Swine Wastewater Treatment Processes. **Microbial Ecology**, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 77-87, 30 nov. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-014-0537-8>.

SIMÕES e SILVA, A. C.; OLIVEIRA, E. A.; MAK, R. H.. Urinary tract infection in pediatrics: an overview. **Jornal de Pediatria**, [S.L.], v. 96, p. 65-79, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2019.10.006.79>.

SOUZA, M. L. B.; LAGE FILHO, F. A. Emprego de biodigestores anaeróbios no aproveitamento energético de resíduos animais e controle da poluição ambiental. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 1-12, jul. 2014. Disponível em: [http://revista.oswaldocruz.br/Edicao\\_03/Artigos](http://revista.oswaldocruz.br/Edicao_03/Artigos). Acesso em 20 fev 2022

SPARO, M.; DELPECH, G.; GARCÍA ALLENDE, N.. Impact on public health of the spread of high-level resistance to gentamicin and vancomycin in *Enterococci*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 3073, 2018.

SPINDLER, K.S.. Os benefícios da utilização de biodigestores no tratamento de efluentes oriundos do esgoto doméstico: uma ferramenta para gestão ambiental. **Redin-Revista Educacional Interdisciplinar**, v. 7, n. 1, p.1-17, 2018.

STERN, M. J.; AMES, G. F. L.; SMITH, N. H.; ROBINSON, E. C.; HIGGINS, C. F.. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, [S.L.], v. 37, n. 3, p. 1015-1026, jul. 1984. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90436-7](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(84)90436-7).

SUVOROV, Alexander. What is wrong with enterococcal probiotics?. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 12, n. 1, p. 1-4, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09633-y>

TAN, S.C.; CHONG, C.W.; TEH, C. S. J.; OOI, P. T.; THONG, K. L.. Occurrence of virulent multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the pigs, farmers and farm environments in Malaysia. **PeerJ**, [S.L.], v. 6, p. 1-20, 6 ago. 2018. PeerJ. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.5353>.

TORRES C, ALONSO CA, RUIZ-RIPA L, LEÓN-SAMPEDRO R, DEL CAMPO R, COQUE TM. Antimicrobial Resistance in *Enterococcus spp.* Of animal origin. **Microbiol Spectr**. V.6. n.4 2018 Jul. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018. PMID: 30051804.

TORTORA, G. J.; CASE, C.L.; FUNKE, B.R. **Microbiologia**. 12ª Edição. Artmed Editora, 2017.

TOYA, R., SASAKI, Y., UEMURA, R., SUEYOSHI, M. Indications and patterns of antimicrobial use in pig farms in the southern Kyushu, Japan: large amounts of tetracyclines used to treat respiratory disease in post-weaning and fattening pigs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 83, n. 2, p. 322-328, 2021. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0436>

VASCO-CORREA, J.; KHANAL, S.; MANANDHAR, A.; SHAH, A. Anaerobic digestion for bioenergy production: global status, environmental and techno-economic implications, and government policies. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 247, p. 1015-1026, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.004>.

VÁRADI, L., LUO, J. L., HIBBS, D. E., PERRY, J. D., ANDERSON, R. J., ORENGA, S., & GROUNDWATER, P. W. Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 16, p. 4818-4832, 2017. <https://doi.org/10.1039/C6CS00693K>

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**. v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

VIEIRA, P. H. F. Do desenvolvimento local ao ecodesenvolvimento territorial. **Revista Internacional Interdisciplinar Interthesis**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 119-141, 9 dez. 2013. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). <http://dx.doi.org/10.5007/1807-1384.2013v10n2p119>.

VILA, J.; SÁEZ-LÓPEZ, E.; JOHNSON, J. R.; RÖMLING, U.; DOBRINDT, U.; CANTÓN, R.; GISKE, C. G.; NAAS, T.; CARATTOLI, A.; MARTÍNEZ-MEDINA, M.; BOSCH, J.; RETAMAR, P.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; BAQUERO, F.; SOTO, S. *Met al. Escherichia coli*: an old friend with new tidings. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 40, n. 4, p. 437-463, 8 mar. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuw005>.

- VITAL, A. D. F. M.; DE SOUSA BARBOSA, I.; SANTOS, Á. M.; ANJOS, P. M.; , & RAMOS, H. C. Compostagem de resíduos sólidos orgânicos e produção de biofertilizante enriquecido. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 7, n. 2, p. 339-351, 2018. <https://doi.org/10.35572/rsc.v7i2.121>
- WAGLECHNER, N.; WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance: it's bad, but why isn't it worse?. **Bmc Biology**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-8, 15 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12915-017-0423-1>.
- WAGLECHNER, N.; WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance: it's bad, but why isn't it worse?. **BMC biology**. 2017, 15.1: 1-8.
- WANG, R., FENG, F., CHAI, Y., MENG, X., SUI, Q., CHEN, M., QI, K. Screening and quantitation of residual antibiotics in two different swine wastewater treatment systems during warm and cold seasons. **Science of the Total Environment**, v660, p.1542-1554. 2019.
- WANG, R.; FENG, F.; CHAI, Y.; MENG, X.; SUI, Q.; CHEN, M.; WEI, Y.; QI, K.. Screening and quantitation of residual antibiotics in two different swine wastewater treatment systems during warm and cold seasons. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 660, p. 1542-1554, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.127>.
- WHO (OMS) Scientific Working Group. *Escherichia coli* diarrhea. **Bull World Health Organ**. V.58. n.1. p.23-36. 1980
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Escherichia coli*. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>. Acesso em: 11 jun. 2022.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics. **WHO**. Geneva, Switzerland. Available online: [https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-hort\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-hort_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1). Acesso em 20 jan 2022.
- WU, B.; QI, Q.; ZHANG, X.; CAI, Y.; YU, G.; LV, J.; GAO, L.; WEI, L.; CHAI, T.. Dissemination of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes from swine farms to surroundings. **Science of the Total Environment**, [S.L.], v. 665, p. 33-40, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.272>.
- XU, W., FANG, Y., HU, Q., & ZHU, K. Emerging Risks in Food: Probiotic Enterococci Pose a Threat to Public Health through the Food Chain. **Foods**, v. 10, n. 11, p. 2846, 2021. <https://doi.org/foods10112846>
- ZANELLA, J. J. R. C.; MORÉS, N.; BARCELLOS, D. E. S. N. Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.L.], v. 51, n. 5, p. 443-453, maio 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2016000500004>.
- ZHANG, R. M.; LIU, X.; WANG, S. L.; FANG, L.- X.; SUN, J.; LIU, Y.- H.; LIAO, X. P. Distribution patterns of antibiotic resistance genes and their bacterial hosts in pig farm

wastewater treatment systems and soil fertilized with pig manure. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 758, p. 143654, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143654>.

ZHAO, J., LIU, R., SUN, Y., YANG, X., & YAO, J. Tracing *Enterococci* persistence along a pork production chain from feed to food in China. **Animal Nutrition**, v. 9, p. 223-232, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.01.005>

ZHU, N.; JIN, H.; YE, X.; LIU, W.; LI, D.; SHAH, G. M.; ZHU, Y. Fate and driving factors of antibiotic resistance genes in an integrated swine wastewater treatment system: from wastewater to soil. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 721, p. 137654, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137654>.

## APENDICE 1

Tabela 7- de Resultados do grupo de Enterobactérias

| Isolados | Espécie                      | Data de isolamento | Animal | Local     | Origem          | Def. | Genes de virulência             |
|----------|------------------------------|--------------------|--------|-----------|-----------------|------|---------------------------------|
| M4       | <i>Klebsiella aerogenes</i>  | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>AllS, Kfu</i>                |
| M5       | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ybtS, ecpA</i>               |
| M7       | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA</i>                     |
| M8       | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA</i>                     |
| M10      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA</i>                     |
| M12      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ybtS; ecpA</i>               |
| M13      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA</i>                     |
| M15      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>fimA, irp-1, ecpA, ybtS,</i> |
| M16      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ybtS, ecpA, mrkD</i>         |
| M18      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA, ybtS</i>               |
| M19      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA, ybtS</i>               |
| M20      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA ybtS</i>                |
| M21      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA, ybtS</i>               |
| M22      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA, traT</i>               |
| M23      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA, traT</i>               |
| M24      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA, ybtS, irp-1</i>        |
| M25      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA</i>                     |
| M26      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA</i>                     |
| M28      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA</i>                     |
| M29      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA</i>                     |
| M30      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA, mrkD, traT</i>         |
| M31      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>nenhum</i>                   |
| M32      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA, mrkD</i>               |
| M33      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA, traT</i>               |
| M34      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ybtS</i>                     |
| M35      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA, traT</i>               |
| M36      | <i>Escherichia coli</i>      | 2019               | Suíno  | Fazenda A | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA,</i>                    |
| M131     | <i>Escherichia coli</i>      | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  | <i>nenhum</i>                   |
| M148     | <i>Escherichia coli</i>      | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  | <i>ecpA</i>                     |
| M156     | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  | <i>AllS, Kfu, rmpA, mrkA</i>    |
| M157     | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  | <i>AllS, Kfu, rmpA</i>          |

Fonte: autora| NE\*: Não encontrado

## APÊNDICE 2

Tabela 8- Resultados do grupo de *Enterococcus*

(continua)

| Isolado | Espécie                           | País   | Date de isolamento | Animal | Local     | Origem          | Def. |
|---------|-----------------------------------|--------|--------------------|--------|-----------|-----------------|------|
| M57     | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M61     | <i>Enterococcus avium</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M62     | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M63     | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M64     | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M65     | <i>Enterococcus asini</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M66     | <i>Enterococcus pseudoavium</i>   | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M70     | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M74     | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M80     | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M81     | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M82     | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M84     | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M88     | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M89     | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M90     | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M91     | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M92     | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M94     | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M95     | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M96     | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M98     | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M104    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M106    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M107    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M115    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M117    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M118    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M119    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M120    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M121    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M122    | <i>Enterococcus faecalis</i>      | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M123    | <i>Enterococcus casseliflavus</i> | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M124    | <i>Enterococcus casseliflavus</i> | Brasil | 2020               | Suíno  | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |

Tabela 8- Resultados do grupo de *Enterococcus*

(conclusão)

| Isolado | Espécie                           | País   | Date de isolamento | Animal         | Local     | Origem          | Def. |
|---------|-----------------------------------|--------|--------------------|----------------|-----------|-----------------|------|
| M125    | <i>Enterococcus casseliflavus</i> | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M126    | <i>Enterococcus casseliflavus</i> | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M127    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M127    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M128    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M128    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M129    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M130    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M132    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M133    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M136    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M137    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M138    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M139    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M140    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M143    | <i>Enterococcus casseliflavus</i> | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M145    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M146    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M149    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M151    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M152    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M153    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M154    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M155    | <i>Enterococcus casseliflavus</i> | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M158    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M160    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M161    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M162    | <i>Enterococcus casseliflavus</i> | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M163    | <i>Enterococcus casseliflavus</i> | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M165    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M166    | <i>Enterococcus durans</i>        | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M167    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M170    | <i>Enterococcus faecium</i>       | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |
| M171    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Brasil | 2020               | Dejetos Suínos | Fazenda B | Biofertilizante | MDR  |

Fonte: autora | NE\*: Não encontrado