

**Gislaine Fongaro**

**HIGIENIZAÇÃO DE DEJETOS SUINÍCOLAS VISANDO  
RECICLO AGRÍCOLA SANITARIAMENTE SEGURO**

Tese apresentada ao Programa de  
Biotecnologia e Biociências da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutor em Biotecnologia e Biociências

Orientadora: Prof. Dra. Célia R. M.  
Barardi

Coorientador :Prof. Dr. Airton Kunz

Florianópolis-SC  
2016



Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fongaro, Gislaine  
HIGIENIZAÇÃO DE DEJETOS SUINÍCOLAS VISANDO RECICLO  
AGRÍCOLA SANITARIAMENTE SEGURO / Gislaine Fongaro ;  
orientadora, Célia Regina Monte Barardi ; coorientadora,  
Airton Kunz. - Florianópolis, SC, 2016.  
244 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Saúde Única. 3.  
Dejetos suinícolas. 4. Patógenos entéricos. 5. Reciclo  
agrícola. I. Barardi, Célia Regina Monte. II. Kunz, Airton.  
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.



**"Higienização de dejetos suínicos visando reciclo agrícola sanitariamente seguro Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Suínos e Aves"**

Por

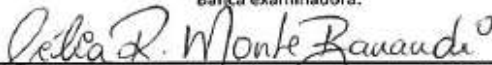
**Gislaine Fongaro**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (25/PPGBTC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.

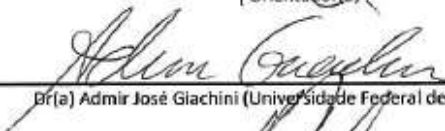


Prof(a). Dr(a). Mario Steindel  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



Dr(a) Célia Regina Monte Barardi (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



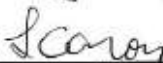
Dr(a) Admir José Giachini (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Edmundo Carlos Grisard (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Hugo Moreira Soares (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Luizinho Caron (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Suínos e Aves)



Dr(a) Cleverson Vitorio Andreoli (Companhia de Saneamento do Paraná, Assessoria de Pesquisa e Desenvolvimento)

Florianópolis, 05 de Setembro de 2016.



*À minha querida família:  
Orivil, Marlene, Priscila, Mateus, Théo, “Sementinha” e Jamir.*





## AGRADECIMENTOS

Com todo meu coração, agradeço:

**Ao Pai Celeste** que me ilumina, que me dá forças e luz;

**À minha família, minha base: Pai, Mãe, Mateus, Pri, Roger, Théo e Pequena Sementinha** (titia os ama), vocês são minha segurança e prova que o trabalho e a persistência eleva a alma!

**Ao meu noivo Jamir** pelo companheirismo, amor, olhar e compreensão durante todo meu processo acadêmico (desde o primeiro semestre universitário). Essa história também é sua, meu doce.

**À Dra. Célia Barardi**, minha orientadora, que além de confiar plenamente em mim, me permitiu sonhar mais, me permite ter os pés no chão e tocar as estrelas.

Gratidão eterna (...és sol, sou lua...)!

**Ao Dr. Airton Kunz** que me orientou, me aconselha e com alegria confiou no meu trabalho, possibilitando os sonhos acontecerem;

**À Dra. Maria Elisa Magri**, minha tão querida amiga, orientadora, conselheira e parceira na vida pessoal e científica... estar ao seu lado é um prazer, uma dádiva.

**À Dra. Maria Cruz García González, Dr. David Rodríguez-Lazzaro e Dra. Marta Hernández Peres** do *Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León* por receber-me tão bem, permitir dias tão intensos e inesquecíveis;

**Aos amigos e todos os colegas do LVA-UFSC** (2010-2016), mas principalmente aos que me receberam com amor e carinho, sempre com mãos estendidas (Aline Viancelli, Lucas “Abú”, Mari Nascimento e Mari Rangel), bem como aos irmãos que encontrei aqui (Ana “Bergigã”, Ana “Z”, Ariadne, Annelise, Carlos, Clarissa, Camila, Doris, Elizabet, Henrique, Mahdy, Izabella, Lara, Lucas “Abú”, Lucas Maróstica, Naira e Vanessa) obrigada pelas sábias palavras diárias e risos relaxantes.

**Todos os professores do MIP**, pela ajuda constante, apoio e ânimo;

**À Tuti** por me ensinar leis de sobrevivência e por topar qualquer trabalho em qualquer dia e hora. Divirto-me muito ao seu lado.

Às minhas queridas **co-orientadas Camila e Ana**, foi um enorme prazer, vcs sabem. Tenho certeza que a semente foi lançada e está germinado...

Aos meus queridos amigos **espanhóis e brasileiros na Espanha: Amana, Marina, Jaime, Bernar, David (becário), Narciso, Itxaso e Mônica...** sem vocês tudo seria mais difícil nas terras europeias (“*y com tus recuerdos partir é...*”).

À **amável Prof. Dra. Maria Célia Lanna**, que me adotou e me ajuda na caminhada dessa vida: “*se você fosse instrumento musical seria doce como violino e forte como um piano*”.

À **Prof. Dra. Cláudia Simões**, por ensinar-me diariamente, bastando apenas o olhar sábio.

Vocês dois, **Dani e Mário**, que tanto me apoiam e querem sempre ver meu sucesso.

À **Sandra** querida... que me acolheu e deixa meus dias mais leves com tanta ternura.

À **Universidade Federal de Santa Catarina, ao MIP-UFSC, ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências -UFSC, à Embrapa, ao GESAD, ao ITACyL, ao CNPq, à CAPES e CAPES-PNPd...** agradeço o fomento e portas abertas...

**Por fim, mas igualmente importante:**

**Ao povo brasileiro**, sou grata por permitir minha formação e a este povo quero retribuir, oferecendo trabalho, moral e ética ao nosso país.

*“Se vi mais longe foi por estar  
sobre ombros de gigantes”*

Isaac Newton (1676)



## RESUMO

A cadeia produtiva de suíno precisa rever com frequência seu planejamento, priorizando ações que visem sustentabilidade da atividade. Assim os biodigestores anaeróbios (BA) do tipo “Lagoa Coberta”, destacam-se pela capacidade de geração e armazenamento de biogás a partir de dejetos suínos, bem como de gerar um digestato final utilizado na fertilização de solos e pastagens. Já os tratamentos de dejetos em reatores biológicos aeróbios (RBA) seguidos de sedimentação, visam a estabilização dos dejetos e sua segregação entre fase líquida (água residuária) e fase sólida (lodo). Os sistemas de tratamentos de dejetos caracterizam-se por gerar grandes volumes de efluentes finais e lodos acumulados que podem ser reciclados na agricultura. No entanto pouco se sabe da implicação destes efluentes e lodos no que se refere à segurança sanitária. Esta tese doutoral teve como objetivo “*Avaliar a higienização de dejetos suínola em sistemas de tratamentos atuais, bem como prospectar métodos alternativos que visem o reciclo agrícola seguro desses dejetos como fertilizantes*”. Para isso, as atividades foram divididas em três etapas: 1) Monitoramento de patógenos entéricos em dejetos suínolas tratados e não tratados em BA e RBA seguido por sedimentação; 2) Higienização de digestatos por meio de estocagem em temperaturas tropicais, bem como prospecção de sanitizantes que visassem melhorar o aspecto sanitário e agrônômico dos digestatos; 3) Avaliação *ex situ* do comportamento dos patógenos em solos fertilizados com digestato suínola. Os resultados obtidos apresentaram a ineficiência dos BA do tipo “Lagoa Coberta” frente à inativação de patógenos entéricos virais (rotavírus, circovírus e adenovírus porcino) em dejetos suínolas, mas por outro lado apresentaram a capacidade desses patógenos, incluindo *Salmonella enterica* – Typhimurium, sedimentarem rapidamente durante a decantação do efluente suínola tratado em RBA, deslocando-se da fase líquida e concentrando-se na fase sólida onde permaneceram infecciosos (processo de sedimentação); No que se referiu a estabilidade temporal de patógenos entéricos frente às temperaturas ambientes (16 e 37°C) houve inativação promissora em efluente e lodo suínola estocado em temperaturas de 22 e 37°C (ocorridas durante estação de verão em países de clima tropical); No que se referiu à prospecção de sanitizantes,

dos aditivos testados (CaO, cinzas, ureia, casca de ovos e CaCO<sub>3</sub>, bem como sua mistura), sempre que houve presença de ureia a concentração de amônia livre aumentou em função do pH e os patógenos entéricos virais e bacterianos (bacteriófagos PHIX\_174 e MS2, adenovírus humano, *S. enterica* e *E. coli*) foram melhor reduzidos ( $\geq 99,9\%$ ) se comparados aos tratamentos baseados somente na adição de cinza e CaO. Essa inativação promissora na presença de ureia não ocorreu com os ovos de *Ascaris lumbricoides* testados, pois esses não reduziram ao longo dos primeiros 90 dias em nenhum dos tratamentos avaliados; Quando patógenos entéricos virais e bacterianos foram avaliados quanto ao comportamento em solos argilosos e arenosos fertilizados com digestato suinícola, os resultados mostraram menor estabilidade desses patógenos em solos argilosos e maior percolação e lixiviação a partir de solos arenosos ( $p \leq 0,05$ ). Espera-se que esses resultados auxiliem a suprir as demandas alimentícias nacionais e internacionais, por meio da prospecção de fertilizantes, considerando que há necessidade de sustentabilidade na gestão dos resíduos gerados na cadeia produtiva de suínos e outros animais visando seu reciclo agrícola e segurança sanitária no âmbito “Saúde Única”.

**Palavras-chave:** Dejetos suinícolas; Patógenos Entéricos, Higienização, Fertilizantes, Sustentabilidade, Alimentos. .

## ABSTRACT

The swine production chain frequently needs review their planning, prioritizing actions aimed at sustainability of the activity. So the anaerobic digesters (AD) of the "Lagoon", distinguished by generation capacity and biogas storage from pig manure and to generate a final digestate used in the fertilization of soils and pastures. As for the waste treatment in aerobic biological reactors (ABR) followed by sedimentation, are used to stabilize the waste and its segregation between liquid phase (wastewater) and solid phase (sludge). Swine treatment systems are characterized by generating large volumes of effluent and final sludge, that it can be recycled in agriculture. However little is known about the sanitary security of effluents and sludge. This doctoral thesis aimed to "*assess the hygiene in swine manure current treatments systems, as well as to seek alternative methods aimed at safe agricultural recycling of these wastes as fertilizer*". For this, activities were divided into three stages: 1) Monitoring of enteric pathogens in treated pig manure and untreated in BA and RBA followed by sedimentation; 2) Hygienization of digestate by storage in temperatures of tropical areas, as well as prospecting sanitizers that aimed to improve the health and agronomic aspect of digestate; 3) *Ex situ* evaluation of pathogens behavior in fertilized soil with swine digestate. The results showed the inefficiency of AD against the inactivation of viral enteric pathogens (rotavirus, circovirus and porcine adenovirus) in swine waste, but on the other hand showed settling of these pathogens, including *Salmonella enterica* - Typhimurium, during the decanting of swine effluent treated in ABR, moving the liquid phase to solid, where they remained infectious (sedimentation process); Temporal stability of enteric pathogens was promising inactivation in effluent and swine slurry stored at 22 and 37°C (summer temperatures in tropical areas). For hygienization of digestate CaO, ash, urea, eggshells and CaCO<sub>3</sub>, as well as their mixture, were tested as additives. The urea presence increased the free ammonia concentration in function of pH. The viruses and bacteria pathogens were reduced in ≥99,9% compared to only treatments based on the addition of ash and CaO. This promising inactivation in the presence of urea did not occur with the eggs of *Ascaris lumbricoides* tested because these have not reduced over the first 90 days in any of the evaluated treatments; When viral enteric

pathogens and bacterial were assessed for behavior in clay and sandy soils fertilized with swine digestato, the results showed lower stability of these pathogens in clayey soils and higher percolation and leaching from sandy soils ( $p = 0.05$ ). It is hoped that these findings assist to meet the national and international food demands, through the exploration of fertilizers, considering the sustainability and waste management of waste from animal production, aiming its agricultural recycling and health security under "*One Health*" concept.

Keywords: Swine waste; Enteric pathogens, Hygiene, Fertilizers, Sustainability, Food.



## LISTA DE FIGURAS

|   |     |
|---|-----|
| Figura 1: Esquema do conceito "Saúde Única".....  | 30  |
| Figura 2: Diagrama esquemático de um Biodigestor Anaeróbico do Tipo Lagoa Coberta. ....   | 40  |
| Figura 3: Resumo das fases do processo de biodigestão anaeróbia.....  | 42  |
| Figura 4: Fluxograma representativo do processo de sedimentação em tratamento de excretas humanas e animais.....  | 44  |
| Figura 5: Delineamento experimental de execução da presente tese doutoral, organizada em cinco capítulos, os quais foram executados em três etapas. ....  | 69  |
| Figura 6: Valores médios da quantificação dos vírus entéricos detectados nas amostras durante inverno e verão, sendo a) Amostras correspondentes ao Afluente e b) Amostras correspondentes ao Efluente. ....  | 88  |
| Figura 7: Distribuição sazonal viral (PCV-2, PAdV e RVA) durante inverno e verão (n=24 para afluente e n=16 para efluente ). PCV2 e PAdV foram positivamente correlacionados durante verão (*). ....  | 89  |
| Figura 8: Quantificação de PCV-2 infecciosos e seu genótipo em afluente e efluente coletados no verão (a) e no inverno (b).....   | 91  |
| Figura 9: Diferença de genomas totais e proveniente de PCV-2, expressa pela redução média obtida calculada pela equação: $\text{Log. de redução} = \log_{10} \text{Nt}/\text{N0}$ , onde Nt: CG quantificadas por ICC-RT-qPCR (PCV-2 infecciosos) e N0: CG quantificadas por qPCR. (CG). .... | 92  |
| Figura 10: Representação esquemática da ETDS e dos locais amostrados: A) RBA e B) efluente do TSS.....  | 109 |
| Figura 11: a) Ocorrência de PAdV, PCV2 e RVA durante o inverno e o verão em amostras provenientes do RBA e TSS. b) Eficiência da remoção viral após processamento em TSS, em que ** indica remoção significativa. ....  | 114 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 12: Cinética de inativação de PhiX-174, HAdV-2 e <i>S. Typhimurium</i> em contato com a fração líquida (a) e a fração sólida (b) do processo de sedimentação e a taxa de inativação destes patógenos entéricos..... | 116 |
| Figura 13: Perfil da sedimentação de partículas sólidas em suspensão, de PhiX-174, HAdV-2 e <i>S. entérica</i> em efluente suíno durante 120h de sedimentação, na fração líquida (a) e na fração sólida (b). .....         | 119 |
| Figura 14: Representação esquemática do desenho experimental do presente Capítulo. ....  | 137 |
| Figura 15: Avaliação da inativação de <i>S. enterica</i> (UFC mL <sup>-1</sup> ) em efluente e lodo suínico estocado em temperatura tropicais. a) 16 e 22°C e b) 37 °C.....  | 140 |
| Figura 16: Avaliação da inativação de HAdV-2 (GC mL <sup>-1</sup> ) em (a) efluente e (b) lodo suínico estocado em temperatura tropicais. ....   | 141 |
| Figura 17: Avaliação da inativação de PhiX-174 (UFP mL <sup>-1</sup> ) em (a) efluente e (b) lodo suínico estocado em temperatura s tropicais.....   | 142 |
| Figura 18: Perfil de pH nos diferentes tratamentos no efluente (A) e lodo (B), em função do tempo.....   | 164 |
| Figura 19: Variação e média de NAT em cada um dos tratamentos e seus respectivos controles. ....   | 165 |
| Figura 20: Concentração de <i>S. enterica</i> nos tratamentos testados ao longo do tempo. A) Efluente; B) Lodo; C) Controle em tampão 7,0 e 9,0. ....  | 170 |
| Figura 21: Concentração de <i>E. coli</i> nos tratamentos testados ao longo do tempo. A) Efluente; B) Lodo; C) Controle em tampão 7,0 e 9,0. ....  | 172 |
| Figura 22: Concentração de PhiX-174 (1), MS2 (2) e HAdV (3) nos tratamentos testados ao longo do tempo. A) Efluente; B) Lodo; C) Controle em tampão 7,0 e 9,0.   | 176 |
| Figura 23: Correlação linear entre o k dia <sup>-1</sup> de HAdV-2, PhiX-174, MS2, <i>S. enterica</i> e <i>E. coli</i> em função da concentração de N-NH <sub>3</sub> em digestato suínico.....                            | 183 |

- Figura 24: Desenho esquemático do experimento conduzido ex situ realizado com solos argilosos e arenosos em colunas de 60 cm, onde a estabilidade, a percolação e a lixiviação dos patógenos foram avaliadas. .... 210
- Figura 25: Estabilidade de patógenos entéricos modelos em A) solo argiloso e B) solo arenoso por até 120 dias após a biofertilização com digestato suíno contaminado. . (□) *E.coli* O157:H7, (×) *S. enterica*, (\*) PhiX-174 e (∇) vMCo. .... 216
- Figura 26: Perfil de percolação em função do tempo de *E.coli* O157:H7, *S. enterica*, vMCo e PhiX em: (×) 10, (□) 20, (\*)30, (∇) 40 e (○) 50 cm de profundidade em solos fertilizados com digestato suinícola. A) solo argiloso e B) solo arenoso. .... 220
- Figura 27: Perfil de lixiviação dos patógenos entéricos após evento de precipitação natural. (---) *S.enterica*, (---) *E. coli* O157:H7, (—) vMCo e (—) PhiX-174. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ..... 224



## LISTA DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 1: Média e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos avaliados nas amostragens. (n = 40 e diferenças estatísticas consideradas de $p \leq 0.05^*$ ). .....   | 86  |
| Tabela 2: Médias e desvios padrões (DP) dos parâmetros físico-químicos avaliados no RBA e TSS durante o inverno e verão. ....  | 113 |
| Tabela 3: Média de iT90 e sT90 h-1 de HAdV-2, PhiX-174 and <i>S. Typhimurium</i> em efluente e lodo da ETDS. ....  | 121 |
| Tabela 4: Médias e desvios padrões (DP) dos parâmetros físico-químicos avaliados (n=5) durante a estocagem do efluente e lodo suínicola nas diferentes temperaturas avaliadas. ....                                | 139 |
| Tabela 5: Média T90 do HAdV-2, PhiX-174 e <i>S. enterica</i> em efluente e lodo estocado a 16, 22 e 37°C. ....   | 143 |
| Tabela 6: Descrição dos 11 tratamentos e 4 controles testados em efluente e lodo suínicola, onde “X” representa se efluente e lodo foram estudados. ....   | 159 |
| Tabela 7: Média de NAT, pH e amônia não-ionizada durante os 90 dias de tratamento. ....  | 166 |
| Tabela 8: Concentração média de N-NH <sub>3</sub> obtido em cada tratamento, <i>k</i> dia-1 e iT90 dos patógenos avaliados (-) Não se aplica. ....   | 181 |
| Tabela 9: Características agronômicas de micronutrientes, macronutrientes e metais a partir do efluente e lodo suínicola higienizado, comparados com os teores mínimos e máximos exigidos na IN 25/2009. ....      | 186 |
| Tabela 10: Parâmetros físico-químicos do solo argiloso e arenoso (anteriormente e posteriormente a fertilização). ....   | 214 |
| Tabela 11: Valor de iT90, de $-k$ e coeficiente de correlação ( $r^2$ ) dos patógenos entéricos estudados em solos fertilizados com digestato suínicola (argiloso e arenoso) em função do tempo. ....              | 218 |
| Tabela 12: Potencial de percolação (Grupo “a”) e recepção (Grupo “b”) dos patógenos entéricos avaliados ( <i>k</i> dias-1) nos solos em função do tempo, com tendência linear e logarítmica, respectivamente. .... | 222 |



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg - Micrograma

µL - Microlitro

A549 – Células epiteliais de carcinoma de pulmão humano

ATCC - American Type Culture Collection

BA – Biodigestor anaeróbico do tipo “Lagoa Coberta”

CC - Ciclo completo

CCL – Lista de candidatos a contaminantes

CG – Cópias genômicas

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

COM- Casca de ovos moída

CT: Ciclo de terminação

CZ - Cinza

DMEM - Dulbecco's modified Eagle medium

DNA – Ácido desoxirribose nucleico

ECP – Efeito citopático

et – Tratamento enzimático

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

HAdV – Adenovírus humano

HAdV-2 – Adenovírus humano sorotipo 2

ICC – Cultura celular integrado

MEM – Minimum essential medium Eagle

mL - Mililitro

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NAT - Nitrogênio amoniacal total  
N-NH<sub>3</sub> – Amônia não-ionizada  
NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - Íon amônio  
OMS- Organização Mundial da Saúde  
PBS - Solução tampão fosfato-salina  
pH – Potencial hidrogeniônico  
*pKa* – Constante de dissociação  
qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativo  
RBA – Reator biológico aeróbio  
RNA – Ácido ribonucleico  
RT – Transcrição reversa  
SFB – Soro fetal bovino  
ST - Sólidos totais  
*ST* – Células de Testículo Suíno  
TA - temperatura amostral  
TRH – Retenção hidráulica  
U – Ureia  
UFC – Unidade Formadora de Colônia  
UFP – Unidade Formadora de Placa  
U.V. – Ultravioleta  
UPL - Unidade de produção de leitões  
EPA – United States Environmental Protection Agency



## SUMÁRIO

|   |            |
|---|------------|
| <b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL</b>  |            |
| 1.1 A prática da suinocultura no Brasil   | 27         |
| 1.2 Segurança Sanitária no reciclo de dejetos suínocolos no âmbito “Saúde Única”  | 29         |
| 1.3 Patógenos entéricos e microrganismos biomarcadores  | 32         |
| 1.4 Tratamentos de Excretas com Ênfase na Suinocultura  | 36         |
| 1.5 Fatores de inativação de patógenos entéricos aplicados na higienização de excretas  | 44         |
| 1.6 Referências utilizadas na contextualização  | 49         |
| <br>  |            |
| <b>2. APRESENTAÇÃO E ABORDAGEM DA PRESENTE TESE DOUTORAL</b>  | <b>67</b>  |
| <br>  |            |
| <b>3. OBJETIVO GERAL</b>  | <b>73</b>  |
| <b>4. HIPÓTESES</b>   | <b>75</b>  |
| <br>  |            |
| <b>- CAPÍTULO I –</b>   | <b>77</b>  |
| <i>Patógenos entéricos como biomarcadores de qualidade sanitária de dejetos suínocolos brutos e tratados em biodigestor anaeróbio para fins de uso agrícola</i> | <b>77</b>  |
| a) Objetivo específico  | 79         |
| b) Metodologia  | 80         |
| c) Resultados   | 85         |
| d) Discussão  | 92         |
| e) Considerações finais do Capítulo I   | 96         |
| f) Referências do Capítulo I  | 97         |
| <br>  |            |
| <b>- CAPÍTULO II –</b>  | <b>105</b> |
| <i>Remoção de patógenos entéricos em dejetos suínocolos tratados em sistema aeróbio: reciclo de água e lodo</i>   | <b>105</b> |
| a) Objetivo específico  | 106        |
| b) Metodologia  | 107        |
| c) Resultados   | 112        |
| d) Discussão  | 98         |

|  |            |
|--|------------|
| e) Considerações finais do Capítulo I  | 112        |
| f) Referências do Capítulo I   | 113        |
| <b>-CAPÍTULO III-</b>  | <b>135</b> |
| <b><i>Higienização de digestato suinícola por estocagem em temperaturas de regiões tropicais</i></b> | <b>135</b> |
| a) Objetivo  | 136        |
| b) Metodologia   | 136        |
| c) Resultados  | 138        |
| d) Discussão   | 144        |
| e) Considerações finais do <i>Capítulo III</i>   | 146        |
| <br>   |            |
| <b>-CAPÍTULO IV-</b>   | <b>155</b> |
| <b><i>Prospecção de sanitizantes para desinfecção de efluentes e lodos suinícolas</i></b>            | <b>155</b> |
| a) Objetivo  | 156        |
| b) Metodologia   | 156        |
| c) Resultados  | 163        |
| d) Discussão   | 188        |
| e) Considerações finais do <i>Capítulo IV</i>  | 196        |
| f) Referências utilizadas no Capítulo V  | 177        |
| <br>   |            |
| <b>- CAPÍTULO V –</b>  | <b>205</b> |
| <b><i>Comportamento de patógenos entéricos em solos fertilizados com digestato suinícola</i></b>     | <b>205</b> |
| a) Objetivo específico   | 206        |
| b) Metodologia   | 206        |
| c) Resultados  | 213        |
| d) Discussão   | 225        |
| e) Considerações finais do <i>Capítulo V</i>   | 227        |
| f) Referências utilizadas no Capítulo V  | 229        |
| <br>   |            |
| <b>5. SUMÁRIO DE RESULTADOS/CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>   | <b>234</b> |
| <b>6. ESTUDO FUTUROS</b>   | <b>237</b> |
| <b>7. OUTRAS ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O DOUTORAMENTO</b>  | <b>239</b> |

## **1. CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL**

### **1.1 A prática da suinocultura no Brasil**

Majoritariamente no Brasil a linha de produção de suínos é a industrial ou tecnificada, estando dividida nos ciclos de criação dos suínos, podendo ser: a) Ciclo Completo (CC), que consiste em uma unidade de produção em que existem todas as fases do ciclo reprodutivo (nascimento à engorda), sendo atualmente pouco utilizada; b) Unidade de Produção de Leitões (UPL), que consiste na criação de suínos em fase reprodutiva, onde ocorre o nascimento dos leitões e fase inicial de crescimento; c) Unidade de Crescimento e Terminação para abate (CT), fase caracterizada pela engorda dos suínos e encaminhamento para o abate, com suínos que possuem entre 25 a 100 Kg (HEIDEN, 2006; SOUZA et al., 2013).

Com a criação tecnificada de suínos, o Brasil se destacou como o quarto maior produtor mundial de carne suína atualmente, segundo o UDPA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, 2013) por produzir mais de 3,3 milhões de toneladas de carne suína ao ano (dados de 2013), ficando atrás do plantel chinês (54,9 milhões de toneladas em 2013), do plantel da União Europeia (22,3 milhões de toneladas) e dos Estados Unidos (10,5 milhões de toneladas no ano de 2013). Assim, a suinocultura no Brasil é uma das atividades com maior impacto na economia, sendo o estado de Santa Catarina responsável pela produção de 19% do efetivo suinícola nacional (IBGE, 2013).

Por outro lado, com a produção em larga escala em sistemas confinados, com média de 400 animais por unidades, a atividade suinícola vem sendo reportada pelo seu impacto ambiental, já que é estimado que para produção de 1 Kg de carne suína há demanda de 6 m<sup>3</sup> de água; Também, como consequência desse modelo produtivo, há grande acúmulo de dejetos diários nas áreas produtivas. Cerca de 5-10 L de dejetos são gerados por animais/dia, dependendo esse volume do ciclo de criação dos animais. Os dejetos suinícolas são constituídos por uma mistura de fezes e urina, juntamente as águas de lavagem, resíduos de alimentos (ração), água de vazamento de bebedouros e águas utilizadas na higienização das instalações (PALHARES, 2011).

Os dejetos gerados na suinocultura são amplamente utilizados para melhorar a condição nutricional dos solos, sendo, portanto dispostos no ambiente. No entanto, mesmo conhecendo essa prática o Brasil ainda não possui uma legislação específica para reciclo de dejetos animais, configurando assim uma lacuna no que diz respeito ao risco sanitário no reciclo dos dejetos suinícolas (GABUTTI et al., 2000; Rede Nacional de Capacitação e Extensão Tecnológica em Saneamento Ambiental – ReCESA, 2008).

Sobre a importância de utilizar dejetos animais na abonação de solos, destaca-se que a agricultura mundial deverá ampliar em 80% a produção de alimentos até 2050 para suprir as necessidades da população, que deve atingir a marca de 9,7 bilhões de pessoas segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2014). As mesmas estimativas da FAO apontam que até 20130 haverá aumento do consumo mundial de alimentos em relação ao que é produzido atualmente, em média um aumento de 47% de carne suína,

55% de carne de frango e 34% de carne bovina, além de alimentos como açúcar, milho, arroz e soja. Especialmente para a agricultura brasileira, o desafio reside em aumentar a produção conciliando sustentabilidade ambiental e decréscimo da pobreza e desigualdade social. Mundialmente o Brasil apresenta expressivo potencial para contribuir com a produção alimentar do planeta, requerendo portanto grandes quantidades de fertilizantes para suprir tais demandas.

## **1.2 Segurança Sanitária no reciclo de dejetos suinícolas no âmbito “Saúde Única”**

O conceito “*One Health*” ou “Saúde Única” é o conjunto de estudos ligados à área da medicina humana e animal com a conservação e desenvolvimento do meio ambiente (BERKES et al., 2012). Nesse contexto o conceito “Saúde Única” se define como uma adição de valores e conhecimentos da saúde humana e animal, para economizar e melhorar os serviços ambientais, sendo isso possível pela junção de áreas, profissionais e instituições, sendo possível pela aliança, no final dos anos 90, entre Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial de Sanidade Animal (NGUYEN-VIET et al., 2015).

Dentre as estratégias do conceito de “Saúde Única” se considera como prioridade o controle de patógenos zoonóticos (NGUYEN-VIET et al., 2015). Nesse aspecto, a preocupação com a segurança sanitária na

produção animal é relevante, uma vez que são muitos os organismos que oferecem riscos para a saúde humana, animal e do ambiente como um todo, destacando-se os agentes patogênicos como vírus, bactérias e parasitas causadores de zoonoses (HUNDESA et al., 2009). Nesse sentido o conceito de “Saúde Única” é aplicável no reciclo dos dejetos suínos e seus derivados. A **Figura 1** esquematiza a abordagem geral do conceito “Saúde Única”.

**Figura 1: Esquema** do conceito "Saúde Única".



Destacam-se entre os microrganismos presentes no efluente suíno as bactérias, incluindo a *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. encontradas no trato intestinal de seres humanos e de outros animais de sangue quente e eliminadas em uma concentração aproximada de  $10^6$  bactérias por grama de fezes (ZIEMER et al., 2010; TORTORA, FUNKE; CASE, 2012). Os vírus geralmente representam maior fator de risco e resistência, na produção animal, o que os coloca como potenciais

indicadores de condições sanitárias , como o caso dos circovírus, rotavírus e outros vírus entéricos (ZIEMER et al., 2010). Mesmo a variabilidade de patógenos que podem estar presentes em efluentes, as bactérias geralmente são utilizadas como microrganismos de escolha no monitoramento e estudo de desinfecção nas matrizes (HSU et al., 2007), no entanto sabe-se que a presença de bactérias não está correlacionada com a presença de vírus, protozoários e ovos de helmintos, por exemplo (BOSCH, 2008). A pesquisa por vírus ambientais vem ganhando relevância, tendo em vista a necessidade da melhoria da qualidade dos ambientes e principalmente dos recursos hídricos (FONG & LIPP, 2005; BOSCH et al., 2008). Os vírus entéricos ambientais são aqueles presentes no trato gastrointestinal humano e animal, que podem ser eliminados nas fezes e urina em altas concentrações, e que, normalmente são introduzidos no meio ambiente pelo uso de resíduos de atividades industriais e agrícolas, bem como pelo despejo de dejetos não tratados, ou tratados ineficientemente, que acabam acometendo os corpos de água. (FONG & LIPP, 2005; DJIKENG et al., 2009).

A implementação de tratamentos eficientes na remoção de patógenos dos efluentes e lodos gerados em sistemas de tratamentos de excretas é necessária, colaborando na manutenção da saúde humana e animal (WHO, 2009). No que diz respeito ao tratamento de dejetos da suinocultura, os biodigestores anaeróbios constituem uma alternativa que possibilita a recuperação e armazenamento de biogás, assim como os reatores do tipo UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), os quais podem ser utilizados como uma fonte renovável para fins de geração de energia e o efluente gerado é comumente utilizado na irrigação e

biofertilização de lavouras (OLIVEIRA & HIGARASHI, 2006). No entanto, pouco se sabe acerca da caracterização microbiológica destes efluentes no quesito sanitário (KUNZ et al., 2009).

No que diz respeito à legislação nacional sobre o reciclo de derivados suínicos na agricultura, como biofertilizante e na fertirrigação, a Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina (FATMA), por meio da Instrução Normativa da Suinocultura – IN 11 FATMA (SANTA CATARINA, 2004), recomenda uma estocagem prévia mínima de 120 (cento e vinte) dias, em unidades dotadas de revestimento (esterqueiras), quando não houver sistema de tratamento dos dejetos, porém não aborda a qualidade sanitária do produto nem indica potenciais agentes contaminantes. Nessa mesma IN considera-se um limite de aplicação do dejetos suínico no solo de 50 m<sup>3</sup>/ha/por ano, considerando a necessidade nutricional do solo e do cultivo que se pretende realizar, baseando-se na demanda de nitrogênio e fósforo de ambos.

### **1.3 Patógenos entéricos e microrganismos biomarcadores**

Patógenos entéricos são reconhecidos por serem estáveis e prevalentes em diversos ambientes, podendo acometer humanos e animais (WHO, 2008). Nesse sentido é extremamente importante o desenvolvimento, melhoramento e aplicação de técnicas que visem à higienização das excretas, principais fontes de transmissão e contaminação de ambientes. Para avaliar a eficiência da desinfecção de excretas os patógenos entéricos passivos de enumeração são



amplamente utilizados (MOE & RHEINGANS, 2006), e assim utilizados como biomarcadores (BITTON, 1999; BOSCH et al., 2009).

O uso de bactérias entéricas como indicadoras e biomarcadoras de contaminação fecal é muito frequente em todo o mundo, normalmente sendo representadas pelas *E. coli*, enterococos (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium* e *E. gallinarum*) e estreptococos. Estas, por serem bactérias gram-positivas, possuem uma parede celular mais resistente às temperaturas mesofílicas, sendo mais dificilmente inativadas quando comparadas às bactérias gram-negativas (mais comuns entre as bactérias patogênicas) (BITTON, 1999). *Salmonella* spp. é frequentemente encontrada em excretas humanas e animais. É caracterizada como uma bactéria gram-negativa que coloniza o trato intestinal humano e animal, sendo considerada zoonótica (GRIFFITH et al., 2006). Comparada a outras bactérias entéricas, o gênero *Salmonella* é prevalente em suínos (VENGLOVSKY et al., 2006), possui capacidade aumentada de sobrevivência em meio livre e pode ser re-ativada no ambiente, dependendo de temperatura, nutriente, umidade e pH (GRIFFITH et al., 2006). Assim, essa bactéria é considerada um problema quando se trata de reciclo de resíduos biológicos (como biofertilizantes, água de reúso de atividades agrícolas, etc). Portanto, estas características tornam o gênero *Salmonella* um importante biomarcador bacteriano entérico (BAPTISTA et al., 2010).

Dos modelos parasitários, oocistos de *Cryptosporidium* spp, cistos de *Giardia* spp. e ovos de *Ascaris* spp. são considerados os mais resistentes no ambiente, frente aos processos de tratamento e desinfecção de matrizes, como água, esgoto, efluente, etc (LEAL et al.,

2013). Desses, os ovos de helmintos têm sido referenciados como uma das estruturas biológicas mais resistentes (QUILÈS et al.,2006). Os ovos de helmintos, como de *Ascaris lumbricoides* assim como de *A. suum* (sendo um indicativo do comportamento do outro), são protegidos por uma estrutura membranosa quadrupla, tendo em média uma espessura total de 4,5 µm. Os ascarídeos são parasitos do intestino delgado sendo a ascaridíase decorrente da presença de vermes adultos no lúmen intestinal do hospedeiro. Os vermes, quando na fase adulta chegam a medir 35 cm de comprimento, sendo que uma fêmea adulta fecundada pode produzir cerca de 200.000 ovos por dia (CDC, 2010, QUILÈS et al.,2006).

Os vírus entéricos são mencionados e estudados pela elevada resistência às condições ambientais adversas, podendo permanecer viáveis por longos períodos na água, resistindo a condições ambientais desfavoráveis ou letais para outros microrganismos, tais como:pH extremo, temperaturas elevadas, salinidade, radiação ultra-violeta (UV) natural e outros (LEY et al., 2002, GRIFFIN et al., 2008); Possuem ainda a capacidade de rápida adsorção em partículas sólidas, dispersas no ambiente, favorecendo a proteção frente aos fatores inativantes (HERNROTH et al., 2002; KOOPMANS et al., 2002; FONG & LIPP, 2005).

Os Adenovírus (AdV), humanos e animais, Circovírus Porcinos do tipo 2 (PCV-2), Rotavírus do tipo A (RVA), sendo este último zoonótico (ZANELLA & MORES, 2003; ZIEMER et al., 2010), são reportados pela sua ampla distribuição em águas (RIGOTTO et al., 2010), considerados altamente estáveis no ambiente, bem como aos processos de desinfecção convencionais de água, como a cloração. Por

isso, são considerados modelos virais para diversos estudos de desinfecção de matrizes ambientais (GERBA et al., 2002; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003; FONG & LIPP, 2005). Os PCV-2 causam a circovirose suína, que é a denominação dada ao conjunto de manifestações clínicas causadas pelo Circovírus Porcino do tipo 2 (PVC2), um vírus que está disseminado em rebanhos suínos de todo o mundo (ZANELLA e MORES 2000, 2003; ZANELLA et al., 2006). Atualmente a circovirose é considerada uma doença endêmica no país, e um aumento do número de casos clínicos com confirmação laboratorial tem sido observado, sendo responsável pela síndrome multisistêmica do definhamento suíno (SMDS) a mais frequente e a mais bem caracterizada (ALLAN e ELLIS, 2000). Cerca de 50% dos suínos afetados morrem em menos de oito dias e os demais animais podem sobreviver, mas a maioria evolui para o definhamento extremo, sem perspectivas de recuperação (ZANELLA et al., 2006). Os RV-A ocorrem em diferentes espécies animal e em humanos (KAPIKIAN & CHANOCK, 2001) e é o agente etiológico mais relacionado com diarreia suína, bovina e humana (SAIF & JIANG, 1994; ALFIERI et al., 1996), sendo relatados por sua importância na saúde pública e em sanidade animal (GLASS et al., 1994; GUITIERREZ & NGUYEN; 2012).

Dos modelos de vírus entéricos, o uso de bacteriófagos é considerado confiável para calcular níveis de sobrevivência de patógenos entéricos em processos de inativação química e biológica, como anaerobiose, aerobiose e com adição de desinfetantes (CARLANDER et al., 2000; SAHLSTRÖM et al., 2008). Os

bacteriófagos são conhecidos por resistirem a temperaturas maiores que 90°C, mesmo em exposição prolongada (MOCE-LLIVINA et al. (2003). Dentre os bacteriófagos mais estudados, destacam-se os pertencentes ao grupo dos colifagos somáticos, os RNA F-específicos (CARLANDER et al., 2000; SAHLSTRÖM et al., 2008), podendo ser introduzidos artificialmente em matrizes ou ser de ocorrência natural.

Colifagos somáticos (ex: Phi X 174-PhiX 174), fagos que infectam *Bacteroides fragilis* (ex: bacteriófago de GB-124), fagos F-específicos RNA (ex: MS2) são conhecidos por serem mais resistentes aos tratamentos térmicos e químicos, quando comparados com bactérias e vírus entéricos e, portanto são ótimos modelos biomarcadores (BREITBART et al., 2004; MAGRI et al., 2013). Os mengovírus (*Cardiovírus* cepa avirulenta – vMCo) é amplamente utilizado como modelo de norovirus humanos, vírus da hepatitis A e E selvagens (todos não cultiváveis em culturas celulares), nem como controle interno de métodos visando recuperação e detecção viral em amostras ambientais e clínicas (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2012).

#### **1.4 Tratamentos de Excretas com Ênfase na Suinocultura**

Os agentes patogênicos humanos e animais são normalmente inativados ao longo do tempo em função de uma combinação de fatores, como pH, temperatura, umidade, teor de carbono, condições nutricionais, comportamento antagônico microbiano (SIDHU et al., 2001; SEMENOV et al., 2007). A taxa de inativação natural normalmente é lenta e pouco confiável, uma vez que não são

controlados os diferentes fatores inerentes às mudanças ambientais, como as sazonais. Por esses motivos o armazenamento e o tratamento controlado de excretas humanas e animais devem ser efetivamente realizados, já que se pode melhor quantificar os fatores de inativação, bem como podendo controlar tais fatores (SIDHU et al., 2001; SEMENOV et al, 2007).

Dentre os principais métodos utilizados para o tratamento de excretas estão os:

→ Químicos: baseados na alcalinidade, em que a adição de compostos alcalinos, como cinzas, cal e outros têm propiciado grandes benefícios nos tratamentos de excretas, minimizando o odor e atração de insetos e roedores.

A eficiência da sanitização por adição de compostos alcalinos deve-se principalmente a elevação do pH, mas a secagem das excretas contribui para a aumentar esta eficiência. A adição de CaO (cal) eleva o pH e aquece a excreta, podendo-se atingir qualidade sanitária pertinente ao Lodo de Classe A, segundo a USEPA, 1994. O pH 12 é recomendado para inativar ovos de *Ascaris*, após armazenagem por três meses (ERIKSEN et al., 1995).

→ Biológicos: é o caso da compostagem, da biodigestão anaeróbia e da aeróbia.

a) A compostagem tem sido estudada para prever tempo e temperatura necessária para que o processo seja melhorado (HAUG, 1993; MITSCHERLICH & MARTH, 1984; FEACHEM, 1983). Na compostagem o tempo de sobrevivência

dos patógenos é prolongado (GERMER et al., 2010), pois não se atinge uma temperatura homogênea na matriz, sendo considerado um método com baixa eficiência na inativação de patógenos (TONNER-KLANK et al., 2007).

b) A biodigestão anaeróbia pode ocorrer em temperatura ambiente, mesofílica (37°C) e termofílica (>45°C) (SAHLSTRÖM et al., 2004), e depende diretamente do tempo de detenção hidráulica, de 30 até 50 dias (YEN-PHI et al., 2009). É comum o tratamento de excretas humanas e animais em reatores UASB que têm a capacidade de gerar e armazenar biogás em seu processo, bem como em BA do tipo Lagoa Coberta, e os que atuam em temperaturas controladas, em forma contínua ou descontínua (YEN-PHI et al., 2009).

c) Os reatores aeróbios são indicados para tratamentos de efluentes pré-clarificados, com baixa carga orgânica e são conhecidos por promover a remoção simultânea de nitrogênio (N) e fósforo (P) e por gerar grandes quantidades de lodos, que precisam de manutenção e descarte apropriado, pois podem acumular grande quantidade de patógenos. Estes reatores são utilizados também para promover o reaproveitamento de água residuária, porém pouco tem sido estudado sobre a capacidade de inativação de patógenos nos produtos gerados (KUNZ et al., 2009; VIANCELLI et al., 2012).

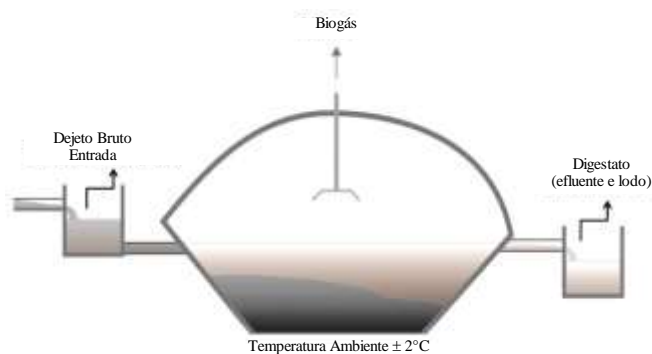
## **1.4.1 Sistemas de Tratamento abordados nesse estudo**

### **1.4.1.1 Biodigestores Anaeróbios do Tipo Lagoa Coberta**

Os BAs são câmaras hermeticamente fechadas que proporcionam as condições ideais para a atuação de bactérias anaeróbias sobre a matéria orgânica gerando como subprodutos biogás e biofertilizantes (efluente e lodo). Os BAs do tipo Lagoa Coberta ou Canadense são os modelos mais adotados por propriedades suinícolas, pois têm menor custo de implantação e manutenção, quando comparados aos demais modelos de biodigestores anaeróbios (OLIVEIRA, 2004).

Basicamente, os biodigestores são constituídos por um tanque de digestão (em lona PVC) e por um gasômetro (campânula), o primeiro serve para armazenar e digerir a biomassa e o segundo para armazenar o biogás produzido pela digestão anaeróbia (OLIVEIRA, 2004), de acordo com o esquema representativo da Figura 02.

**Figura 2:** Diagrama esquemático de um Biodigestor Anaeróbico do Tipo Lagoa Coberta.



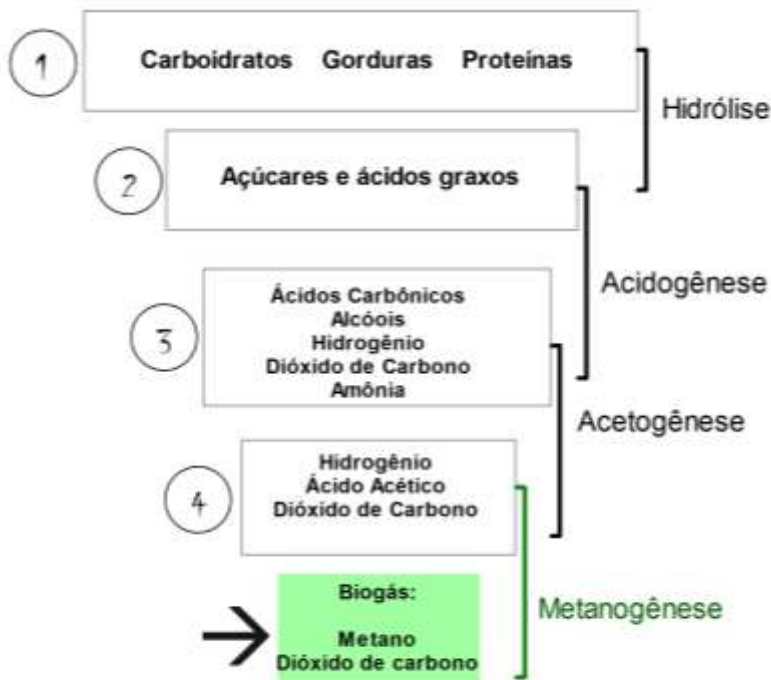
Os BAs podem atuar de forma contínua, semi-contínua ou em batelada (HENN, 2005). Toda carga de dejetos aplicada requer um tempo de retenção hidráulica entre 30 e 50 dias no caso dos BA psicrófilos de lagoa coberta (dependendo das variações climáticas, eficiência do reator), sendo que o volume do biodigestor é projetado em função do volume de dejetos produzidos diariamente e do tempo de retenção hidráulica (TRH) adotado (OLIVEIRA, 2004; KUNZ et al., 2009).

O processo de biodigestão anaeróbia, para que ocorra com sucesso, depende primordialmente da temperatura, pH e condição nutricional, uma vez que estes são os principais fatores intervenientes na condição de sobrevivência dos microorganismos anaeróbios. O processo de biodigestão anaeróbia ocorre com a degradação da matéria orgânica por via anaeróbia, passa pelas seguintes fases: a) Hidrólise: a primeira fase no processo de degradação anaeróbia consiste na hidrólise de materiais particulados em dissolvidos mais simples; b) Acidogênese: nesta etapa os produtos que resultam da hidrólise são metabolizados



pelas bactérias fermentativas em compostos orgânicos simples como álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos graxos voláteis de cadeia curta, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, propiciando o crescimento de novas comunidades microbianas, pois a fermentação ocorre por um grupo diversificado de bactérias; c) Acetogênese: trata-se de uma etapa que possibilita a transformação de produtos da acidogênese em ácido acético (precursor da formação do metano) e também previne a acumulação de ácidos graxos voláteis, com exceção do ácido acético. Os ácidos, em concentrações elevadas, inibem a etapa final da digestão anaeróbia, ou seja, os ácidos precisam ser consumidos. A conversão dos compostos originais para ácido acético tende a ser um processo oxidativo, liberando hidrogênio. Durante a acetogênese, os ácidos graxos voláteis assim como os álcoois, são transformados em ácido acético pelas bactérias produtoras de hidrogênio; d) Metanogênese: esta é a etapa final do processo de biodigestão anaeróbia, em que os compostos produzidos na fase acidogênica são transformados em biogás por microorganismos anaeróbios estritos. Os substratos responsáveis pela formação do metano são o dióxido de carbono, hidrogênio, ácido acético, ácido fórmico e etanol. As principais vias para a formação do metano são a descarboxilação do ácido acético (microorganismos metanogênicos acetotróficos) ou redução do dióxido de carbono (microorganismos metanogênicos hidrogenotróficos) (BELLI FILHO, 1995). A **Figura 3** resume as fases do processo de biodigestão anaeróbia.

**Figura 3:** Resumo das fases do processo de biodigestão anaeróbia.



#### 1.4.1.2 Sistema de Separação de Fase (Sólido / Líquido)

A sedimentação é um processo comumente utilizado nos sistemas de tratamento de excretas humanas e animais, para promover a separação do líquido e do sólido, podendo anteceder a anaerobiose e ocorrer posteriormente à aerobiose. A formação de lodo (flocos), durante processamentos anaeróbios e aeróbios, mais conhecida em sistemas anaeróbios do tipo *UASB*, se dá principalmente a partir da

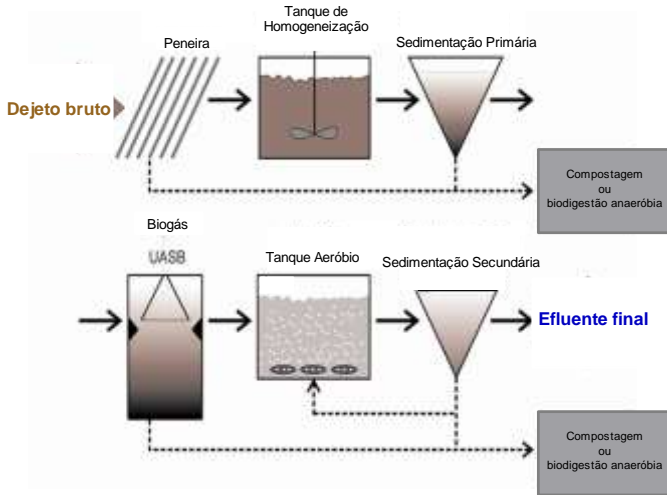
aglomeração de bactérias e fungos filamentosos (ETTERER & WILDERER, 2001), que utilizam a matéria orgânica presente, promovendo remoção de nitrogênio e fósforo (ARGAMAN & KAUFMAN, 1996; MORGENROTH et al., 1997; SCHWARZENBECK et al., 2004).

Em sistemas de separação de fases após aerobiose, a produção de lodo representa 10 a 15% do volume total de efluentes (com remoção a cada 2 dias), exigindo tanques para estocagem do lodo gerado, visando a estabilização do mesmo em torno de 120 dias de retenção hidráulica antes da sua utilização para fins agrícolas (OLIVEIRA et al, 2006).

O fracionamento dos efluentes em sólido (lodo) e líquido (efluente final) pode atender à demanda da biofertilização de solos e ser utilizado como água de reúso, respectivamente. No entanto, o reciclo desses produtos depende da segurança sanitária dos mesmos, uma vez que muitos patógenos entéricos podem se agregar nas partículas sólidas formadas, sendo então carregados para esta porção da fração podendo ainda permanecer na fração líquida (KUNZ et al., 2009; FONGARO et al., 2014).

A sedimentação em processos de tratamento de excretas humanas e animais pode seguir o fluxograma da **Figura 4**.

**Figura 4:** Fluxograma representativo do processo de sedimentação em tratamento de excretas humanas e animais.



## 1.5 Fatores de inativação de patógenos entéricos aplicados na higienização de excretas

### 1.5.1 Temperatura

Dentre os fatores classicamente reconhecidos com potencial de inativação de patógenos entéricos, como temperatura, radiação solar (U.V), variação de pH, turbidez, composição orgânica da matriz, presença de micro-organismos predadores, agregação entre os próprios microrganismos ou com partículas sólidas em suspensão, a temperatura é considerada o fator mais importante (BERTRAND et al., 2012; WARD; KNOWLTON; WINSTON, 1986).

Em processos de higienização ou desinfecção, o emprego de calor é realizado quando se pretende inativar os patógenos entéricos, pois com a

elevação da temperatura há desnaturação de proteínas estruturais, inativação enzimática e desnaturação de ácidos nucleicos, impedindo irreversivelmente a replicação dos patógenos, bem como impedindo que os mesmos sejam reconhecidos pelos seus hospedeiros (FONG; LIPP, 2005)

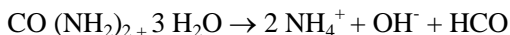
O tempo de redução decimal ( $DT$ ), que expressa o tempo necessário para redução de uma unidade logarítmica na concentração de células viáveis a uma dada temperatura ( $T$ ) e o coeficiente térmico ( $z$ ), que representa a diferença de temperatura necessária para a redução de uma unidade logarítmica no valor de  $DT$ , são parâmetros muito importantes a serem destacados durante o processo de inativação termal. Ambos estão relacionados com o grau de resistência ao calor de um determinado microorganismo em determinada matriz (HAUG, 1993, FONG; LIPP, 2005; JOHN & ROSE, 2005; WIGGINTON; PECSON; SIGSTAM, 2012).

### **1.5.2 Relação: Amônia não ionizada, temperatura, íons carbonatos e pH**

O uso de amônia como agente microbicida tem sido reportado como eficiente na sanitização de fezes humanas, lodo de esgoto e efluentes industriais (NORDIN et al., 2009 a-b; VINNERÅS et al., 2009; VINNERÅS, 2013), já que a amônia em sua forma não ionizada ( $N-NH_3$ ) é reconhecida por sua ação biocida contra vários microrganismos (bacterianos, virais e frente aos ovos de *Ascaris*) (WARD & ASHLEY, 1977, VINNERÅS, 2013).

O processo de formação de N-NH<sub>3</sub> em excretas ocorre pela degradação de nitrogênio (N) orgânico gerando NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ NH<sub>3</sub> sendo este processo conhecido como mineralização. Posteriormente, a conversão de N orgânico para N inorgânico ocorre mediado pela hidrólise da ureia. Além de N-NH<sub>3</sub> os carbonatos (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) formados pela decomposição da ureia também são reconhecidos por sua ação biocida (PARK & DIEZ-GONZALEZ, 2003). Para que haja a conversão da amônia total presente naturalmente nos dejetos animais (íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) há necessidade, portanto, de um pH que favoreça a conversão de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em NH<sub>3</sub>, que possui ação biocida. Para otimizar esse processo alguns alcalinizantes têm sido empregados, como as cinzas, fontes alternativas de carbonato de cálcio (como conchas de ostras e cascas de ovos), cal virgem e a ureia (ARTHURS; JARVIS; RUSSELL, 2001; potencial NIWAGABA et al., 2009; MAGRI; PHILIPPI; VINNERAS, 2013). Desses a ureia [CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] destaca-se, pois atualmente é o fertilizante à base de nitrogênio mais utilizado na agricultura nacional e internacional. Quando em contato com as excretas eleva o pH e também aumenta o valor nutricional do fertilizante, pelo aumento de nitrogênio. A ureia em contato com ureases, presentes naturalmente na matéria orgânica, é hidrolisada em carbonato de amônio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>] e em seguida é degradado em NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e carbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), sendo o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, também conhecido por sua ação biocida, um promotor da alcalinização juntamente com o processo de hidrólise (OTTOSON et al., 2008; NORDIN; OTTOSON; VINNERAS, 2009).

A formação de NH<sub>3</sub> e CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> a partir de excretas animais mediada pela urease está descrita na *Equação 1*.



*(Equação 1)*

O equilíbrio de  $\text{CO}_3^{2-}$  é semelhante a do amoníaco, pois ambos dependem de pH e temperatura, sendo que o pH geralmente se estabiliza em torno de 9,0 quando a uréia se decompõe (HELLSTRÖM et al., 1999). Calcula-se a formação de 36% de amônia em forma de  $\text{NH}_3$  contra 4,5% de carbonatos totais na forma  $\text{CO}_3^{2-}$ , num pH de 9,0 a 25°C. Isso ocorre devido à diferença de pKa do ácido carbônico (6,3 e .10,3) e da amônia (9.25) (HELLSTRÖM et al., 1999).

A relação entre o  $\text{NH}_3$  (aq) e o  $\text{NH}_4$  é quantificada pela constante de dissociação, *pKa*. O *pKa* da amônia na faixa de temperatura entre 0-50° C, pode ser calculada pela *Equação 2* (EMERSON et al. 1975), onde *T* é a temperatura em graus Kelvin; o *pKa* é dependente da temperatura, sendo que o equilíbrio se dá em pH 9,9; 9,6; 9,3 e 9,0 para as temperaturas de 4, 14, 24 e 34°C, respectivamente. A concentração de  $\text{NH}_3$  pode ser calculada pela *Equação 3*, de acordo com o pH e temperatura.

$$pKa = 2729.92 / T + 0.090181 \quad \text{(Equação 2)}$$

$$f\text{NH}_3 = 1 / (10^{\text{pKa}-\text{pH}} + 1) \quad \text{(Equação 3)}$$

O uso de N-  $\text{NH}_3$  para processos de higienização ainda é pouco estudado no mundo, entretanto o potencial de aplicação é viável, visto que possui baixo custo e baixa capacidade operacional, sendo uma das maiores vantagens a elevação da concentração nutricional ao produto tratado, o qual poderá ser utilizado como fertilizante posteriormente (PECSON et al. 2007; NORDIN et al., 2009; MAGRI et al., 2013).

No que se refere ao mecanismo de ação biocida do  $\text{NH}_3$ , pouco se sabe. No entanto este desinfetante possui alta solubilidade, não apenas em água, mas também em lipídios, o que facilita sua entrada e difusão pelas células, podendo atuar na desestabilização celular, pela destruição de membranas e desnaturação proteica (BUJOZEK, 2001), já que causa danos devido à rápida alcalinização do citoplasma celular (DIEZ-GONZALEZ et al., 2000). O mecanismo virucida do  $\text{N-NH}_3$  raramente foi estudado, sendo que Decrey et al. (2015) hipotetizou que há clivagem do material genético viral e pequenas alterações estruturais virais. Assim, os vírus podem ser impedidos de entrar na célula hospedeira, bem como de replicar-se (BURGE et al, 1983; WARD & ASHELY, 1978; EMMOTH et al., 2011).



## 1.6 Referências utilizadas na contextualização

ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MEDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Tropical Animal Health and Production*. v.38, p.521-526, 2006.

ALLAN, G.M., ELLIS, J.A. Porcine Circoviruses: a review. *Journal of Veterinary and Diagnostically . Investigation*. v.12, p.3-14, 2000.

ALTERTHUM F; CARVALHAL M.L.C. Effects of acetate on the growth and fermentation performance of *Escherichia coli* KO11. *Appl Biochem Biotechnol*, 81(3):193-203, 2007.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20<sup>th</sup> ed. Washington: APHA-AWWA-WEF, 2005. 1195 p.

ARGAMAM & KAUFMAM. Balanceamento entre Água Potável e Esgotamento Sanitário - ABES, Rio de Janeiro -1998.

ARROJO, B., MOSQUERA-CORRAL, A., GARRIDO, J. M. AND MENDEZ, R., Aerobic granulation with industrial wastewater in sequencing batch reactors. *Water Research*, 38, 3389-3399, 2004.

BELLI FILHO, P. Stockage et odeurs des dejections animales cas du lisier de porc. Thèse de Doctorat de L'Univesrsité de Rennes I. France. 181 p, 1995.

BERTRAND, I.; SCHIJVEN, J.F.; SÁNCHEZ, G.; WYN-JONES, P.; OTTOSON, J.; MORIN, T.; MUSCILLO, M.; VERANI, M.; NASSER, A.; DE ROSA HUSMAN, A.M.; MYRMEL, M.; SELLWOOD, J.; COOK, N.; GANTZER, C. The impact of the temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *J. Appl. Microbiol.*, p.1-16, 2012.

BIO, Água Virtual. Revista de Saneamento e Meio Ambiente. Rio de Janeiro, RJ, nº 40, p. 26-33, 2006.

BITTON, G. Wiley series in ecological and applied microbiology. *Wastewater microbiology*. 2. ed. New York: Wiley-Liss. ISBN 0-471-32047-1, 1999.

BOSCH, A., GUIX, S., SANO, D., PINTO, R. M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, v.19, n.3, p.295-301. 2008.

BUJOZEK, G. *Influence of ammonia and other abiotic factors on microbial activity and pathogen inactivation during processing of high-solid residues*. Diss. Manitoba: University of Manitoba, 2001.

BURGE, W.D., CRAMER, W.N. & KAWATA, K. Effect of heat on virus inactivation by ammonia. *Applied & Environmental Microbiology* 46(2), 446-51, 1983.

CARLANDER, A., ARONSSON, P., ALLESTAM, G., STENSTROM, T.A. & PERTTU, K. Transport and retention of

bacteriophages in two types of willow-cropped lysimeters. *Journal of Environmental Science and Health* , 35(8), 1477-1492, 2000.

CARRATALÀ, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; HUNDESA, A.; RUSIÑOL, M.; FRESNO, S.; COOK, N.; GIRONES, R. Effect of temperature and sunlight on the stability of human adenoviruses and MS2 as fecal contaminants of fresh produce surfaces. *Int J Food Microbiol*, v.164, p.128-134, 2013.

CDC Parasitology Diagnostic Web Site - DPDx - Laboratory Identification of Parasites. [www.dpd.cdc.gov/](http://www.dpd.cdc.gov/) (2010).

CONCÓRDIA. Dados do território e estatísticas do município. Disponível em:<<http://www.concordia.sc.gov.br/municipio.htm#>>.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Gestão de resíduos e produtos perigosos – Uso. Resolução 375 de de 29 de agosto de 2006.

DIEZ-GONZALEZ, F., JARVIS, G.N., ADAMOVICH, D.A. & RUSSELL, J.B. Use of carbonate and alkali to eliminate *Escherichia coli* from dairy cattle manure. *Environmental Science & Technology*, 34(7), 1275-1279, 2000.

DJIKENG, A., KUZMICKAS, R., ANDERSON, N.G., SPIRO, D.J. Metagenomic analysis of RNA viruses in a fresh water lake. *PLoS ONE*, v.4, n. 9, p. e7264. 2009.

DT104 from cattle manure. *Journal of Applied Microbiology* 94(4), 675-685, 2003.

EMMERSON, K., RUSSO, R., LUND, R. & THURSTON, R. Aqueous ammonia equilibrium calculations: Effects of pH and temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 32, 2379-2383, 1975.

EMMOTH E, OTTOSON J, ALBIHN A, BELÁK S, VINNERÅS B. Ammonia disinfection of hatchery waste for elimination of single-stranded RNA viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:3960–3966, 2011.

ERIKSEN, L., ANDREASEN, P. & ILSOE, B. Inactivation of *Ascaris suum* eggs during storage in lime treated sewage sludge. *Water Research* 30(4), 1026-1029, 1995.

ETTERER, T.; WILDERER, P. A., Generation and properties of aerobic granular sludge. *Water Science & Technology*, 43 (3), 19-26, 2001.

FEACHEM, R.G. Sanitation and disease: health aspects of excreta and wastewater management. World bank studies in water supply and sanitation, v.3. ISBN 0- 471-90094-X, , 1983

FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. Fields Virology, Philadelphia: Lippincott-Williams&Wilkins, 5 ed, v.1, p. 3177, 2007.

FONG, T.T., LIPP, E.K. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 69, p. 357-371, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The state of food and agriculture—innovation in family farming, p, 161, 2014.

FRAISE, A.P., LAMBERT, P.A., MAILLARD, J.-Y., RUSSELL, A.D. & AYLIFFE, G.A.J. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 4. ed. *Malden: Blackwell*. ISBN 1-4051-0199-7, 2004.

FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE DE SANTA CATARINA (FATMA), Instrução Normativa da Suinocultura – IN 11 FATMA (SANTA CATARINA), 2004.

GABUTTI, G.; DE DONNO, A.; BAGORDO, F.; MONTAGNA, M. T. Comparative survival of faecal and human contaminants and use of *Staphylococcus aureus* as an effective indicator of human pollution. *Marine Pollution Bulletin*, v.40, n.8, p.697-700, 2000.

GAYNOR, A.M., NISSEN, M.D., WHILEY, D.M., MACKAY, I.M., LAMBERT, S.B., WU, G. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathogens*, v. 3, n. 5, p. 64, 2007.

GERBA, C. P., GRAMOS, D. M., NWACHUKU, N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p.5167-5169, 2002.

GERMER, J., BOH, M.Y., SCHOEFFLER, M. & AMOAH, P. Temperature and deactivation of microbial faecal indicators during

small scale co-composting of faecal matter. *Waste Management* 30(2), 185-191, 2010.

GHIGLIETTI, R., ROSSI, P., RAMSAN, M. & COLOMBI, A. Viability of *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris muris* eggs to alkaline pH and different temperatures. *Parasitologia*, v. 37(2-3), 229-232, 1995.

GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R.; SMITH, J. Rotavirus Vaccines: Success by Reassortment? *Science*, v.265, p.1389-1391, 1994.

GRABOW, W.O., TAYLOR, M.B., DE VILLIERS, J.C. New methods for the detection of viruses: call for review of drinking water quality guidelines. *Water Science and Technology*, v. 43, p. 1-8, 2001.

GRIFFIN, J.S., PLUMMER, J.D., LONG, S.C. Torque teno virus: an improved indicator for viral pathogens in drinking waters. *Journal Virology*, v. 5, p. 112, 2008.

GUTIERREZ, L., NGUYEN, T.H. Interactions between Rotavirus and Suwannee River Organic Matter: Aggregation, Deposition, and Adhesion Force Measurement. *Envi Sc and Tech*, 46 (16), p. 8705-8713, 2012.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Oxford Journal: Nucleic Acids Symposium* . Ser. 41, 1999.

HAUG, R.T. The practical handbook of compost engineering. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993.

HELLSTRÖM, D., JOHANSSON, E. & GRENNBERG, K. Storage of human urine: acidification as a method to inhibit decomposition of urea. *Ecological Engineering*, 12(3-4), 253- 269, 1999.

HERNROTH, B.E., CONDÉN-HANSSON, A.C., REHNSTAM-HOLM, A.S., GIRONES, R., ALLARD, A.K. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *App Environ Microbiol*, v.68, p.4523-4533, 2002.

HSU, B.M., CHEN, C.H., KUNG, C.M., WAN, M.T., SHEN, S.M. Evaluation of enterovirus recovery in surface water by different adsorption and elution procedures. *Chemosphere*, v. 66: p. 964-969, 2007.

HUNDESA, A., MALUQUER DE MOTES, ALBINANA-GIMENEZ, N C., RODRIGUEZ-MANZANO, J., BOFILL-MAS, S., SUÑEN, E. GIRONES, R. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as a MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J. Virol. Meth* v. 72, p.7886–7893, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Cartograma: Pecuária 2007: Suínos efetivos dos rebanhos—(cabeças). 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 10 de Outubro de 2013.

KAPIKIAN, A.Z. Acute viral gastroenteritis. Preventive Medical, 1974; In: Fields Virology, Philadelphia: Lippincott-Williams&Wilkins, 5 ed, v.1, p. 3177, 2007.

KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: *Virology*, p. 1657-1708. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.2. Lippincott-Raven, 3rd ed., Philadelphia, USA, 1996.

KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: *Virology*, p. 1657-1708. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.2. Lippincott-Raven, 3rd ed., Philadelphia, USA, 2001.

KARAGANIS, J. V.; LARKIN E. P.; MELNICK J. L.; SCARPINO P. V.; SCHAUB S. A.; SORBER C. A.; SULLIVAN R.; WELLINGS F. M. Research priorities for monitoring viruses in the environment.

KIM, D.J.; CHANG, J.S.; LEE, D.I.; HAN, D.W.; YOO, I.K.; CHA, G.C. Nitrification of high strength ammonia wastewater and nitrite accumulation characteristics. *Water Science Technology*, Oxford, v.47, n°11, p.45-51, 2004.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v. 16, p. 111-120, 1980.



KO, G., CROMEANS, T.L., SOBSEY, M.D. Detection of Infectious Adenovirus in Cell Culture by mRNA Reverse Transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 7377–7384, 2003.

KOCWA-HALUCH, R. Waterborne enteroviruses as a hazard for human health. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 10, p. 484-487, 2001.

KOOPMANS, M., BONDDORFF, C.H., VINJE, J., MEDICI, D., MONROE, S. Foodborne viruses. *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Review*, v. 26, p. 87-205, 2002.

LEY, V., HIGGINS, J., FAYER, R. Bovine Enteroviruses as Indicators of Fecal Contamination. *Applied Environmental Microbiology*, v.68, p.3455-3461, 2002.

MACKOW, E. 2002 Rotaviruses. Disponível em:<<http://www.uhme.sunysb.edu/microbiology/rotavirus>> Acesso em 06 outubro 2012.

MAGRI, M. E, PHILIPPI, L.S; VINNERÅS, B. Inactivation of Pathogens in Feces by Desiccation and Urea Treatment for Application in Urine-Diverting Dry Toilets. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(7), p. 2156–2163, 2013.

MALUQUER DE MOTES, C., CLEMENTE-CASARES, P., HUNDESA, A., MARTIN, M., GIRONES, R. Detection of bovine and

porcine adenovirus for tracing the source of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1448–1454, 2004

MANCUSO, P. C. S. e SANTOS H. F. D. Reúso de Água. Barueri-SP: Manole, 579, 2003.

MILARÉ, E. *Direito do Ambiente: doutrina, jurisprudência, glossário*. São Paulo: RT, 2004.

MITSCHERLICH, E. & MARTH, E.H. *Microbial Survival in the Environment*, 1984.

MOE, C.L. & RHEINGANS, R.D. Global challenges in water, sanitation and health. *Journal of Water and Health: 4 (Suppl. 1) 41-57* 4(Suppl. 1), 1)-57, 2006.

MORGENROTH, E.; SHERDEN T.; van LOODPRECHT M. C. M.; HEIJNEN, J. J.; WILDERER, P.A. Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Wat. Res.*, v.31, p. 3191-3194, 1997.

NGUYEN-VIET, H., PHAM-DUC, P., NGUYEN, V., TANNER, M., ODERMATT, P., VU-VAN, T., et al. A one health perspective for integrated human and animal sanitation and nutrient recycling. In J. Zinsstag, E. Schelling, D. Waltner-Toews, M. Whittaker, & M. Tanner (Eds.), *One health. The theory and practice of integrated health approaches*, Boston: Cabi (pp. 96–107), 2015.

NORDIN, A.; NYBERG, K.; VINNERÅS, B. Inactivation of *Ascaris* eggs in source-separated urine and faeces by ammonia at ambient

temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3),p. 662-667, 2009a.

NORDIN, A.; OTTOSON, J.; VINNERÅS, B. Sanitation of faeces from source-separating dry toilets using urea. *Journal of Applied Microbiology*, v.107, p. 1579-1587, 2009b.

OLIVEIRA, P. A. V., HIGARASHI, M. M. Geração e utilização do biogás em unidades de produção de suínos. Programa Nacional do Meio Ambiente – PNMA II; Projeto de Controle da Degradação Ambiental Decorrente da Suinocultura em Santa Catarina. Embrapa Suínos e Aves. Concórdia, p. 41, 2006.

PARK, G.W. & DIEZ-GONZALEZ, F. Utilization of carbonate and ammonia-based treatments to eliminate *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* DT104 from cattle manure. *Journal of Applied Microbiology* 94(4), 675-685, 2003.

PECSON, B.M., BARRIOS, J.A., JIMENEZ, B.E. AND NELSON, K.L. The effects of temperature, pH, and ammonia concentration on the inactivation of *Ascaris* eggs in sewage sludge. *Water Research* 41(13), 2893-2902, 2007.

QUILÈS, F., BALANDIER, J.-Y. & CAPIZZI-BANAS, S. In situ characterisation of a microorganism surface by Raman microspectroscopy: the shell of *Ascaris* eggs. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v.386 (2), 249-255, 2006.

REDE NACIONAL DE CAPACITAÇÃO E EXTENSÃO TECNOLÓGICA EM SANEAMENTO AMBIENTAL – ReCESA. Esgotamento sanitário: qualidade da água e controle da poluição: guia do profissional em treinamento: nível 2 / Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, p. 87, 2008

RIGOTTO, C., VICTORIA, M., MORESCO, V., KOLESNIKOVAS, C.K.M., CORREA, A.A., SOUZA, D.S.M., MIAGOSTOVICH, M., SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v.109, p.1979-1987, 2010.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D, COOK, N, RUGGERI, FM, et al. Virus hazards from food, water and other contaminated environments, *FEMS Microbiol Rev.*,36(4):786-814,

ROSE, M.A., DHAR, A.K., BROOKS, H. A., ZECCHINI, F. & GERSBERG, R.M. Quantitation of hepatitis A virus and enterovirus levels in the lagoon canals and Lido beach of Venice, Italy, using real-time RT-PCR. *Water Research*, v. 40, p. 2387-2396, 2006.

SAHLSTRÖM, L., BAGGE, E., EMMOTH, E., HOLMQVIST, A., DANIELSSON-THAM, M.-L. & ALBIHN, A. (A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. *Bioresource Technology*, 99(16), 7859-7865, 2008.

SAIF, L.J.; JIANG, B. Nongroup A Rotaviruses of Humans and Animals. *Current Topics in Microbiological Immunology*, v.185, p.339-371, 1994.

SCHWARZENBECK, N., BORGES, J. M. AND WILDERER, P. A., Treatment of dairy effluents in an aerobic granular sludge sequencing batch reactor. *Appl Microbiol and Biotec*, 66, 711-718, 2005.

SEMENOV, A.V., VAN BRUGGEN, A.H., VAN OVERBEEK, L., TERMORSHUIZEN, A.J. & SEMENOV, A.M. Influence of temperature fluctuations on Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica serovar Typhimurium in cow manure. *FEMS Microbiology Ecology* 60(3), 419-428, 2007.

SIDHU, J., GIBBS, R.A., HO, G.E. & UNKOVICH, I. The role of indigenous microorganisms in suppression of salmonella regrowth in composted biosolids. *Water Research* 35(4), 913-920, 2001.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evaluative*. v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TAVARES, M.T., CARDOSO, D.D.P., DE-BRITO, W.M.E.D. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos de controle de qualidade da água. *Revista de Patologia Tropical*, v.34, p.85-104, 2005.

TAY, J. H., TAY, S. T., IVANOV, V., PAN, S., JIANG, H. L., LIU, Q. S. Biomass and porosity profiles in microbial granules used for aerobic wastewater treatment. *Letters in Applied Microbiology*, 36(5), 297-301, 2003.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A., HAAS, C. N., JACANGELO, J., RILEY, K., GERBA, C. P. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, n.1, p.577-582. 2003.

TONNER-KLANK, L., MOLLER, J., FORSLUND, A. & DALSGAARD, A. Microbiological assessments of compost toilets: In situ measurements and laboratory studies on the survival of fecal microbial indicators using sentinel chambers. *Waste Management*. p.1144-1154, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C L. 2012. *Microbiologia*, tradução da 8a Ed., ArtMed, 2012.

TUCCI, C. E. M. Plano Diretor de Drenagem Urbana de Porto Alegre. IPH-UFRGS, 2001. Disponível em: <http://www.iph.ufrgs.br/gerenciarede/servicos/producao/ListaPublicacoes.asp>. Acesso em 08 de Outubro de 2012.

TULADHAR, E.; BOUWKNEGT, M.; ZWIETERING, M.H.; KOOPMANS, M.; DUIZER, E. Thermal stability of structurally different viruses with proven or potential relevance to food safety. *J Appl Microbiol*, v.112, p.1050-1057, 2012.

USEPA. Environmental Regulations and Technology. Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge, Appendix F - EPA/625/R-92/013 - Office of Research and Development. Ohio: Cincinnati, 2003.

USEPA. Standards for the use or disposal of sewage sludge. EPA Part 503 Biosolids Rule. Office of waste water management. Washington, 1994.

VENGLOVSKY, J., MARTINEZ, J. & PLACHA, I. Hygienic and ecological risks connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture. *Livestock Science* 102(3), 197-203, 2006.

VIANCELLI, A., GARCIA, L. A. T., KUNZ, A., STEINMETZ, R., ESTEVES, P. A., BARARDI, C. R. M. Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples collected from swine manure treatment systems. *Research in Veterinary Science*, v. 93, p. 538–543, 2011.

VINNERÅS, B. Sanitation and hygiene in manure management. In: Sommer, S.G., Jensen, L.S., Christensen, M.L., Schmidt, T. (eds). *Animal Waste – Recycling, Treatment and Management*. Wiley-Blackwell. Oxford UK (In Press). 2013.

VINNERÅS, B.; HEDENKVIST, M.; NORDIN, A.; WILHELMSON, A. Peepoo bag: self-sanitising single use biodegradable toilet. *Water Science and Technology* v.59, p. 1743-1749, 2009.

VINNERÅS, B.; HEDENKVIST, M.; NORDIN, A.; WILHELMSON, A. Peepoo bag: self-sanitising single use biodegradable toilet. *Water Science and Technology* v.59, p. 1743-1749, 2009.

WARD, R. L., AND C. S. ASHLEY. Identification of the virucidal agent in wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, p.860–8649, (v,50), 1977.

WARD, R.L.; KNOWLTON, D.R.; WINSTON, P.E. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. *App. Environ. Microbiol.*, v.52, p.450-459, 1986.

WIGGINTON, K.; PECSON, B.; SIGSTAM, T. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ. Sci. Technol.*, v.46, p.12069-12078, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); UNICEF. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009.

YEN-PHI, V.T., CLEMENS, J., RECHENBURG, A., VINNERÅS, B., LENSSEN, C. & KISTEMANN, T. Hygienic effects and gas production of plastic bio-digesters under tropical conditions. *Journal of Water and Health* 7(590-596), 2009.

ZANELLA J. R. C., SIMON N. L., PINTO L. S., VIANCELLI A., FERNANDES L. T., HAYASHI M., DELLAGOSTIN O. A., ESTEVES P. A.. Detection of porcine Circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population. *Veterinary Science*. v. 75, p. 73-79, 2009.



ZANELLA, J.R.C., MORES, N. Diagnostic of Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Swine in Brazil caused by porcine Circovirus type 2 (PCV2). *Brasilian Veterinary and Zoonotic Disease*. v.55, p.522–527, 2003.

ZANELLA, J.R.C., MORÉS, N., SIMON, N.L., OLIVEIRA, S.R. DE., GAVA, D. Identificação de Circovirus suíno tipo 2 (PCV2) em estudo retrospectivo em tecidos suínos arquivados de DPe 1988 no Brasil. *Ciência Rural*. v.36 (5), p.1480–1485, 2006.

ZIEMER, C.J; BONNER, J.M; COLE, D.; VINJÉ, J.; CONSTANTINI, V.; GOYAL, S.; GRAMER, M.; MACKIE, R.; MENG, X.J.; MYERS, G.; SAIF, L.J. Fate and transport of zoonotic, bacterial, viral, and parasitic pathogens during swine manure treatment, storage, and land application. *Journal of Animal Science*. v. 88, p. E84–E94, 2010.



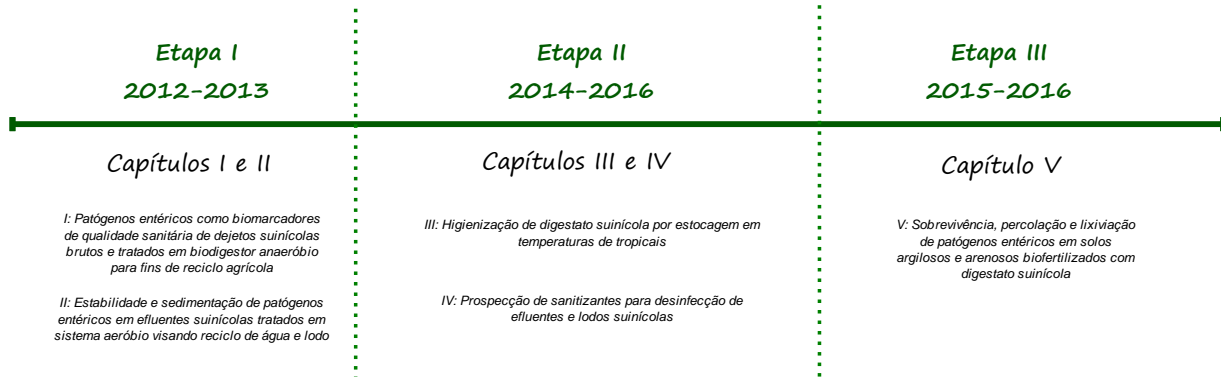
## 2. APRESENTAÇÃO E ABORDAGEM DA PRESENTE TESE DOUTORAL

A presente tese doutoral buscou conhecer o potencial de descontaminação de dejetos suínicos em sistemas de tratamentos já utilizados no Brasil atuando em escala real (biodigestão anaeróbia e sedimentação), bem como propor alternativas inovadoras no pós-tratamento para desinfecção dos efluentes e lodos gerados nesses sistemas, potencializando e valorando seu reciclo agrícola.

A **Figura 5** apresenta o delineamento experimental de execução da presente tese doutoral, organizada em cinco capítulos, os quais foram executados em três etapas.



**Figura 5:** Delineamento experimental de execução da presente tese doutoral, organizada em cinco capítulos, os quais foram executados em três etapas.



A primeira etapa desse estudo, contemplada nos *Capítulos I e II* dessa tese doutoral, dedicou-se à caracterização do potencial de desinfecção de dejetos suínocolas em sistemas de tratamentos utilizados no Brasil. *O Capítulo I* intitulado: “***Patógenos entéricos como biomarcadores de qualidade sanitária de dejetos suínocolas brutos e tratados em biodigestor anaeróbio para fins de uso agrícola***”, refere-se aos estudos de patógenos entéricos em afluentes e efluentes suínocolas provenientes de Biodigestores Anaeróbios (BAs) do tipo Lagoa Coberta atuando em escala real no Oeste de Santa Catarina, Brasil; *O Capítulo II* intitulado: “***Estabilidade e sedimentação de patógenos entéricos em efluentes suínocolas tratados em sistema aeróbio visando reciclo de água e lodo***”, refere-se ao estudo da estabilidade e sedimentação de patógenos entéricos em efluentes e lodos gerados na Estação de Tratamento de Dejetos de Suínos (ETDS), localizado nas dependências da Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia Santa Catarina, Brasil. Os estudos foram realizados em escala real, bem como em escala laboratorial, tendo como objetivo final aumentar a segurança sanitária no reciclo de água e lodo gerado na ETDS.

A segunda etapa desse estudo, contemplada nos *Capítulos III e IV* dessa tese doutoral, dedicou-se ao estudo de pós-tratamento de efluentes e lodos gerados nos sistemas de tratamentos de dejetos de suínos, aumentando a segurança sanitária frente ao reciclo agrícola dos mesmos. *O Capítulo III* intitulado “***Higienização de digestato suínocola por estocagem em temperaturas de tropicais***” refere-se ao estudo da higienização por estocagem em temperaturas que mimetiza às de países de clima tropical, visando o pós-tratamento de efluente e lodo gerados em BAs; *O Capítulo IV* intitulado “***Prospecção de sanitizantes para***

*higienização de efluentes e lodos suinícolas*”, refere-se à busca de potenciais sanitizantes, sua eficiência na inativação de patógenos em efluentes e lodos suinícolas tratados, valorando o potencial biofertilizante gerado.

A terceira etapa da presente tese doutoral, contemplada no *Capítulo V* abordará o comportamento de patógenos entéricos em solos agricultáveis, visando elucidar o comportamento genérico dos mesmos quando há biofertilização utilizando digestato suinícola. Essa etapa do presente estudo foi realizada durante o Doutorado Sanduíche (PDSE-CAPES), nas dependências do Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL) na Espanha-ES, sob orientação da Dra. María Cruz García González e do Dr. David Rodríguez Lázaro. *O Capítulo V* intitulado “*Estabilidade, percolação e lixiviação de patógenos entéricos em solos fertilizados com digestato suinícola*” apresenta resultados *ex situ*, da estabilidade, lixiviação e percolação de patógenos entéricos em colunas de solos argilosos e arenosos, gerando índices que permitirão melhor compreender o comportamento desses patógenos em escala real.





### 3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a higienização de dejetos suínos em sistemas de tratamentos atuais, bem como prospectar métodos alternativos que visem o reciclo agrícola seguro desses dejetos como fertilizantes.



#### 4. HIPÓTESES

**Hipótese 1:** Os sistemas atuais de tratamento de dejetos de suínos não são eficientes na inativação de patógenos entéricos, sendo que pós-tratamentos baseados em estocagem e alcalinização atuam eficientemente na sua higienização.

**Hipótese 2:** Vírus e bactérias entéricas indicam o comportamento de patógenos em solos fertilizados com digestato suinícola, gerando dados para avaliar o risco de contaminação de solos, águas e alimentos.



- CAPÍTULO I -

*Patógenos entéricos como biomarcadores de qualidade sanitária de  
dejetos suínos brutos e tratados em biodigestor anaeróbio para  
fins de uso agrícola*



## Artigo Publicado

Utility of specific biomarkers to assess safety of swine manure for biofertilizing purposes. *Science Total Environment* (479-480):227-283, 2014.

FONGARO, G., VIANCELLI, A., MAGRI, M.E., ELMAHDY, E.M., BIESUS, L.L., KICH, J.D., KUNZ, A., BARARDI, C.R.



## Utility of specific biomarkers to assess safety of swine manure for biofertilizing purposes



G. Fongaro<sup>a</sup>, A. Viancelli<sup>b</sup>, M.E. Magri<sup>a</sup>, E.M. Elmahdy<sup>a</sup>, L.L. Biesus<sup>b</sup>, J.D. Kich<sup>c</sup>, A. Kunz<sup>b,a</sup>, C.R.M. Barardi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Fisiologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (UFSC, Florianópolis, Brazil)

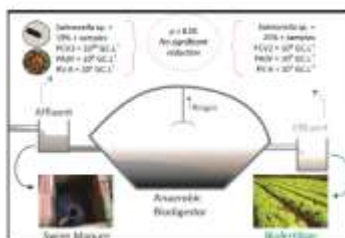
<sup>b</sup> Instituto de Zootecnia - Foz de Iguaçu, Brazil

<sup>c</sup> PGRN/BRIZZI, UNIMIST, Cáceres, Brazil

### HIGHLIGHTS

- Enteric viruses and *Salmonella* spp. persist even after the anaerobic biodegradation of liquid swine manure
- PCV2, PAHV and RVA genomes were positive in 77.5%, 60% and 37.5% of the samples respectively
- *Salmonella* spp. was found in 40% of the samples collected during the summer and in US during the winter
- It is necessary to establish more efficient sanitation methods for biofertilizer purposes from swine manure

### GRAPHICAL ABSTRACT



### a) Objetivo específico

Monitorar a incidência e sazonalidade de Adenovírus Porcinos (PAHV), Circovírus Porcinos - 2 (PCV-2), Rotavírus A (RVA) e

*Salmonella* sp. em dejetos suínolas brutos e processados em Biodigestores Anaeróbios do Tipo Lagoa Coberta (BAs) em granjas de criação de suínos, bem como acessar a eficiência dos BAs na remoção desses patógenos.

## **b) Metodologia**

### b.1) Desenho experimental e amostragens

Para realização desta etapa do trabalho três granjas de criação de suínos, situadas no município de Concórdia-SC (27°18' S, 51°59' W) foram selecionadas, sendo: Granja 1) crechário de suínos, com aproximadamente 400 animais, contendo BA para tratamento dos dejetos suínolas produzidos na atividade; Granja 2) suínos na fase de engorda (fase de terminação), com aproximadamente 300 animais, contendo BA para tratamento dos dejetos suínolas produzidos na atividade; Granja 3) responsável pela produção final (fase de terminação), com aproximadamente 800 animais, não contendo sistema de tratamento de dejetos, apenas tanque de estocagem. As granjas selecionadas são importantes produtoras no Oeste Catarinense.

Amostras compostas ( $n=3$ ), cada uma de 1 L, foram coletadas na entrada (afluente) e saída (efluente) dos BA das Granja 1 e 2, bem como na Granja 3 foram coletadas diretamente do tanque de armazenamento de dejetos brutos (esterqueira). Para melhor representar a dinâmica de funcionamento do sistema, as amostragens foram realizadas semanalmente, durante 4 semanas no período de inverno e 4 semanas durante o verão (ano 2013), totalizando quarenta amostras coletadas.



Os BAs selecionados para a pesquisas possuíam as seguintes dimensões e tempo de retenção hidráulica:

- Comprimento: 15 m;
- Largura: 7 m;
- Profundidade: 3,2 m;
- Volume: 135 m<sup>3</sup>;
- Tempo de Detenção Hidráulica: 30 – 50 dias;
- Volume de Alimentação diária: 3 m<sup>3</sup>/dia.

#### b.2) Análises microbiológicas

Análise qualitativa para detecção de *Salmonella* spp. foi realizada, de acordo com ISO 6579 (2002). Resumidamente, 25 mL das amostras foi adicionado a 225 mL de água peptonada (pH 7,0) e incubado a 37°C por 24 h, para a regeneração bacteriana 1 mL dessa suspensão foi acrescentado a 1 mL do caldo Rappaport-Vassiliadis e do caldo tetrationato, ambos incubados a 42°C durante 24 h. Posteriormente uma alçada de ambos os crescimentos foram plaqueados, por esgotamento, em ágar xilose-lisina-tergitol-4 (XLT4), incubados por até 48h e as colônias típicas de *Salmonella* sp. (com coloração preta e crescimento aprofundado) foram contabilizadas.

Para as análises virais, houve necessidade de processamento das amostras para concentração das partículas virais. O processo foi realizado de acordo com o descrito por Schlindwein et al. (2010), utilizando-se as adaptações necessárias para o tipo de amostra. Foram utilizados 25 mL de amostra, e adicionado 20 mL de AlCl<sub>3</sub> [0,05 mol L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>]. O pH foi ajustado para 3,5 e sequencialmente esta mistura foi homogeneizada durante 30 min. seguido de agitação e centrifugação. Ao final desta etapa o precipitado foi ressuspensão em tampão glicina e posteriormente neutralizado (pH 7,0). A amostra foi concentrada pela adição de Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) e em seguida clarificada com clorofórmio:butanol (1:1). Um volume de aproximadamente 4 mL foi obtido, distribuído em alíquotas, refrigerado a temperatura -80°C para a sequência das análises virais.

Para conhecer a recuperação das partículas virais, amostras conhecidamente negativas para RVA foram inoculadas com  $8,0 \times 10^6$  GC mL<sup>-1</sup> (cópias genômicas por mL) de RVA símio, cepa SA11 (grupo A, sorotipo 3), concentradas e clarificadas, conforme descrito acima. Os RVA-SA11 utilizados foram propagados em células MA-10<sup>4</sup> (derivadas de rim de embrião de macaco) e titulados por PCR em tempo real (qPCR), como descrito por Zeng et al. (2008).

#### b.2.1 Quantificação dos genomas virais

Para a quantificação dos genomas virais, previamente, a partir dos concentrados virais, os ácidos nucleicos totais foram extraídos usando o kit comercial, QIAmpMinElute® Virus Spin Kit (Qiagen®), segundo recomendações do fabricante.

As reações de qPCR foram realizadas como descrito por Hundesa et al. (2009), Opriessnig et al. (2003) e Zeng et al. (2008), para os PAdV, PCV2 e RVA, respectivamente, o utilizando fragmentos gênicos dos respectivos vírus avaliados, clonados em vetor plasmideal comercial. Quando se buscou por genomas de origem RNA, o material

genético foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA, como foi o caso do RVA. Os ensaios de qPCR foram realizados em triplicatas em placas de 96 cavidades (MicroAmp Applied Biosystems), contendo também controles negativos e positivos, no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

#### b.2.2. Ensaio de infecciosidade de PCV-2

Com objetivo de identificar e quantificar PCV-2 infecciosos, originalmente contidos nas amostras de dejetos de suínos avaliadas, o ensaio de cultura celular integrada (ICC) à RT-qPCR precedida por ensaio enzimático (et), sendo denominada de ICC-et-RT-qPCR, adaptado de Fongaro et al. (2013) foi padronizado durante este trabalho.

Para isso, células ST (originárias de testículo suíno) foram cultivadas e propagadas em meio RPMI (Gibco BRL) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos e antifúngicos (PSA-penicilina G 100U/mL/sulfato de estreptomicina 100µg/mL/anfotericina B 0,25µg/mL) e mantidas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após a incubação as células foram cultivadas em placas de 24 cavidades, numa densidade celular de  $3 \times 10^5$  células por cavidade. A monocamada celular foi inoculada com 1,0 mL das amostras testes, previamente concentradas para análises virais, positivas em qPCR para PCV2, tratadas com 2% de antibióticos e antifúngico e em diluição não citotóxica (1:60), e incubadas por 1 h para permitir a adsorção viral.

Os inoculos foram aspirados e a monocamada celular lavada por 5 vezes com tampão salina fosfato 1X (PBS 1X). Posteriormente, 1mL de meio RPMI 1X foi adicionado nas cavidades da placa, sendo esta re-incubada, nas mesmas condições, durante 24h. Como controle de qualidade e validação do teste, foi utilizada sempre uma quantidade conhecida de PCV2 infecciosos e PCV2 inativados por 1 h a 99°C e 30 min sob radiação U.V (como controles positivos e negativos, respectivamente).

Após este período, o sobrenadante celular foi removido e a monocamada celular foi lavada novamente 2 vezes com PBS 1X. A extração do material genético foi realizada conforme descrito no item “b.2.1”.

Para eliminar possível contaminação com DNA presente na amostra e advindo de vírus não infecciosos, o material genético extraído foi tratado com 1U de DNase I (Sigma-Aldrich) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida a reação de transcrição reversa (RT) foi realizada, utilizando iniciadores randômicos (hexanucleotídeos), para obtenção do cDNA. Imediatamente após este período a reação de qPCR foi realizada para quantificação do número de cópias genômicas (CG) totais provenientes de vírus infecciosos.

#### b.2.4. Genotipagem de PCV-2 circulante

Para determinar os genótipos de PCV-2 circulantes nas amostras, o material genético total foi submetido a reação *nested*-PCR para amplificação de fragmentos correspondentes aos PCV-2a e aos

PCV-2b, as described by Kim et al. (2011), com amplicons esperados de 125 pb e 172 bp, respectivamente.

### b.3) Análises estatísticas

Análise não paramétrica de variância (Kruskal–Wallis - Statistic 7.0) foi utilizada para avaliar diferenças significativas entre as amostragens quanto aos parâmetros físico-químicos. Testes de Correlação de Pearson, regressão linear, ANOVA e teste *t de Student* foram realizados quando necessário (usando GraphPad Prism 5.0 (USA)). Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p \leq 0.05$ .

## c) Resultados

### c.1) Análises físico-químicas

A **Tabela 1** resume os resultados dos parâmetros físico-químicos das amostras provenientes das Granjas 1, 2 e 3, durante as estações de verão e inverno.

As análises estatísticas dos dados apontaram diferenças significativas nas medias gerais dos seguintes parâmetros, em todas as amostragens: temperatura da amostra (T. Amostra), temperatura do ambiente (T. Ambiente) e NAT durante inverno e verão ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 1:** Média e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos avaliados nas amostragens. (n = 40 e diferenças estatísticas consideradas de  $p \leq 0.05^*$ ).

| Parâmetro                                     | Granja 1          |            |               |            | Granja 2          |            |               |            | Granja 3     |            |
|---|-------------------|------------|---------------|------------|-------------------|------------|---------------|------------|--------------|------------|
|   | Não tratado em BA |            | Tratado em BA |            | Não tratado em BA |            | Tratado em BA |            | Dejeto bruto |            |
|   | Verão             | Inverno    | Verão         | Inverno    | Verão             | Inverno    | Verão         | Inverno    | Verão        | Inverno    |
| <b>T. Amostra (°C)</b> <sup>(*)</sup>         | 20,0±1,8          | 11,0±2,3   | 21,0±1,3      | 11,0±2,3   | 22,0±2,1          | 13,0±1,2   | 22,0±2,8      | 14,0±1,3   | 21,0±1,6     | 14,0±1,2   |
| <b>T. Ambiente.(°C)</b> <sup>(*)</sup>        | 24,0±2,5          | 14,0±1,2   | 24,0±2,8      | 14,0±0,5   | 24,0±2,7          | 15,0±0,8   | 24,0±1,5      | 16,0±1,6   | 24,0±2,5     | 16,0 ±1,2  |
| <b>pH</b>                                     | 7,0±0,2           | 8,0±0,4    | 8,0±0,8       | 8,0±0,2    | 7,5±0,2           | 7,5±0,2    | 9,5±1,3       | 8,0±0,3    | 8,0±0,2      | 8,0±0,2    |
| <b>NAT (mg.L<sup>-1</sup>)</b> <sup>(*)</sup> | 1422,8±172,07     | 624,0±97,1 | 1784,7±195,2  | 890,2±87,7 | 1422,8±167,2      | 727,1±79,8 | 2763,7±345,4  | 624,0±69,9 | 2118,6±278,7 | 525,0±62,5 |

### c.2) Ensaio de recuperação viral

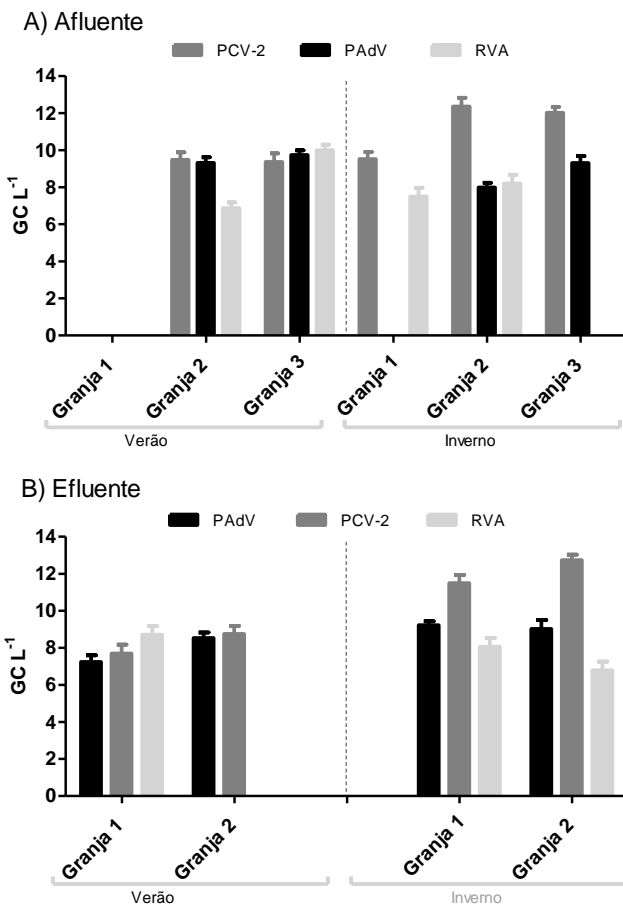
A taxa média de recuperação viral mensurada por qPCR, utilizando RVA-SA11 como modelo, pelo método de concentração viral utilizando eluição e clarificação, descrito anteriormente, a partir de afluente, efluente e dejetos brutos de suínos foi de 28.0%.

### c.3) Análises dos vírus entéricos

Das 40 amostras avaliadas, 60% (24/40) foram positivas para PAdV; 77,5% (31/40) para PCV-2 e 37,5% (15/40) para RVA.

Os resultados obtidos quanto à quantificação viral, tanto no inverno, quanto no verão, nas amostras de afluente e efluente do BA não mostraram reduções estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ), sugerindo ineficiência deste sistema na inativação destes biomarcadores. Os valores médios das quantificações dos vírus entéricos detectados nas amostras estão plotados na **Figura 6 (a e b)**.

**Figura 6:** Valores médios da quantificação dos vírus entéricos detectados nas amostras durante inverno e verão, sendo a) Amostras correspondentes ao Afluente e b) Amostras correspondentes ao Efluente.

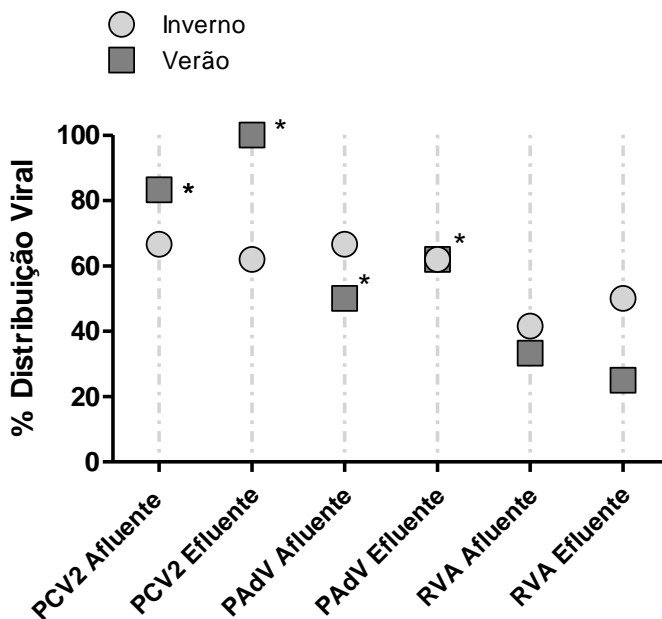


Os estudos da distribuição sazonal, os vírus investigados mostraram que no afluente durante o verão 66,6% (8/12) foram positivas para PCV-2 e para PAdV e para RVA 41,6% (5/12) das amostras foram positivas; No inverno 83,3% (10/12) foram positivas para PCV-2, 50,0% (6/12) para PAdV e 33,3% (4/12) para RVA. No efluente durante o verão



62,5% (5/8) foram positivas tanto para PCV2 quanto para PAdV e 50,0% (4/8) foram positivas para RVA; No inverno 100,0% (8/8) foram positivas para PCV-2, 62,5% (5/8) para PAdV e 25,0% (2/8) para RVA. A presença de PCV-2 e PAdV durante o verão, tanto no afluente quanto no efluente esteve correlacionada positivamente,  $p \leq 0,05$  (**Figura 7**).

**Figura 7:** Distribuição sazonal viral (PCV-2, PAdV e RVA) durante inverno e verão (n=24 para afluente e n=16 para efluente). PCV2 e PAdV foram positivamente correlacionados durante verão (\*).



Quando *Salmonella* spp. foi pesquisada, sua presença foi relatada em 27,5% (11/40) das amostras totais. A positividade encontrada nas amostras de afluente e efluente, 19,0% e 25,0%, respectivamente, não apresentou diferença significativa; A distribuição sazonal das

*Salmonella* spp. foi significativamente maior no verão que no inverno, com 40,0% das amostras positivas no verão e 15,0% no inverno. *Salmonella* spp. foi detectada somente na Granja 1 (afluente e efluente) e Granja 3 (dejeito bruto).

#### c.4) Estudo de infecciosidade e genotipagem de PCV-2

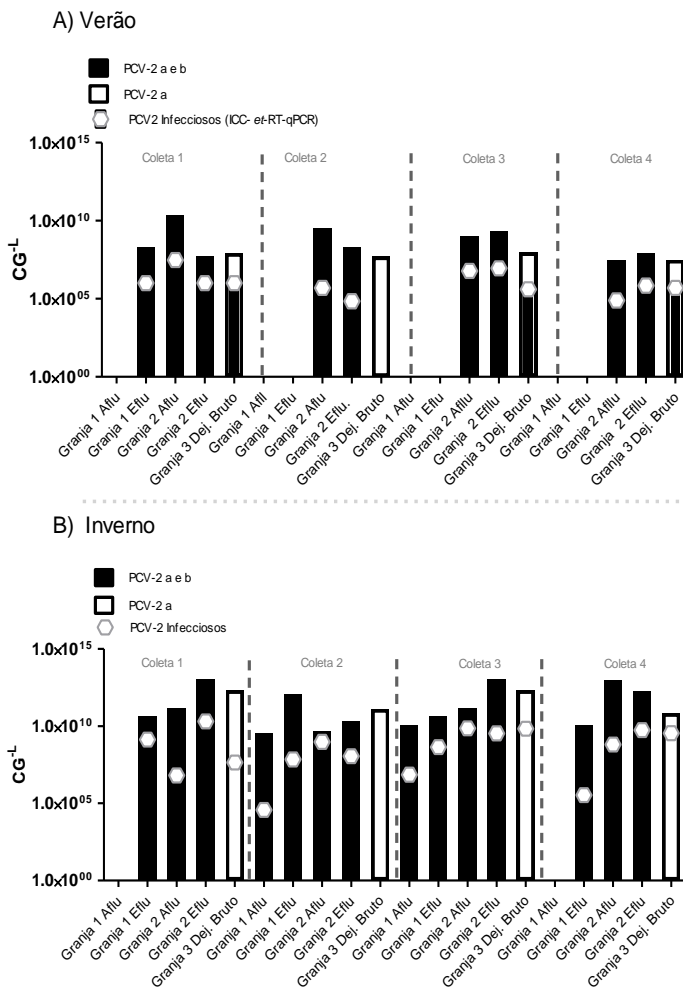
As amostras que apresentaram presença de genoma de PCV-2 foram selecionadas para o ensaio de quantificação de partículas virais infecciosas, totalizando 31 amostras.

Os ensaios de infecciosidade mostraram que PCV-2 infecciosos foram detectados em 93,5% (29/31) das amostras, tanto no afluente quanto no efluente, sendo 12 delas provenientes das coletas de verão e 17 delas das coletas de inverno.

Quanto à genotipagem dos PCV-2, ambos os genótipos “a” e “b” foram detectados nas Granjas 1 e 2, tanto no afluente quanto no efluente; Na Granja 3 apenas o genótipo “a” foi detectado. Os resultados gerais mostraram que 74,1% (23/31) das amostras continham ambos os genótipos (“a” e “b”) e 25,9% (8/31) continham apenas PCV-2a.

A **Figura 8 (a e b)** apresenta as amostras que continham PCV-2 infecciosos, bem como os genótipos detectados.

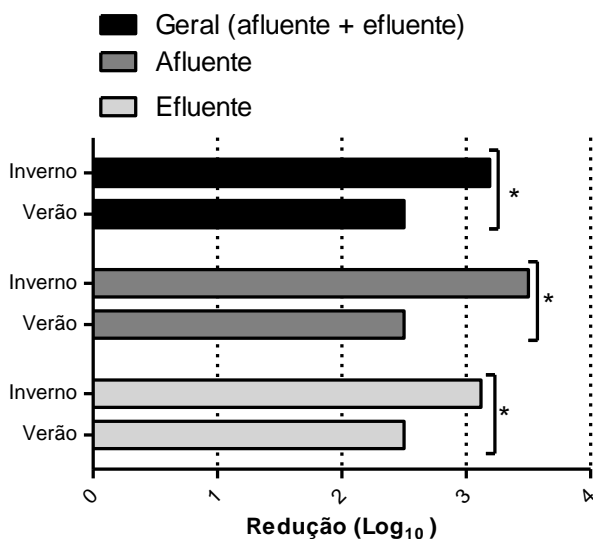
**Figura 8:** Quantificação de PCV-2 infecciosos e seu genótipo em afluentes e efluente coletados no verão (a) e no inverno (b).



c.5 PCV-2: Comparação entre genomas totais e proveniente de partículas infecciosas

Quando os valores de cópias genômicas totais de PCV2 (por qPCR) e os valores de cópias genômicas somente provenientes de PCV-2 infecciosos (por ICC-et-RT-qPCR) foram comparados, houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ), reduzindo da porção de genomas totais para apenas genomas provenientes de PCV-2 infecciosos uma média de 2.5  $\log_{10}$  durante o verão e 3.1  $\log_{10}$  durante o inverno (**Figura 9**).

**Figura 9:** Diferença de genomas totais e proveniente de PCV-2, expressa pela redução média obtida calculada pela equação:  $\text{Log. de redução} = \log_{10} N_t/N_0$ , onde  $N_t$ : CG quantificadas por ICC-RT-qPCR (PCV-2 infecciosos) e  $N_0$ : CG quantificadas por qPCR. (CG).



#### d) Discussão

O monitoramento anual dos parâmetros físico-químicos nas amostras de afluente e efluente dos BAs, tais como a concentração de NAT, mostrou diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) nas amostras brutas em relação às processadas em BA. As concentrações de pós-digestão foram sempre maiores do que os de esterco bruto. Estes resultados refletem a degradação de azoto orgânico e a amonificação de estruturas mais complexas, tais como proteínas, presentes no material em partículas (WIESMANN et al., 2007). As oscilações de concentração NAT durante o verão e inverno podem ser justificadas devido ao equilíbrio de  $\text{NH}_4\text{-N}$  e  $\text{NH}_3\text{-N}$ , que são diretamente proporcionais à temperatura (amostra ambiental e) e respectivo pH (TCHOBANOGLIOUS et al., 2003).

Quanto às análises do monitoramento microbiológico nas amostragens, *Salmonella* spp. e vírus entéricos, especialmente os PCV-2 infecciosos foram detectados nos afluentes suínos e dejetos brutos, bem como nos efluentes após o tratamento em BA, mostrando que tais sistemas, nas condições de operacionalidade avaliadas, não foram capazes de inativar todos os patógenos entéricos. Nos tratamentos de produtos e destinação de subprodutos agropecuários, os esforços devem ser focados na remoção eficiente de patógenos, visando diminuir o risco para o ambiente, saúde animal e humana, permitindo a utilização e reúso seguro desses resíduos (KUNZ et al., 2009).

A presença de *Salmonella* spp. e de vírus entéricos não foi correlacionada, isso porque os vírus são mais resistentes frente às bactérias, já que são descritos por resistirem a uma variedade de fatores de inativação naturais em diversas matrizes ambientais, como a água potável, água de reúso agropecuário e esgotos (STEWART et al., 2008;.

FONG & LIPP, 2005; FONGARO et al., 2012). Os suínos podem ser reservatórios assintomáticos de *Salmonella* spp. e vírus entéricos, como hepatite E (HEV), RVA e RVC, que podem ser excretados intermitente em fezes, acometendo o ambiente e ainda sendo possível potencial contaminação de carcaças em abatedouros, gerando problemas cruciais nesta cadeia produtiva (BAPTISTA et al., 2010).

A investigação de vírus entéricos, que envolveu os PAdV, PCV-2 e RVA, mostrou que PCV-2 foi o mais frequentemente detectado, seguido pela presença do PAdV e RVA, isso tanto no afluente quanto no efluente suinícola. Vírus entéricos de genoma DNA, tais como os PCV-2 e PAdV, são normalmente muito resistentes no ambiente e aos procedimentos de desinfecção e por tais razões são considerados bioindicadores (DE MOTES, et al, 2004, HUNDESA et al, 2006; VIANCELLI et al, 2013; FONGARO et al., 2014). Já os RVA, de genoma RNA fita dupla e segmentada, zoonótico, também é conhecido por ser resistente nos ambiente e é o principal patógeno associado a gastroenterite aguda em animais e humanos juvenis (ESTES & KAPIKIAN, 2007). No que diz respeito à susceptibilidade à infecções pelos patógenos entéricos aqui estudados, esta está intimamente relacionada com alterações na imunidade, podendo ser assintomáticas em muitos casos (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Apesar das vantagens de usar os vírus entéricos aqui pesquisados como biomarcadores, estes possuem a desvantagem de serem fastidiosos *in vitro* (cultura celular), como é o caso dos PAdV e RVA) e quando cultiváveis, caso dos PCV-2 não produz efeito citopático característico, dificultando as análises de infecciosidade viral (FONG E LIPP, 2005; TSENG E TSAI, 2007). Tendo em vista a dificuldade de avaliar a

infecciosidade de tais vírus, uma vez que a presença de seus genomas (detectados por qPCR neste trabalho) não garante que as partículas virais estejam infecciosas, pois fatores como temperatura, pH e radiação U.V são conhecidos por provocarem modificações conformacionais moderadas no capsídeo viral, bem como a destruição dos seus capsídeos, resultando em perda da capacidade infecciosa (THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003; FONG & LIPP, 2005).

Os resultados de infecciosidade de PCV-2 mostraram que mesmo após o processo de BA continuava infeccioso e sendo ele um biomarcador, sugere-se que os demais patógenos com características similares também continuavam com tal capacidade infecciosa, reforçando a ineficiência da biodigestão anaeróbia empregada neste estudo, no que se referiu à sanitização. O fato de haver maior remoção de vírus infecciosos no verão que no inverno remete a maior temperatura de operação dos BAs do Tipo Lagoa Coberta, pois estes atuam em temperatura ambiente. A presença de ambos os genótipos de PCV2 (a e b) investigados neste trabalho e de PCV2 infeccioso levam-nos a sugerir a possibilidade de infecção e de co-infecção da população de suínos com tal vírus. Populações de suínos co-infectados com PCV2a e PCV2b apresentam maior risco de desenvolver doenças graves relacionadas, levando à perda de produção e prejuízos econômicos (OPRIESSNIG et al., 2003; RAMAMOORTHY et al., 2009; DREW 2011). No entanto, para determinar o risco potencial que tais patógenos detectados representam para a saúde animal, e no caso dos patógenos zoonóticos para a saúde humana, uma análise de avaliação de risco microbiológico quantitativo será realizada em um estudo futuro.

A ineficiência dos BA do tipo “Lagoa Coberta” na inativação de patógenos gera um problema crucial para a atividade agrícola e reciclo de tais efluentes, apontando a necessidade de políticas para a regulamentação e fiscalização dos seus usos, bem como sua qualidade sanitária.

### **e) Considerações finais do Capítulo I**

A ineficiência dos BAs do tipo “Lagoa Coberta” na inativação de patógenos, considerando os vírus entéricos, gera um problema crucial para a atividade agrícola e reciclo de tais efluentes, apontando a necessidade de políticas de pós-tratamento dos efluentes gerados e para a regulamentação e fiscalização de sua disposição e qualidade sanitária.

Referências utilizadas no Capítulo I



## f) Referências do Capítulo I

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22<sup>st</sup> ed. *American Public Health Association Washington, DC*, 2012.

BAPTISTA, F.M, Dahl J, Nielsen LR. Factors influencing *Salmonella* carcass prevalence in Danish pig abattoirs. *Prev Vet Met*, 95:231-238, 2010.

CONAMA. Res. 430. República Federativa do Brasil, Brasília, DF.. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>, 2012.

COSTANTINI, V.P, AZEVEDO, A.C, LI, X., WILLIAMS, M.C., MICHEL, F.C., SAIF, L.J. Effects of different animal waste treatment technologies on detection and viability of porcine enteric viruses. *Appl Environ Microbiol*, 73:5284–91, 2007.

DE MOTES, C.M.P., CLEMENTE-CASARES, A., HUNDESA, M, GIRONES, R. Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination, *Appl Environ Microbiol*, 70: 1448–1454, 2004.

DREW, T.W. The emergence and evolution of swine viral diseases: to what extent have husbandry systems and global trade contributed to their distribution and diversity? *R Sc et Technique*, 30: 95–106, 2011

ESTES, M.K., KAPIKIAN, A.Z., ROTAVIRUSES. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., And Lamb, R.A. (Eds.), *Fields Virology*, Lippincott Williams and Wilkins, p. 1917-74, 2007.

FONG, T.T, LIPP, E.K. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69:357–371, 2005.

FONGARO, G., NASCIMENTO, M. A., RIGOTTO, C., RITTERBUSCH G., DA SILVA A.D., ESTEVES, P.A., BARARDI, C.R.M. Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. *Vir J* 10:166, 2013.

FONGARO, G., NASCIMENTO, M.A., VIANCELLI, A., TONETTA, D., PETRUCIO, M.M., BARARDI, C.R.M. Surveillance of human viral contamination and physicochemical profiles in a surface water lagoon. *Wat Science Techn.*, 66:2682–2687, 2012.

FONGARO, G., VIANCELLI, A., MAGRI, M.E., ELMAHDY, E.M., BIESUS, L.L., KICH, J.D., KUNZ, A., BARARDI, C.R. Utility of specific biomarkers to assess safety of swine manure for biofertilizing purposes. *Sci Total Environ.* (479-480):227-283, 2014.

GIRONES, R., FERRÚS, M.A., ALONSO, J.L., RODRIGUEZ-MANZANO, J., CALGUA, B., CORRÊA, A.A., HUNDESA, A., CARRATALA, A., BOFILL-MAS, S. Molecular detection of pathogens

in water - The pros and cons of molecular techniques. *Water Res*, 44:4325–39, 2010.

GRIFFITH, R.W., SCHWARTZ, K.J., MEYERHOLZ, D.K. *Salmonella*. In: Diseases of Swine, 9<sup>th</sup> Ed., Eds: Straw, BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, Blackwell Publishing, p. 739-751, 2006.

HAMZA, A., JURZIK, L., UBERLA, K., WILHELM, M. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *Inter J Hyg Environ Health*, 214: 424–36, 2011.

HARDING, J.C.S., ELLIS, J.A., MCINTOSH, K.A., KRAKOWKA, S. Dual heterologous porcine circovirusgenogroup 2a/2b infection induces severe disease in germfree pigs. *Vet Microbiol*, 145: 209–19, 2010.

HÖLZEL, C., BAUER, J. *Salmonella* sp. in Bavarian liquid pig manure: occurrence and relevance for the distribution of antibiotic resistance. *Zoo Publ Health*, 55 (3): 133-8, 2008.

HUNDESA, A., MALUQUER DE MOTES, C., BOFILL-MAS, S., ALBINANA-GIMENEZ, N.C., GIRONES, R. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl Environ Microbiol*, 72: 7886–7893, 2006.

HUNDESA, A., MALUQUER DE MOTES, C., ALBINANA-GIMENEZ, N.C., RODRIGUEZ-MANZANO, J., BOFILL-MAS, S., SUÑEN, E., GIRONES, R. Development of a qPCR assay for the

quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J Vir Met*, 158:130–135, 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 2002.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO 10715-2:2000. Water Quality – Detection and enumeration of bacteriophages, 2000.

KIM, D., HA, Y., OH, Y., CHAE, C. Prevalence of porcine circovirus types 2a and b in pigs with and without post-weaning multi-systemic wasting syndrome. *The Veterinary Journal*, 188: 115–7, 2011.

KIM, J., HAN, D.U., CHOI, C., CHAE, C. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *J Vir Met*, 98: 25–31, 2011

KO, G., CROMEANS, T.L., SOBSEY, M.D. Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*, 69:7377–84, 2003.

KUNZ, A., MIELE, M., STEINMETZ, R.L.R. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. *Bioresour Technol*, 100: 5485–9, 2009.

LEWIS, G.D., METCALF, T.G. Polyethylene Glycol Precipitation for Recovery of Pathogenic Viruses, Including Hepatitis A Virus and

Human Rotavirus, from Oyster, Water, and Sediment Samples. *Appl Environ Microbiol*, 54(08): 1983-8, 1988.

MALUQUER DE MOTES, C., CLEMENTE-CASARES, P., HUNDESA, A., MARTIN, M., GIRONES, R. Detection of bovine and porcine adenovirus for tracing the source of fecal contamination. *Appl Environ Microbiology*, 70: 1448–54, 2004.

MICHAEL, G., SIMONETI, R., COSTA, M., CARDOSO, M. Comparison of different selective enrichment steps to isolate *Salmonella* sp. from feces of finishing swine. *Braz. J. Microbiol*, 34:138-42, 2003.

OPRIESSNIG, T., YU, S., GALLUP, J.M., EVANS R.B., FENAUX, M., PALLARES, F., THACKER, E.L. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pat*, 40: 521–9, 2003.

OPRIESSNIG, T., RAMAMOORTHY, S., MADSON, D.M., PATTERSON, A.R., PAL, N., CARMAN, S., MENG, X.J, HALBUR, P.G. Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *J Gen Virol* , 89: 2482–91, 2008.

RAMAMOORTHY, S., HUANG, F.F., HUANG, Y.W., MENG, X.J. Interferon-mediated enhancement of in vitro replication of porcine circovirus type 2 is influenced by an interferon-stimulated response element in the PCV2 genome. *Virus Res.*, 145(2):236-43, 2009.

RIGOTTO, C., SINCERO, T.C., SIMÕES, C.M., BARARDI, C.R. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICCP/PCR). *Water Res* 39: 297–304, 2005..

SEGALÉS, J., OLVERA, A., GRAU-ROMA, L., CHARREYRE, C., NAUWYNCK, H., LARSEN-LET, A.L. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec* 162: 867-868, 2008.

SEGANFREDO, M.A. Environmental management in pig farming. Brasilia, *Brazil: Embrapa Technological Information*, p.302, 2007.

SHANGJIN, C., CORTEY, M., SEGALÉS, J. Phylogeny and evolution of the NS1 and VP1/VP2 gene sequences from porcine parvovirus. *Vir Res*, 140(1-2): 209-15, 2009.

SOBSEY, M.D., KHATIB, L.A., HILL, V.R., ALOCILJA, E., PILLAI, S. Pathogens in animal wastes and the impacts of waste management practices on their survival, transport and fate. In: Rice JM, Caldwell DF, Humenik FJ. *Animal Agriculture and the Environment*. St. Joseph: ASABE, p 609-66, 2006.

STEWART, J.R., GAST, R.J., FUJIOKA, R.S., SOLO-GABRIELE, H.M., MESCHKE, J.S., AMARAL-ZETTLER, L.A., DEL-CASTILLO, E., POLZ, M.F., COLLIER, T.K., STROM, M.S., SINIGALLIANO, C.D., MOELLER, P.D., HOLLAND, A.F. The

coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. *Envir Health*, 7 (2), 2008.

TCHOBANOGLIOUS, G., BURTON, F.L., STENSEL, H.D. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, fourth ed. McGraw-Hill, New York, 2003.

TOPP, E., SCOTT, A., LAPEN, D.R., LYAUTEY, E., DURIEZ, P. Livestock waste treatment systems for reducing environmental exposure to hazardous enteric pathogens: Some considerations. *Bior Technol*, 100(22): 5395-5398, 2009.

TSENG, C.H., TSAI, H.J. Sequence analysis of a duck picornavirus isolate indicates that it together with porcine enterovirus type 8 and simian picornavirus type 2 should be assigned to a new picornavirus genus. *Virus Res*, 129:104–114, 2007

VIANCELLI, A., GARCIA, L.A.T., KUNZ, A., STEINMETZ, R., ESTEVES, P.A., BARARDI, C.R.M. Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples collected from swine manure treatment systems. *Res Vet Sci* 93: 538–543, 2011.

VIANCELLI, A., KUNZ, A., STEINMETZ, R.L.R., KICH, J.D., SOUZA, C.K., CANAL, C.W, COLDEBELLA, A., ESTEVES, P.A., BARARDI, C.R.M. Performance of two swine manure treatment systems on chemical composition and on the reduction of pathogens. *Chemosphere* 90: 1539-1544, 2013.

WIESMANN, U., CHOI, I.S., DOMBROWSKI, E.M. Fundamentals of biological wastewater treatment. Weinheim: Willey-VCH Verlag GmbH & Co. p.355, 2007.

ZENG, S.Q., HALKOSALO, A., SALMINEN, M., SZAKAL, E.D., PUUSTINEN, L., VESIKARI, T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods*, 153: 238-40, 2008.



- CAPÍTULO II -

*Remoção de patógenos entéricos em dejetos suínicos tratados em sistema aeróbio: reciclo de água e lodo*

## Artigo Publicado

Settling and survival profile of enteric pathogens in the swine effluent for water reuse purpose.

FONGARO, G, KUNZ A, MAGRI M.E, SCHISSI, C.D, VIANCELLI A, PHILIPPI, L.S, BARARDI, C.R.M. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* DOI/10.1016/j.ijheh.2016.07.004, 2016.



### Settling and survival profile of enteric pathogens in the swine effluent for water reuse purpose

G. Fongaro<sup>1,2</sup>, A. Kunz<sup>1,2</sup>, M.E. Magri<sup>2,3</sup>, C.D. Schissi<sup>4</sup>, A. Viancelli<sup>4</sup>, L.S. Philippi<sup>5</sup>, C.R.M. Barardi<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Centro de Estudos em Saúde Ambiental, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>2</sup>Ecologia Urban e Area, Curitiba/SC, Brazil

<sup>3</sup>COGNEBIOGOT - UNIOESTE, Cascavel/SC, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de Análise Ambiental, Universidade do Oeste do Paraná, Cascavel/SC, Brazil

<sup>5</sup>Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 27 April 2016

Received in revised form 10 June 2016

Accepted 1 July 2016

##### Keywords:

Swine effluent

Pathogens settling

Pathogens inactivation

Reuse

#### ABSTRACT

The present study evaluated the pathogens persistence and settling profile in swine effluent. We determined the enteric pathogens settling characteristics, their survival and inactivation profile in swine effluent (for water reuse purpose) and in sludge (generated after aerobic treatment – during secondary settling process). The study was performed in: laboratory-scale and in full scale (reuse treatment plant). Enteric viruses and enteric bacteria were used as biomarkers. Results showed that these enteric pathogens were significantly reduced from swine effluent during secondary settling process, and enteric viruses removal was correlated with the suspended solids concentration. The design of secondary settlers can be adapted to improve pathogens removal, by diminishing the solids loading rate per area and increasing in higher hydraulic retention times.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

## a) Objetivo específico

Avaliar em escala real e laboratorial a estabilidade e sedimentação de patógenos entéricos em dejetos suínolas tratados em Reator Biológico Aeróbio (RBA) seguido pelo processo de sedimentação, bem como avaliar a inativação dos patógenos no lodo ativado estocado.

## **b) Metodologia**

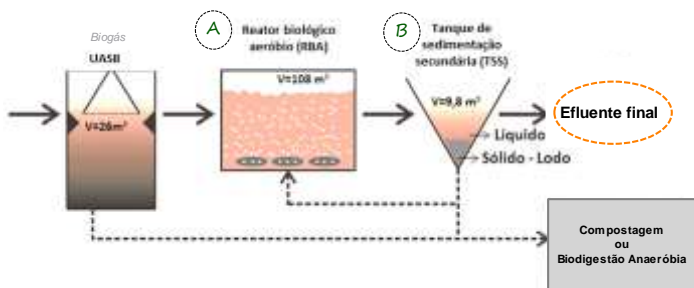
### b.1) Amostragens realizadas na Estação de Tratamento de Dejetos de Suínos (ETDS) da Embrapa Suínos e Aves

Os estudos em escala real e laboratorial foram realizados a partir de amostras coletadas na Estação de Tratamento de Dejetos de Suínos (ETDS) da Embrapa Suínos e Aves, localizada no município de Concórdia, Estado de Santa Catarina, Brasil (27°18' S, 51°59' W). A ETDS recebe dejetos suinícolas da produção experimental da Embrapa Suínos e Aves, produzindo 15m<sup>3</sup>/dia de dejetos (KUNZ et al. 2009). Basicamente a ETDS é composta sucessivamente por: 1) Tanque de recepção e homogeneizador de dejetos brutos, com V=40m<sup>3</sup>; 2) Tanque de entrada para Flotodecantador (decantador primário), com V=15m<sup>3</sup>; 3) Reator anaeróbico do tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), com V=26m<sup>3</sup>; 4) Tanque do Reator Biológico Anaeróbico (RBA), com V=108 m<sup>3</sup>; 5) Tanque de sedimentação secundária (TSS), com V=9,8m<sup>3</sup>; Após sedimentação secundária o efluente é considerado água de reúso e o lodo gerado pode ser utilizado na biofertilização (KUNZ et al. 2009).

As amostras foram coletadas semanalmente, para melhor representar o sistema, em oito campanhas de coletas (quatro durante o verão e quatro durante o inverno de 2013, em Fevereiro e Agosto, respectivamente). As amostras foram imediatamente processadas para realização das análises físico-químicas e microbiológicas propostas. As

amostragens do sistema em escala real foram provenientes do RBA e do TSS, e as amostragens para realização dos ensaios em escala laboratorial foram provenientes do RBA, de acordo com a **Figura10**.

**Figura 10:** Representação esquemática da ETDS e dos locais amostrados: A) RBA e B) efluente do TSS.



### b.1.2) Escala real: Processamento e Análises das amostras coletadas na ETDS

Durante as oito campanhas de coletas um total de 16 amostras foram obtidas, oito do RBA e oito do TSS. Todas as amostras foram avaliadas para a presença de *Salmonella* spp. (Segundo ISSO 6579 (2002)), e quantificação de PCV-2, PADv e RVA (por qPCR, segundo Hundesa et al. (2009), Opriessnig et al. (2003) e Zeng et al. (2008), respectivamente.

Nitrogênio amoniacal total (NAT), pH, temperatura e teor de sólidos totais, fixos e voláteis foram avaliados de acordo com APHA (2012).

### b. 1.3) Escala laboratorial: Processamento e Análises das amostras provenientes do RBA

Estes ensaios foram realizados para que fosse cumprida a meta de estudar a sobrevivência de patógenos entéricos e sua taxa de

sedimentação em efluentes suínos coletadas após tanque aeróbio RBA. Para isso, 10L de amostra proveniente do RBA foram coletadas e inoculadas com quantidades conhecidas de bacteriófago PhiX 174 ( $2,8 \times 10^5$  UFP mL<sup>-1</sup>), HAdV-2 ( $5,0 \times 10^6$  GC mL<sup>-1</sup>) e *Salmonella enterica*-Typhiurium ( $9,0 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>), como modelos de patógenos entéricos.

*Cones Imhoff* (V=1L, com dimensão de 120mm de diâmetro e 480 mm de altura) receberam 1L de amostras de efluente do RBA e a sedimentação dos patógenos foi avaliada nos seguintes tempos: 0, 5, 10, 20, 40 min e 2,5, 5, 10, 24, 48, 72 e 120 h por meio de coleta da fração líquida. As amostras da fração sólida foram processadas após 24h, 48, 72 e 120 horas de repouso, sendo 10 mL cuidadosamente coletadas e utilizadas para a enumeração de bacteriófagos PhiX-174, *S. enterica* e HAdV-2, bem como para a avaliação de teor de sólidos sedimentáveis (este último de acordo com APHA (2012)).

Para determinar a sobrevivência dos patógenos nas frações líquidas e sólidas (potencial água de reuso e biofertilizante, respectivamente), 200 mL do efluente pós-sedimentação e 200 mL de lodo ativado foram alocados em frascos de borossilicato com 250 mL de capacidade, em triplicata, e estas foram inoculadas com quantidades conhecidas de bacteriófagos PhiX-X 174, *S. entérica* e HAdV-2, que foram avaliados durante > 0, 5, 10, 20, 40 min e 2,5, 5, 10, 24, 48, 72 e 120 h de tempo de contato com as matrizes.

Para a análise de *S. enterica*, 1,0 mL de amostra foi diluído e com 9 mL de solução de NaCl tamponada com Tween-peptona, pH 7,0, seguido por uma série de diluições na base 10 com a mesma solução tampão. Para a enumeração das *S. enterica*, 100 µL das diluições foram

espalhadas em placas de Petri (10mL) com ágar-lisina-desoxicolato contendo xilose (XLD) e novabiocina e incubadas a 37°C por até 48 h, quando procedeu-se a contagem de Unidades Formadoras de Placa (UFP), segundo ISO 6579 (2002).

Os bacteriófagos PhiX 174 foram propagados em *Escherichia coli* (ATCC13706), e enumerados pelo método de dupla camada de ágar (ISO10705-2: 2000 (2001)), utilizando 1,0 mL de amostra diluída com 9,0 ml de solução salina de peptona, pH 7,0, seguido por diluições seriadas na base 10 com a mesma solução. As Unidades Formadoras de Placas de Lise (UFP) foram contabilizadas após 12 h de incubação em temperatura de 37 °C.

HAdV-2 foi propagado em linhagem contínua de células A549 permissivas a maioria dos HAdV e derivadas de carcinoma de pulmão humano, European Collection of Cell Cultures) e enumerados por ICC-et-RT-qPCR., segundo Fongaro et al, 2013 e Ko et al., 2003.

## b.2) Análises estatísticas

O *software* utilizado para as análises estatísticas foi o *GraphPad Prism* 5.0. Statistical. Foram utilizados os testes *One-Way* de variância (ANOVA) para avaliar a diferença entre os grupos, com 95% de confiança, seguido do teste *Bonferroni's Multiple Comparison* para avaliar aprofundada mente as diferenças entre os grupos. Os testes de correlação foram realizados pelo usando *Pearson Correlation*, sempre que necessário. Os valores considerados significativos foram os que apresentaram  $p \leq 0,05$ .

O tempo para a redução decimal dos microrganismos por inativação ( $iT_{90}$ ) e redução decimal por sedimentação ( $sT_{90}$ ) no efluente e lodo foram calculados considerando curvas em regressão linear, usando *Microsoft Excel*.

### **c) Resultados**

c.1) Avaliações das amostras coletadas na ETDS em escala real: Análises físico-químicas e microbiológicas

A **Tabela 2** apresenta o perfil dos parâmetros físico-químicos no RBA e no TSS durante as estações de verão e o inverno. As médias de temperatura da amostra, série de sólidos (fixos, voláteis e suspensos) e NAT mostraram diferenças significativas em ambos os locais de coleta nas diferentes estações, inverno e verão ( $P \leq 0,05$ ).



**Tabela 2:** Médias e desvios padrões (DP) dos parâmetros físico-químicos avaliados no RBA e TSS durante o inverno e verão.

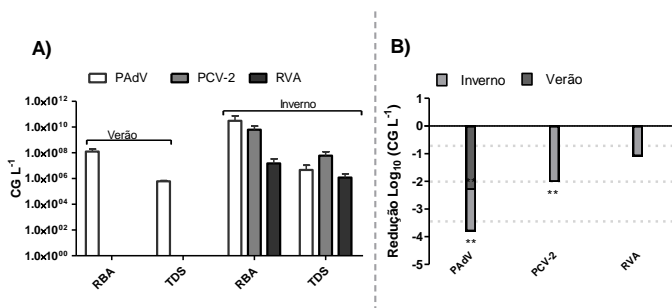
| Parâmetros                                  | RBA Média ± DP (n=3) |               | TSS Média ± DP (n=3) |               |
|---|----------------------|---------------|----------------------|---------------|
|   | Verão                | Inverno       | Verão                | Inverno       |
| <b>pH</b>                                   | 7,8 ± 0,5            | 6,5 ± 0,2     | 7,5 ± 0,4            | 7,2 ± 0,2     |
| <b>Temperatura (°C)</b>                     | 30,8 ± 1,5           | 27 ± 1,5      | 26 ± 0,8**           | 23 ± 1,5**    |
| <b>Sólidos voláteis (mg L<sup>-1</sup>)</b> | 2419 ± 333           | 2541 ± 776    | 625 ± 157            | 828 ± 260     |
| <b>Sólidos Fixos (mg L<sup>-1</sup>)</b>    | 1419 ± 964**         | 2404 ± 175**  | 1291 ± 462**         | 1753 ± 610**  |
| <b>Sólidos Totais (mg L<sup>-1</sup>)</b>   | 3838 ± 614**         | 4945 ± 926**  | 1916 ± 126**         | 2581 ± 32**   |
| <b>NAT (mg L<sup>-1</sup>)</b>              | 29,5 ± 11,5**        | 46,5 ± 14,2** | 59,6 ± 37,8**        | 73,2 ± 32,0** |

DP: Desvio Padrão; (\*\*): Diferença significativa estatisticamente (p ≥ 0,05)

As análises dos patógenos entéricos mostraram que *Salmonella* spp. não foi detectada em nenhuma das amostras, porém estas mesmas amostras quando avaliadas para vírus entéricos apresentaram o seguinte perfil: 1) No verão apenas PAdV foi detectado no RBA e TSS; Durante o inverno todos os patógenos virais estudados foram detectados nas amostras do RBA e do TSS. A **Figura 11-a** apresenta a média de **PAdV**, **PCV2** e **RVA** detectados no RBA e TSS no inverno e verão.

A eficiência da remoção viral após processamento em TSS foi significativa para PAdV, PCV-2 reduzindo maximamente a carga viral em 99,9% ( $3 \log_{10}$ ), 99,0% ( $2 \log_{10}$ ), respectivamente e RBA foi reduzido em 90,0% ( $1 \log_{10}$ ), não sendo significativa tal redução (**Figura 11 a-b**).

**Figura 11:** a) Ocorrência de PAdV, PCV2 e RVA durante o inverno e o verão em amostras provenientes do RBA e TSS. b) Eficiência da remoção viral após processamento em TSS, em que \*\* indica remoção significativa.



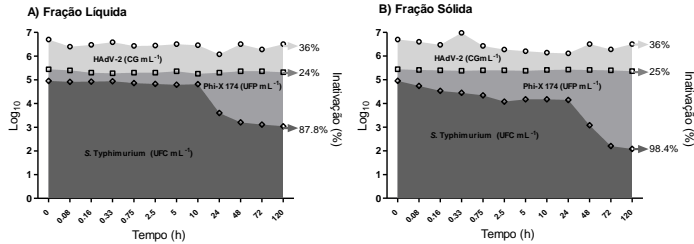
c. 2) Avaliações das amostras coletadas na ETDS em escala laboratorial

c.2.1) Estabilidade dos patógenos entéricos

A estabilidade dos patógenos entéricos expressa através do *Ct* (h) na fração líquida do efluente demonstrou que PhiX-174 e HAdV-2 mantiveram-se estáveis até 120 h, não apresentando reduções significativas. As concentrações de *S. enterica* foram significativamente reduzidas após 48h ( $p=0,03$ ). Os percentuais de inativação até 120h foi de 87,8% para *S. enterica*, 36% para HAdV-2 e 24% para PhiX-174 (**Figure 12-a**).

A estabilidade dos patógenos entéricos na fração sólida (considerada lodo), também não demonstrou redução significativa para PhiX-174 e HAdV-2 até 120h, mas para *S. enterica* houve redução significativa após 24h ( $p=0,02$ ). Os percentuais de inativação até 120 h foram de 98,4% para *S. enterica*, 36% para HAdV-2 e 25% para PhiX 174 (**Figure 12-b**).

**Figura 12:** Cinética de inativação de PhiX-174, HAdV-2 e *S. Typhimurium* em contato com a fração líquida (a) e a fração sólida (b) do processo de sedimentação e a taxa de inativação destes patógenos entéricos.



### c.2.2) Avaliação da sedimentação dos patógenos entéricos nas amostras coletadas na ETDS

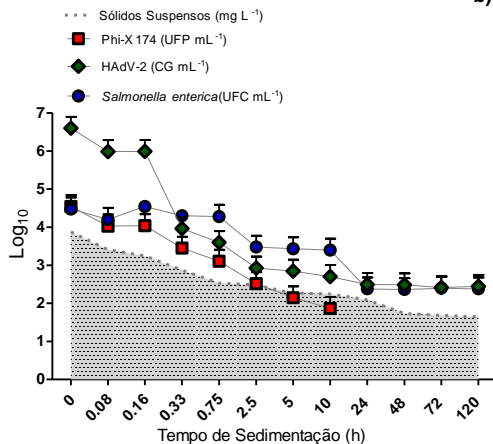
A sedimentação dos patógenos entéricos da fração líquida para a sólida foi avaliada por até 120 h e apresentou capacidade significativa de sedimentação dos PhiX-174 e HAdV-2 quando comparados com a sedimentação de *S. enterica* ( $p < 0.05$ ). *S. enterica* foi significativamente reduzida nos tempos de 0,75 h e 5h, HAdV-2 em 0,33h, 2,5h e 24h, PhiX-174 em 0,16, 0,33, 0,75, 2,5, 5 e 10h ( $p < 0.05$ ), não sendo mais detectado após este tempo na fração líquida (**Figure 13-a**). Em paralelo às análises de sedimentação dos patógenos entéricos, foram realizadas análises de sedimentação das partículas presentes no efluente (sólidos suspensos), isso foi analisado por até 120h. A sedimentação de HAdV ( $r^2 = 0,995$   $p < 0.05$ ) e PhiX-174 ( $r^2 = 0,992$   $p < 0.05$ ) estiveram positivamente correlacionados com as partículas sólidas suspensas, no entanto essa correlação não foi observada para *S. enterica* ( $p > 0,05$ ) (**Figure 13-a**).

A avaliação dos patógenos entéricos na fração sólida foi realizada após 24, 48, 72 e 120h do processo inicial de sedimentação, bem como foi avaliada a concentração dos patógenos entéricos nesta fração sólida (lodo). A concentração de PhiX-174 não aumentou significativamente entre os tempos avaliados, e o perfil de sólidos também. HAdV-2 e *S. enterica* aumentaram significativamente no tempo 72 h ( $p = 0,02$ ) em

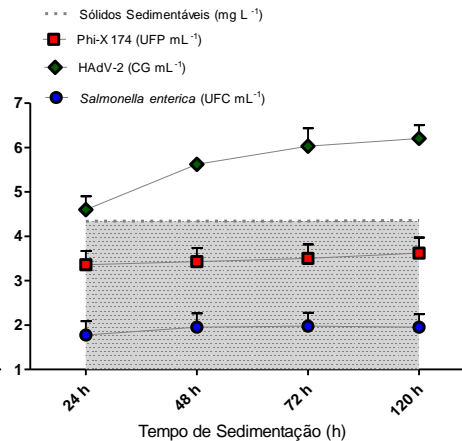
comparação com às quantidades detectadas em 24 h após o processo de sedimentação (**Figura 13 b**).

**Figura 13:** Perfil da sedimentação de partículas sólidas em suspensão, de PhiX-174, HAdV-2 e *S. entérica* em efluente suíno durante 120h de sedimentação, na fração líquida (a) e na fração sólida (b).

**a) Fração Líquida**



**b) Fração Sólida**



### c.2.3 Inativação e sedimentação de patógenos entéricos nos efluentes suínos: modelo preditivo

A média de  $iT_{90}$  da *S. enterica* no efluente durante o evento de sedimentação foi de 52 h ( $r^2=0,79$ ) e de 43 h ( $r^2= 0,88$ ) no lodo; HAdV-2 e PhiX-174 não reduziram significativamente em até 120 h de avaliação ( $p=0,3$ ). A média de  $sT_{90}$  da *S. enterica*, HAdV-2 e PhiX-174 foram, respectivamente: 3,5h ( $r^2=0,87$ ), 1,8 h ( $r^2= 0,87$ ) e 1,9h ( $r^2= 0,98$ ). Esses dados estão sumarizados na **Tabela 3**.



**Tabela 3:** Média de  $iT_{90}$  e  $sT_{90}$   $h^{-1}$  de HAdV-2, PhiX-174 and *S. Typhimurium* em efluente e lodo da ETDS.

| <b>Biomarcador</b>                                   | <b>Inativação - Efluente</b>            |  |   | <b>Sedimentação - Efluente</b> |  |                           |
|--|---|--|---|--------------------------------|--|---------------------------|
|  | $-k \text{ h}^{-1}$<br>$\pm \text{ DP}$ | $iT_{90} \text{ h}^{-1}$<br>$\pm \text{ DP}$ | $R^2$<br>$\pm \text{ DP}$               | $-k$<br>$\pm \text{ DP}$       | $sT_{90} \text{ h}^{-1}$<br>$\pm \text{ DP}$ | $r^2$<br>$\pm \text{ DP}$ |
| <b>HAdV-2</b>  | ST                                      | ST   | ST                                      | 0,536<br>$\pm 0,02$            | 3.5<br>$\pm 0,05$                            | 0,98<br>$\pm 0,03$        |
| <b>PhiX-174</b>                                      | ST                                      | ST   | ST                                      | 0,279<br>$\pm 0,05$            | 1.8<br>$\pm 0,02$                            | 0,87<br>$\pm 0,02$        |
| <b><i>S. enterica</i></b>                            | 0,019<br>$\pm 0,03$                     | 52,08<br>$\pm 0,3$                           | 0,79<br>$\pm 0,02$                      | 0,502<br>$\pm 0,03$            | 1.9<br>$\pm 0,01$                            | 0,87<br>$\pm 0,02$        |
| <b>Inativação – Lodo do processo de sedimentação</b> |   |  |   |                                |  |                           |
| <b>Biomarcador</b>                                   | $-k \text{ h}^{-1} \pm \text{ DP}$      |  | $iT_{90} \text{ h}^{-1} \pm \text{ DP}$ |                                | $r^2 \pm \text{ DP}$                         |                           |
| <b>HAdV-2</b>  | ST                                      |  | ST                                      |                                | ST   |                           |
| <b>PhiX-174</b>                                      | ST                                      |  | ST                                      |                                | ST   |                           |
| <b><i>S. enterica</i></b>                            | 0,0207 $\pm 0,01$                       |  | 43,42 $\pm 0,05$                        |                                | 0,88 $\pm 0,02$                              |                           |

$k$ : coeficiente de sedimentação ou inativação  $h^{-1}$ ;  $iT_{90}$ : inativação de 90%  $h^{-1}$ ;  $sT_{90}$ : sedimentação de 90%  $h^{-1}$ .  $r^2$ : coeficiente de determinação; DP: Desvio padrão; ST: sem tendência de decaimento em até 120 h.

#### **d) Discussão**

A eficiência dos tratamentos de dejetos suinícolas normalmente é avaliada pela capacidade de remoção de matéria orgânica, sólidos suspensos e nutrientes (como nitrogênio e fósforo), considerando apenas *Escherichia coli* como biomarcador sanitário. No entanto outros bioindicadores podem ser utilizados para garantir a eficiência de remoção de patógenos, como os vírus entéricos e outras bactérias. Poucos estudos têm demonstrado a eficiência de remoção de patógenos em sistemas de separação de sólido-líquido, como os trabalhos descritos por Kunz et al. (2012) e Viancelli et al. (2013).

O presente estudo elucidou a eficiência de inativação e sedimentação de patógenos em sistema de tratamento sólido-líquido operando tanto em escala real como em escala laboratorial. A concentração de sólidos suspensos na coluna de água foi um fator determinante para promover a remoção de patógenos da fase líquida. Esse parâmetro pode influenciar na dinâmica de sedimentação de patógenos em efluentes (SENDNER et al., 2009). Os resultados em escala laboratorial mostraram que HAdV e PhiX-174 tiveram seu perfil de sedimentação positivamente correlacionado com a sedimentação de sólidos. Esse fato está intimamente correlacionado com a capacidade de agregação dos patógenos e seu processo de inativação, podendo reduzir agentes patogênicos da fração líquida em sistemas como a ETDS, corroborando estudos de Gassilloud & Gantzer (2005) e Dika et al. (2011). A capacidade dos vírus agregarem-se em partículas sólidas orgânicas e entre si varia com o tipo viral e suas propriedades de superfície, como ponto isoelétrico, pH e complexidade da matriz

ambiental no que se refere ao teor de matéria orgânica (GASSILLOUD & GANTZER, 2005; DIKA et al., 2011).

As amostras avaliadas em escala real, provenientes do RBA e TSS, apresentaram PAdV, PCV-2 e RVA, porém observou-se significativa remoção destes vírus no efluente após o processo de sedimentação no TSS, ressaltando a migração desses patógenos da fração líquida para a fração sólida (lodo), contaminando tal matriz, o que significa transferência de contaminação para um novo subproduto do processo. RBA e TSS mostraram presença e maior prevalência de vírus entérico durante o inverno. Explica-se que, neste caso, este fato pode ser devido aos vírus serem mais estáveis em baixas temperaturas, mantendo-se estáveis por mais tempo durante os meses de inverno em ambientes naturais (WEN et al., 2004), uma vez que a temperatura é considerada uns dos fatores mais significativos dos envolvidos na inativação viral em matrizes ambientais (BERTRAND et al, 2012).

Assim como discutido para os patógenos encontrados no afluente e efluente do processo de biodigestão anaeróbia (tratado no Capítulo 1) as análises aqui realizadas reforçam a problemática da presença de marcadores estáveis nos efluentes e lodos suinícolas, destacando os vírus entéricos de DNA, tais como o PCV2 e PAdV, que são resistentes no ambiente e os procedimentos de desinfecção e são intermitentemente excretados por suínos (DE MOTES et al., 2004;. HUNDESA et al., 2006;. VIANCELLI ET AL et al., 2013). Já o RVA, também detectado, é relatado por ser prevalente e resistente aos processos de desinfecção, sendo o principal patógeno associado à

gastroenterite aguda em animais e humanos jovens e considerado vírus entérico zoonótico (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

O estudo de sobrevivência de patógenos entéricos, em escala laboratorial, a partir de efluentes e lodos suínos (fração líquida e sólida, respectivamente), mostrou que o perfil de sobrevivência de *S. Typhimurium* não foi correlacionado com a dos vírus entéricos (HAdV-2 e PhiX 174), isso porque os vírus são mais resistentes a uma variedade de fatores de inativação naturais em várias matrizes ambientais, corroborada com outros estudos realizados por Stewart et al. (2008); Fong e Lipp (2005) e Fongaro et al. (2014), o que poderia explicar a ausência desta bactéria nas amostras provenientes do RBA e TSS em escala real.

Em geral a ótima atuação de reatores aeróbios está relacionada com sua capacidade de formação de biomassa em flocos. Os flocos são formados por matéria orgânica, agregação de fungos, bactérias e protozoários (TCHOBANOGLIOUS ET AL., 2003). Os patógenos em contato com essa biomassa podem ser mais facilmente inativados, considerando a abundância de proteases e metabólitos presentes, como da presença de fungos, bem como pela predação por protozoários (DIKA et al ., 2011).

## **e) Considerações finais do Capítulo II**

Há necessidade de aperfeiçoar os tanques de sedimentação para a remoção de patógenos, adaptando sua área e TRH considerando esse fator. Isso poderia reduzir a capacidade global da planta em operação, mas poderia remover com maior eficiência os patógenos da fração

líquida, os concentrando na fração sólida, facilitando a gestão e o tratamento secundário desse lodo gerado.

## f) Referências utilizadas no Capítulo II

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22<sup>st</sup> ed. *American Public Health Association Washington*, DC, 2012.

BAPTISTA, F.M, Dahl J, Nielsen LR. Factors influencing *Salmonella* carcass prevalence in Danish pig abattoirs. *Prev Vet Met*, 95:231-238, 2010.

CONAMA. Res. 430. República Federativa do Brasil, Brasília, DF.. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>, 2012.

COSTANTINI, V.P, AZEVEDO, A.C, LI, X., WILLIAMS, M.C., MICHEL, F.C., SAIF, L.J. Effects of different animal waste treatment technologies on detection and viability of porcine enteric viruses. *Appl Environ Microbiol*, 73:5284–91, 2007.

DE MOTES, C.M.P., CLEMENTE-CASARES, A., HUNDESA, M, GIRONES, R. Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination, *Appl Environ Microbiol*, 70: 1448–1454, 2004.

DREW, T.W. The emergence and evolution of swine viral diseases: to what extent have husbandry systems and global trade contributed to their distribution and diversity? *R Sc et Technique*, 30: 95–106, 2011

ESTES, M.K., KAPIKIAN, A.Z., ROTAVIRUSES. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., And Lamb, R.A. (Eds.), *Fields Virology*, Lippincott Williams and Wilkins, p. 1917-74, 2007.

FONG, T.T, LIPP, E.K. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69:357–371, 2005.

FONGARO, G., NASCIMENTO, M .A., RIGOTTO, C., RITTERBUSCH G., DA SILVA A.D., ESTEVES, P.A., BARARDI, C.R.M. Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. *Vir J* 10:166, 2013.

FONGARO, G., NASCIMENTO, M.A., VIANCELLI, A., TONETTA, D., PETRUCIO, M.M., BARARDI, C.R.M. Surveillance of human viral contamination and physicochemical profiles in a surface water lagoon. *Wat Science Techn.*, 66:2682–2687, 2012.

FONGARO, G., VIANCELLI, A., MAGRI, M.E., ELMAHDY, E.M., BIESUS, L.L., KICH, J.D., KUNZ, A., BARARDI, C.R. Utility of specific biomarkers to assess safety of swine manure for biofertilizing purposes. *Sci Total Environ.* (479-480):227-283, 2014.

GIRONES, R., FERRÚS, M.A., ALONSO, J.L., RODRIGUEZ-MANZANO, J., CALGUA, B., CORRÊA, A.A., HUNDESA, A., CARRATALA, A., BOFILL-MAS, S. Molecular detection of pathogens

in water - The pros and cons of molecular techniques. *Water Res*, 44:4325–39, 2010.

GRIFFITH, R.W., SCHWARTZ, K.J., MEYERHOLZ, D.K. *Salmonella*. In: Diseases of Swine, 9<sup>th</sup> Ed., Eds: Straw, BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, Blackwell Publishing, p. 739-751, 2006.

HAMZA, A., JURZIK, L., UBERLA, K., WILHELM, M. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *Inter J Hyg Environ Health*, 214: 424–36, 2011.

HARDING, J.C.S., ELLIS, J.A., MCINTOSH, K.A., KRAKOWKA, S. Dual heterologous porcine circovirusgenogroup 2a/2b infection induces severe disease in germfree pigs. *Vet Microbiol*, 145: 209–19, 2010.

HÖLZEL, C., BAUER, J. *Salmonella* sp. in Bavarian liquid pig manure: occurrence and relevance for the distribution of antibiotic resistance. *Zoo Publ Health*, 55 (3): 133-8, 2008.

HUNDESA, A., MALUQUER DE MOTES, C., BOFILL-MAS, S., ALBINANA-GIMENEZ, N.C., GIRONES, R. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl Environ Microbiol*, 72: 7886–7893, 2006.

HUNDESA, A., MALUQUER DE MOTES, C., ALBINANA-GIMENEZ, N.C., RODRIGUEZ-MANZANO, J., BOFILL-MAS, S., SUÑEN, E., GIRONES, R. Development of a qPCR assay for the



quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J Vir Met*, 158:130–135, 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 2002.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO 10715-2:2000. Water Quality – Detection and enumeration of bacteriophages, 2000.

KIM, D., HA, Y., OH, Y., CHAE, C. Prevalence of porcine circovirus types 2a and b in pigs with and without post-weaning multi-systemic wasting syndrome. *The Veterinary Journal*, 188: 115–7, 2011.

KIM, J., HAN, D.U., CHOI, C., CHAE, C. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *J Vir Met*, 98: 25–31, 2011

KO, G., CROMEANS, T.L., SOBSEY, M.D. Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*, 69:7377–84, 2003.

KUNZ, A., MIELE, M., STEINMETZ, R.L.R. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. *Bioresour Technol*, 100: 5485–9, 2009.

LEWIS, G.D., METCALF, T.G. Polyethylene Glycol Precipitation for Recovery of Pathogenic Viruses, Including Hepatitis A Virus and Human Rotavirus, from Oyster, Water, and Sediment Samples. *Appl Environ Microbiol*, 54(08): 1983-8, 1988.

MALUQUER DE MOTES, C., CLEMENTE-CASARES, P., HUNDESA, A., MARTIN, M., GIRONES, R. Detection of bovine and porcine adenovirus for tracing the source of fecal contamination. *Appl Environ Microbiology*, 70: 1448-54, 2004.

MICHAEL, G., SIMONETI, R., COSTA, M., CARDOSO, M. Comparison of different selective enrichment steps to isolate *Salmonella* sp. from feces of finishing swine. *Braz. J. Microbiol*, 34:138-42, 2003.

OPRIESSNIG, T., YU, S., GALLUP, J.M., EVANS R.B., FENAUX, M., PALLARES, F., THACKER, E.L. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pat*, 40: 521-9, 2003.

OPRIESSNIG, T., RAMAMOORTHY, S., MADSON, D.M., PATTERSON, A.R., PAL, N., CARMAN, S., MENG, X.J., HALBUR, P.G. Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *J Gen Virol*, 89: 2482-91, 2008.

RAMAMOORTHY, S., HUANG, F.F., HUANG, Y.W., MENG, X.J. Interferon-mediated enhancement of in vitro replication of porcine

circovirus type 2 is influenced by an interferon-stimulated response element in the PCV2 genome. *Virus Res.*, 145(2):236-43, 2009.

RIGOTTO, C., SINCERO, T.C., SIMÕES, C.M., BARARDI, C.R. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). *Water Res* 39: 297–304, 2005..

SEGALÉS, J., OLVERA, A., GRAU-ROMA, L., CHARREYRE, C., NAUWYNCK, H., LARSEN-LET, A.L. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec* 162: 867-868, 2008.

SEGANFREDO, M.A. Environmental management in pig farming. Brasília, Brazil: *Embrapa Technological Information*, p.302, 2007.

SHANGJIN, C., CORTEY, M., SEGALÉS, J. Phylogeny and evolution of the NS1 and VP1/VP2 gene sequences from porcine parvovirus. *Vir Res*, 140(1-2): 209-15, 2009.

SOBSEY, M.D., KHATIB, L.A., HILL, V.R., ALOCILJA, E., PILLAI, S. Pathogens in animal wastes and the impacts of waste management practices on their survival, transport and fate. In: Rice JM, Caldwell DF, Humenik FJ. *Animal Agriculture and the Environment*. St. Joseph: ASABE, p 609-66, 2006.

STEWART, J.R., GAST, R.J., FUJIOKA, R.S., SOLO-GABRIELE, H.M., MESCHKE, J.S., AMARAL-ZETTLER, L.A., DEL-

CASTILLO, E., POLZ, M.F., COLLIER, T.K., STROM, M.S., SINIGALLIANO, C.D., MOELLER, P.D., HOLLAND, A.F. The coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. *Envir Health*, 7 (2), 2008.

TCHOBANOGLIOUS, G., BURTON, F.L., STENSEL, H.D. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, fourth ed. McGraw-Hill, New York, 2003.

TOPP, E., SCOTT, A., LAPEN, D.R., LYAUTEY, E., DURIEZ, P. Livestock waste treatment systems for reducing environmental exposure to hazardous enteric pathogens: Some considerations. *Bior Technol*, 100(22): 5395-5398, 2009.

TSENG, C.H., TSAI, H.J. Sequence analysis of a duck picornavirus isolate indicates that it together with porcine enterovirus type 8 and simian picornavirus type 2 should be assigned to a new picornavirus genus. *Virus Res*, 129:104–114, 2007

VIANCELLI, A., GARCIA, L.A.T., KUNZ, A., STEINMETZ, R., ESTEVES, P.A., BARARDI, C.R.M. Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples collected from swine manure treatment systems. *Res Vet Sci* 93: 538–543, 2011.

VIANCELLI, A., KUNZ, A., STEINMETZ, R.L.R., KICH, J.D, SOUZA, C.K., CANAL, C.W, COLDEBELLA, A., ESTEVES, P.A., BARARDI, C.R.M. Performance of two swine manure treatment

systems on chemical composition and on the reduction of pathogens. *Chemosphere* 90: 1539-1544, 2013.

WIESMANN, U., CHOI, I.S., DOMBROWSKI, E.M. Fundamentals of biological wastewater treatment. Weinheim: Willey-VCH Verlag GmbH & Co. p.355, 2007.

ZENG, S.Q., HALKOSALO, A., SALMINEN, M., SZAKAL, E.D., PUUSTINEN, L., VESIKARI, T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods*, 153: 238-40, 2008.



-CAPÍTULO III-

*Higienização de digestato suínico por estocagem em temperaturas  
de regiões tropicais*

## a) Objetivo

Higienizar efluentes e lodos suínícolas provenientes de biodigestores anaeróbios por estocagem em temperaturas de regiões tropicais.

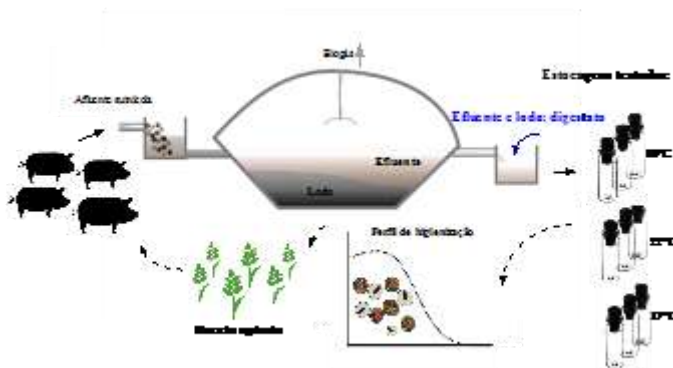
## b) Metodologia

### b.1 Amostras

Um total de 10 L de efluente e 10 L de lodo suínícola foram coletados diretamente de BAs semi-contínuos atuando em temperatura ambiente (16-23°C - Epagri Ciram, 2014), localizados na cidade de Itapiranga-SC, Brasil (Latitude: -27,171, Longitude: -53.7099 27 ° 10 '16 "Sul, 53 ° 42' 36" Oeste). As amostras foram inoculadas com PhiX-174 ( $6,0 \times 10^5$  UFP mL<sup>-1</sup>), HAdV-2 ( $8,0 \times 10^9$  GC mL<sup>-1</sup>) e *Salmonella enteric* – serovar Typhimurium ATCC (*S. Typhimurium*) ( $6,0 \times 10^5$  UFP mL<sup>-1</sup>), sendo estes microrganismos utilizados como modelos patogênicos. Posteriormente as amostras foram distribuídas em alíquotas de 500 mL e estocadas em condições anaeróbias, em temperaturas controladas de 16, 22 e 37±2°C (**Figura 14**). A faixa de temperatura 15-40°C foi utilizada representando temperaturas de inverno e verão de países de clima tropical (ZHONG et al., 2016), como o Brasil.



**Figura 14:** Representação esquemática do desenho experimental do presente Capítulo.



### b.2 Análises Físico-químicas dos lodos suinícolas coletados nos BAs

As amostras foram avaliadas quanto a temperatura, teor de sólidos totais (ST), teor de nitrogênio amoniacal total (NAT), demanda química de oxigênio (DQO) e pH ( APHA, 2012).

### b.3 Análises de patógenos entéricos dos lodos suinícolas coletados nos BAs

Nas temperaturas de 16°C e 22 °C *S. enterica* foi avaliada aos 0, 7, 20, 30 e 45 dias de estocagem; HAdV-2 e PhiX-174 aos 0, 7, 20, 30, 45, 60, 75, 90 e 120 dias; na temperatura de 37°C *S. enterica* foi avaliada aos 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 e HAdV e PhiX- 174 aos 0, 7, 20, 30, 45, 60, 75, 90 e 120 dias de estocagem. Para a enumeração de *S. enterica*, HAdV-2 e PhiX- 174 os métodos utilizados foram os mesmos descritos no Capítulo II desse estudo.

#### b.4 Análises estatísticas

O software utilizado para as análises estatísticas foi o *GraphPad Prism 5.0. Statistical*. Foram utilizados os testes *One-Way* de variância (ANOVA) para avaliar a diferença entre os grupos, com 95% de confiança, seguido do teste *Bonferroni's Multiple Comparison* para avaliar aprofundada mente as diferenças entre os grupos. Os testes de correlação foram realizados pelo usando *Pearson Correlation*, sempre que necessário. Os valores considerados significativos foram os que apresentaram  $p \leq 0.05$ .

O tempo para a redução decimal dos microrganismos por inativação ( $iT_{90}$ ) no efluente e lodo foram calculados considerando curvas em regressão linear, usando *Microsoft Excel*.

### c) **Resultados**

#### c.1 Parâmetros físico-químicos

As concentrações de ST, NAT e DQO foram significativamente maiores no lodo que no efluente ( $p \leq 0.05$ ). Nas diferentes temperaturas de estocagem não houve modificação significativa no seu perfil físico-químico do efluente e lodo estocado (**Tabela 5**).

**Tabela 4:** Médias e desvios padrões (DP) dos parâmetros físico-químicos avaliados (n=5) durante a estocagem do efluente e lodo suinícola nas diferentes temperaturas avaliadas.

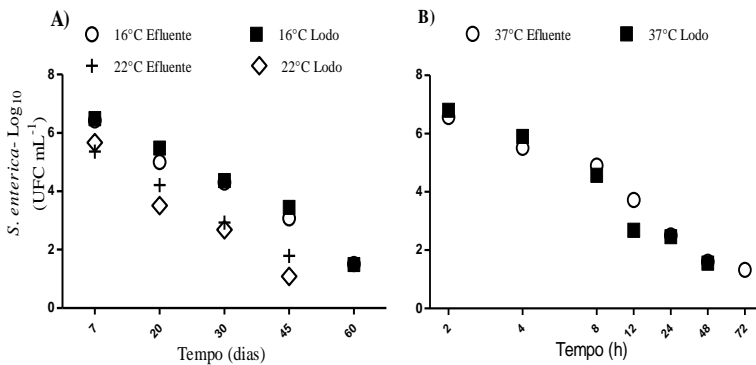
| Parâmetro                       | 16±2 °C (Média± DP) |          | 22±2 °C (Média± DP) |           | 37±2 °C (Média± DP) |            |
|---------------------------------|---------------------|----------|---------------------|-----------|---------------------|------------|
|                                 | Efluente            | Lodo     | Efluente            | Lodo      | Efluente            | Lodo       |
| <b>pH</b>                       | 7.3 ±0.3            | 7.1±0.2  | 7.3±0.3             | 7.1±0.2   | 7.3±0.9             | 7.2±0.7    |
| <b>ST (mg L<sup>-1</sup>)*</b>  | 5419±520            | 32210±17 | 5221±534            | 31600±197 | 5760±457            | 30190±1736 |
|                                 |                     | 76       |                     | 6         |                     |            |
| <b>DQO (mg L<sup>-1</sup>)*</b> | 3870±180            | 61950±12 | 3292±126            | 65450±104 | 3148±86             | 67230±153  |
|                                 |                     | 55       |                     | 0         |                     | 0          |
| <b>NAT (mg L<sup>-1</sup>)*</b> | 1973±244            | 3104±305 | 1732±284            | 3221±325  | 1480±221            | 3630±271   |

DP: Desvio Padrão; (\*): Diferença significativa estatisticamente (p≥0,05)

## c.2 Higieneização do digestato suinícola

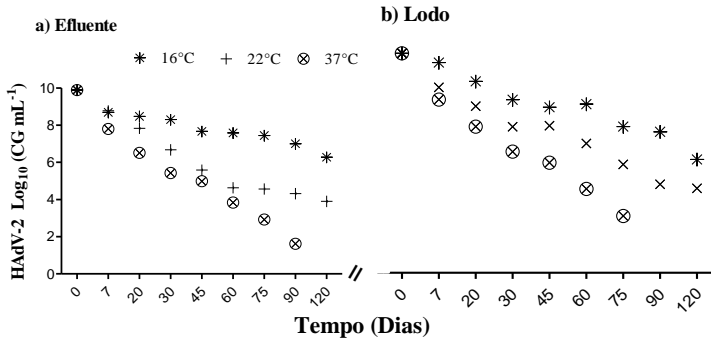
O processo de higienização foi considerado eficiente quando houve inativação  $\geq 3\log_{10}$  ( $>99.9\%$ ). *S. enterica* foi eficientemente inativada no efluente e lodo estocado a 16 e 22°C aos 45 e 30 dias de estocagem, respectivamente e quando estocados a 37°C o tempo mínimo necessário foi de 12 h para ambas as matrizes. (**Figure 15 a - b**)

**Figura 15:** Avaliação da inativação de *S. enterica* (UFC mL<sup>-1</sup>) em efluente e lodo suinícola estocado em temperatura tropicais. a) 16 e 22°C e b) 37 °C



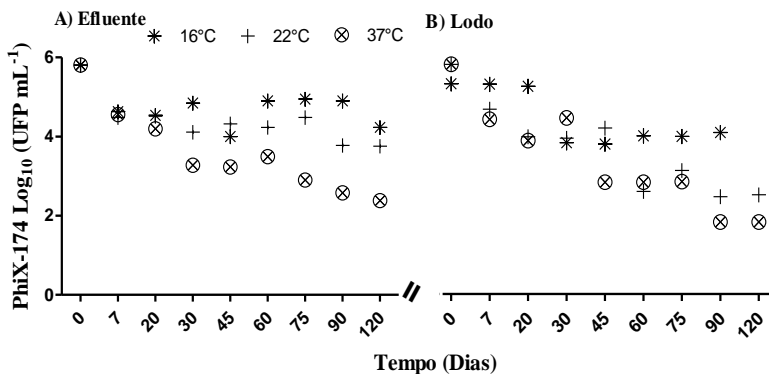
HAdV-2 no efluente foi eficientemente inativado ( $p=0,02$ ) após estocagem por 120 dias a 16°C , 30 dias à 22°C e 20 dias à 37°C. No lodo estocado a 16°C a inativação ocorreu após 75 dias, 45 dias a 22°C e 20 dias a 37°C (**Figure 16 a-b**).

**Figura 16:** Avaliação da inativação de HAdV-2 ( $\text{GC mL}^{-1}$ ) em (a) efluente e (b) lodo suinícola estocado em temperatura tropicais.



Quanto à inativação de PhiX-174 no efluente e lodo estocados a 16°C não houve tendência de decaimento até 120 dias de avaliação, mas a 22°C foi eficientemente reduzido aos 120 e 90 dias de estocagem do efluente e lodo ( $p < 0,05$ ), respectivamente. Quando efluente e lodos foram estocados a 37°C necessitou-se de 75 e 60 dias para significativa inativação ( $p < 0,05$ ), respectivamente (**Figure 17 a-b**).

**Figura 17:** Avaliação da inativação de PhiX-174 (UFP mL<sup>-1</sup>) em (a) efluente e (b) lodo suinícola estocado em temperatura s tropicais.



### c.3 Higienização do digestato por estocagem: modelo preditivo

Utilizando os resultados obtidos de perfil de inativação de efluente e lodo nas temperaturas de estocagem, foi possível desenvolver o modelo preditivo para estimar o tempo necessário para 90% de inativação ( $T_{90}$ ) de bactérias e vírus entéricos em digestato suinícola estocado em temperaturas tropicais. Os resultados foram ajustados por regressão linear e utilizando como *cutoff*  $r^2 \geq 0.80$ . O  $T_{90}$ , bem como o coeficiente de inativação ( $k$ ) estão apresentados na **Tabela 6**.

**Tabela 5:** Média T90 do HAdV-2, PhiX-174 e *S. enterica* em efluente e lodo estocado a 16, 22 e 37°C.

|                 | <b>Temp</b>  | <b><i>S. enterica</i></b> |                 | <b>HAdV-2</b>           |                 | <b>PhiX-174</b>         |                 |
|-----------------|--------------|---------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
|                 | C            | <i>k</i>                  | T <sub>90</sub> | <i>k</i>                | T <sub>90</sub> | <i>k</i>                | T <sub>90</sub> |
| <b>Efluente</b> | 16           | 0,090 dia <sup>-1</sup>   | 11,06           | 0,025 dia <sup>-1</sup> | 40,0            | 0,004 dia <sup>-1</sup> | 204,08          |
|                 | 22           | 0,112 dia <sup>-1</sup>   | 8,87            | 0,050 dia <sup>-1</sup> | 20,0            | 0,010 dia <sup>-1</sup> | 91,74           |
|                 | 37           | 0,058 h <sup>-1</sup>     | 17,24           | 0,075 dia <sup>-1</sup> | 13,32           | 0,023 dia <sup>-1</sup> | 42,011          |
|                 | <b>Temp.</b> | <b><i>S. enterica</i></b> |                 | <b>HAdV-2</b>           |                 | <b>PhiX-174</b>         |                 |
|                 | C            | <i>k</i>                  | T <sub>90</sub> | <i>k</i>                | T <sub>90</sub> | <i>k</i>                | T <sub>90</sub> |
| <b>Lodo</b>     | 16           | 0,091 dia <sup>-1</sup>   | 10,98           | 0,037 dia <sup>-1</sup> | 26,95           | 0,006 dia <sup>-1</sup> | 161,29          |
|                 | 22           | 0,131 dia <sup>-1</sup>   | 7,63            | 0,048 dia <sup>-1</sup> | 20,83           | 0,020 dia <sup>-1</sup> | 49,50           |
|                 | 37           | 0,098 h <sup>-1</sup>     | 10,20           | 0,081 dia <sup>-1</sup> | 12,34           | 0,024 dia <sup>-1</sup> | 40,65           |

Coefficiente de inativação (*k*); Tempo requerido para 90% de inativação (T<sub>90</sub>) -  $r^2 > 0,8$ .

#### **d) Discussão**

Em países de regiões tropicais, como o Brasil, há disseminação de BA atuando de acordo com a temperatura ambiente, uma vez que há uma variação média temperatura de 15-40°C, durante inverno e verão, respectivamente, sendo estas temperaturas favoráveis para que o processo de biodigestão anaeróbia ocorra sem gasto energético para aquecimento da matéria orgânica. No Brasil o digestato suinícola é comumente estocado por cerca de 40 dias em lagoas de estabilização, sendo monitorados padrões nutricionais, para posterior reciclo agrícola (FONGARO et al., 2014). A estocagem auxilia na prevenção de perdas de amônia e metano para a atmosfera, perda de nutrientes e pode reduzir odores desagradáveis causados pelos aerossóis. Além disso, o tempo de retenção hidráulica (TRH) é determinante na higienização do lodo e efluente digerido nessas lagoas de estabilização (BOSSHARD et al., 2009; FONGARO et al., 2014).

Os resultados apontaram o tempo de estocagem necessário para uma redução mínima de 3 log<sub>10</sub> de patógenos entéricos, aqui representados pelas *S. enterica*, HAdV e PhiX-174, em efluente e lodo oriundos de BA e estocados a 16±2°C, 22±2°C e 37±2°C, sendo possível apresentar um modelo preditivo de inativação T<sub>90</sub><sup>-1</sup> dia ou h<sup>-1</sup> nessas condições. Esse estudo foi realizado levando-se em consideração a legislação vigente na UE (EC) N° 1069/2009 (EC, 2009) para reciclo agrícola de digestato animal. Tal regulamentação recomenda o uso de subprodutos animais, como efluente e lodo, apenas após tratamentos que



sejam capazes de reduzir mais que  $3 \log_{10}$  de patógenos entéricos, como *E. coli*.

Na estocagem a  $16^{\circ}\text{C}$  PhiX-174 não demonstrou significativa inativação até 120 dias de avaliação do efluente e lodo digerido, no entanto HAdV-2 e *S. enterica* foram significativamente inativados ( $>3\log_{10}$ ) durante os 120 dias de estocagem. Nas temperaturas de  $22$  e  $37^{\circ}\text{C}$ , que melhor representam as características de países de clima quente durante a primavera e verão, todos os patógenos estudados foram eficientemente reduzidos durante os 120 dias de estocagem.

Nos processos de higienização de efluentes, lodos e fezes frescas, a escolha de modelos patogênicos é muito importante para determinação da eficiência do processo avaliado. PhiX-174 é considerado um modelo de vírus entéricos altamente resistente (LOVE & SOBSEY, 2007), sendo sua inativação a indicação de sucesso no processo utilizado para higienização de lodos, por exemplo. No entanto por ser um modelo altamente resistente, se comparado com vírus entéricos humanos e animais, bem como com enterobactérias, os bacteriófagos podem subestimar a eficiência dos sistemas de tratamento (HERNROTH et al., 2002; BERTRAND et al., 2012). No presente estudo o perfil de inativação de PhiX-174 foi 4x menor que o perfil determinado para HAdV-2. Outros estudos demonstraram igualmente esta resistência durante o processo de inativação de patógenos entéricos, como os estudos descritos por Emmoth et al.(2011) em

resíduos industriais, Kim et al. (2012) em lodo humano e Magri et al. (2015) em fezes humanas frescas.

Outra abordagem é quanto à atuação das matrizes avaliadas na estabilidade dos patógenos entéricos. Neste trabalho, os vírus entéricos permaneceram por mais tempo estáveis em efluentes do que em lodo suinícola proveniente de BA. Os lodos são caracterizados principalmente pelos altos teores de matéria orgânica e presença de ácidos, como málico, butírico e láctico, podendo atuar na estabilidade das partículas de vírus entéricos e de bactérias. Há relatos na literatura sobre uma maior concentração de microrganismos endógenos nos lodos do que nos efluentes, sendo que estes microrganismos podem contribuir na predação natural de vírus, por exemplo, bem como seus metabólitos podem atuar com potencial virucida e biocida, explicando também a maior estabilidade dos patógenos avaliados em temperaturas mais baixas, já que naturalmente as comunidades bacterianas aumentam em temperaturas entre 26 - 37°C, gerando competição (FONG; LIPP, 2005; WARD; KNOWLTON; WINSTON, 1986).

#### e) Considerações finais do *Capítulo III*

Em países de clima tropical a estocagem natural pode ser utilizada para inativação de patógenos entéricos em digestato suinícola, sendo necessário considerar o TRH e a condição sanitária do digestato a ser estocado, bem como a estação do ano

e sua temperatura média, já que a higienização ocorrerá em função da mesma.

Salienta-se que condições naturais de estocagem figuram como uma alternativa economicamente viável para pós-tratamento de digestatos dirigidos ao reciclo agrícola, visando proteção da saúde humana, animal e ambiental dentro do conceito “*Saúde Única*”.



**f) Referências utilizadas no Capítulo III**

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22<sup>st</sup> ed. American Public Health Association 2012, Washington, DC.

ASTALS, S., VENEGAS, C., PECES, M., JOFRE, J., LUCENA, F., MATA-ALVAREZ, J. Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Res* 46(19):6218–27, 2012.

BAE, J.; SCHWAB, K.J. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.477-484, 2008.

BERTRAND, I.; SCHIJVEN, J.F.; SÁNCHEZ, G.; WYN-JONES, P.; OTTOSON, J.; MORIN, T.; MUSCILLO, M.; VERANI, M.; NASSER, A.; DE ROSA HUSMAN, A.M.; MYRMEL, M.; SELLWOOD, J.; COOK, N.; GANTZER, C. The impact of the temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. **J. Appl. Microbiol.**, p.1-16, 2012.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 375 de 29 de agosto de 2006.** Define critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos

derivados, e dá outras providências. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 30 de ago. 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 25/2009 de 23 de julho de 2009**. Define as normas sobre as especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro a embalagem e a rotulagem dos fertilizantes orgânicos simples, mistos, compostos, organominerais e biofertilizantes destinados à agricultura. DF: Diário Oficial na União, 24 de jul. 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 28/2007 de 27 de julho de 2007**. Aprova os Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizantes Minerais, Orgânicos, Organo-Minerais e Corretivos, disponíveis na Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial - CGAL/DPA/MAPA, na Biblioteca Nacional de Agricultura – BINAGRI e no sítio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. DF: Diário Oficial na União, 31 de jul. 2007.

CARRINGTON, E.G., PIKE, E.B., AUTY, D., MORRIS, R. Destruction of faecal bacteria, enteroviruses and ova of parasites in wastewater sludge by aerobic thermoPhilic and anaerobic mesoPhilic digestion. *Water Sci Technol* ,24:377–380, 1991.

ESPINOSA, A.C.; MAZARI-HIRIART, M.; ESPINOSA, R.; MARURI-AVIDAL, L.; MÉNDEZ, E.; ARIAS, C.F. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. **Water Res**, v.42, p.2618-2828, 2008.

FONG, T.T., LIPP, E.K. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Ver*, 69:357–371, 2005.

FONGARO, G., NASCIMENTO, M. A., RIGOTTO, C., RITTERBUSCH, G., DA SILVA, A.D., ESTEVES, P.A., BARARDI, C.R.M. Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. *Vir J* 10:166, 2013.

FONGARO G, VIANCELLI A, MAGRI ME, ELMAHDY EM, BIESUS LL, KICH JD, KUNZ A, BARARDI CR. Utility of specific biomarkers to assess safety of swine manure for biofertilizing purposes. *Sci Total Environ*. (479-480):227-283, 2014.

GANTZER, C., GASPARD, P., GALVEZ, L., HUYARD, A., DOMOUTHIER, N., SCHWARTZBROD, J. Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge. *Water Res*, 35(16):3763–3770, 2001.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO 10715-2:2000. Water Quality – Detection and enumeration of bacteriophages., 2000.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO 6579:2002. Microbiology of food

and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 2002.

KO, G., CROMEANS, T.L., SOBSEY, M.D. Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69:7377–84, 2002.

LEAL, D.A.G., RAMOS, A.P.D., SOUZA, D.S.M., DURIGAN, M., GREINERT-GOULART, J.A., MORESCO, V., AMSTUTZ, R.C., MICOLI, A.H., CANTUSIO NETO, R., BARARDI, C.R.M., FRANCO, R.M.B. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in southeastern Brazil using an U.V. based depuration system. *Ocean Coast. Manag.*, 72: 93–100, 2013.

MANDILARA, G., MAVRIDOU, A., LAMBIRI, M., VATOPOULOS, A., RIGAS, F. The use of bacteriophages for monitoring the microbiological quality of sewage sludge. *Environ Technol*, 27:367–370, 2006.

MOCE' - LLIVINA, L., MUNIESA, M., PIMENTA-VALE, H., LUCENA, F., JOFRE, J. Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Appl Environ Microbiol*, 69(3):1452–1456, 2003.

SAHLSTRÖM, L., ASPAN, A., BAGGE, E., DANIELSSON-THAM, M.L. & ALBIHN, A. Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Res*, 38(8), 1989-94, 2004.



SIDHU, J.P.S., TOZE, S.G. Human pathogens and their indicators in sludge: a literature review. *Environ Int* 35:187–201, 2009.

VIAU, E., PECCIA, J. Survey of wastewater indicators and human pathogen genomes in biosolids produced by Class A and Class B stabilization treatments. *Appl Environ Microbiol*, 75(1):164–74, 2009.

WARD, R.L.; KNOWLTON, D.R.; WINSTON, P.E. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. *App. Environ. Microbiol.*, v.52, p.450-459, 1986.

WONG, K, ONAN, B.M., XAGORARAKI, I. Quantification of enteric viruses, pathogen indicators, and salmonella bacteria in Class B anaerobically digested biosolids by culture and molecular methods. *Appl Environ Microbiol*, 76(19):6441–6448, 2010.



-CAPÍTULO IV-

*Prospecção de sanitizantes para desinfecção de efluentes e  
lodos suínícolas*



## a) **Objetivo**

Prospectar sanitizantes aplicados na desinfecção de efluentes e lodos suinícolas para fins de reciclo agrícola como fertilizante.

## b) **Metodologia**

### b.1 Microrganismos indicadores e amostras avaliadas

Um total de 20 L de efluente e lodo suinícolas provenientes de BA do Tipo Lagoa Coberta, foram coletados por meio de bomba de sucção em uma propriedade suinícola localizada em Itapiranga, extremo Oeste de Santa Catarina – Brasil. Esse material era proveniente de suínos em fase de engorda, oriunda de Itapiranga, extremo Oeste de Santa Catarina – Brasil. Efluente e lodo foram artificialmente contaminados com quantidades conhecidas de bacteriófago PhiX 174 ( $3,8 \times 10^6$  UFP mL<sup>-1</sup>), bacteriófago MS2 (F-específico  $1,2 \times 10^5$  UFP mL<sup>-1</sup>), HA $\nu$ -2 ( $5,0 \times 10^8$  GC mL<sup>-1</sup>), *Salmonella entérica* - Typhimurium ( $9,0 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) e *Escherichia coli* ( $1,2 \times 10^8$ ), como modelos de patógenos entéricos, todos propagados de acordo com o descrito no *Capítulo III*.

Os ovos de *Áscaris lumbricoides* já disponíveis no laboratório foram avaliados por microscopia óptica, possuindo 95% de viabilidade no início do experimento. Desses ovos, 10.000 foram alocados em sacos de nylon fechados, de acordo com o descrito por Magri et al. (2013). Essa condição permite o contato com a matriz teste, porém sem ocorrer o espalhamento

dos ovos nos experimentos, facilitando sua recuperação para posterior avaliação. da infecciosidade frente a sua morfologia de desenvolvimento larval após 28 dias de incubação em temperatura 28°C em ambiente úmido (descrito no item “b.4” deste Capítulo).

## **b.2 Sanitizantes testados**

Para a prospecção de potenciais sanitizantes, cinza (CZ), ureia (U), calcário ( $\text{CaCO}_3$ ), cal virgem (CaO) e cascas de ovos de galinha (*Gallus gallus*) (COM) foram utilizados (**Quadro 1**). As cinzas utilizadas foram provenientes da queima de eucaliptos em caldeira. Essas foram recolhidas, secas a 50°C por 48h em estufa e peneiradas em malhas de 1mm. As cascas de ovos foram obtidas de unidades da área alimentícia, lavadas em água corrente, secas a 50°C por 48h em estufa, moídas e peneiradas em malhas de 2mm. Os demais aditivos utilizados (CaO,  $\text{CaCO}_3$  e U) foram obtidos comercialmente.

**Quadro 1:** Composição geral e as principais justificativas de escolha dos potenciais sanitizantes estudados para desinfecção de efluente e lodo suinícola.

| Potencial sanitizante            | Composição Principal   | Justificativa da escolha   |
|----------------------------------|--|--|
| <b>Ureia</b>                     | (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO   | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Utilizada mundialmente como fertilizante.</li> <li>✓ Altamente solúvel.</li> <li>✓ Proporciona melhoria na condição nutricional do e plantas.</li> <li>✓ Sua degradação por ureases propicia alcalinização.</li> </ul>  |
| <b>Calcário</b>                  | CaCO <sub>3</sub>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Amplamente utilizado na agricultura para correção de acidez de solos.</li> <li>✓ - Fonte de Ca para solos.</li> <li>✓ - Pode ser obtido em processo de reciclo de carapaças de animais (como conchas de ostras) e cascas de ovos.</li> <li>✓ - Alcalinizante</li> </ul> |
| <b>Cal Virgem</b>                | CaO  | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Amplamente utilizado em tratamento de lodo humano para fins agrícolas.</li> <li>✓ Utilizado para correção de pH em sistemas de tratamentos.</li> <li>✓ -Aplicado em solos ácidos para correção do pH.</li> <li>✓ - Alcalinizante</li> </ul>                             |
| <b>Cinzas<sup>a</sup></b>        | 70% CaCO <sub>3</sub><br>15% CaO<br>10% Ca<br>5% Mg, MgO,<br>K <sub>2</sub> O, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Economicamente viável.</li> <li>✓ -Recomendada pela WHO (2013) para sanitizar fezes humanas.</li> <li>✓ - Possui capacidade de correção de acidez de solos.</li> <li>✓ - Sustentabilidade.</li> <li>✓ - Alcalinizante</li> </ul>  |
| <b>Casca de Ovos<sup>b</sup></b> | 60-80% CaCO <sub>3</sub><br>20-40% Ca  | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Composição química de interesse para a agricultura.</li> <li>✓ Sustentabilidade</li> <li>✓ Alcalinizante</li> </ul>   |

<sup>a</sup> OSAKI & DAROL. ESTUDO DA QUALIDADE DE CINZAS VEGETAIS PARA USO COMO ADUBOS NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA. Rev- Setor Ciências Agrárias 11 (1-2). 1989/1991. <sup>b</sup> FISHBEIN, L. Multiple sources of dietary calcium - some aspects of its essentiality. Regulatory Toxicology and Pharmacology, New York, v. 39, p. 67-80, 2004

Os aditivos foram preparados e adicionados aos efluentes e lodos suinícolas em mini-reactores de vidro, com capacidade útil de 500mL, sob condição anaeróbia, em repouso, sendo o experimento conduzido em triplicata e em temperatura controlada ( $23\pm 2^\circ\text{C}$ ). Um total de 11 tratamentos e quatro controles foram testados em efluente e lodo suinícola, de acordo com o apresentado na **Tabela 7**.

**Tabela 6:** Descrição dos 11 tratamentos e 4 controles testados em efluente e lodo suinícola, onde “X” representa se efluente e lodo foram estudados.

| <b>Tratamento (aditivos)</b>                         | <b>Percentual Adicionado</b> | <b>Lodo (L)</b> | <b>Efluente (E)</b> |
|--|------------------------------|-----------------|---------------------|
| <b>Ureia (U0,5%)</b>                                 | 0,5%                         |                 | X                   |
| <b>Ureia (U1,0%)</b>                                 | 1%                           | X               | X                   |
| <b>Casca de ovo + Ureia (COM2%+U0,5%)</b>            | 2%:0,5%                      |                 | X                   |
| <b>Calcário + Ureia ([CaCO<sub>3</sub>]2%:U0,5%)</b> | 2%:0,5%                      |                 | X                   |
| <b>Cinzas (CZ2%)</b>                                 | 2%                           |                 | X                   |
| <b>Cal virgem (CaO0,5%)</b>                          | 0,5%                         |                 | X                   |

---

|  |         |   |
|--|---------|---|
| <b>Calcário + Ureia ([CaCO<sub>3</sub>]4%:U1,0%)</b> | 4%:1,0% | X |
| <b>Casca de ovo + Ureia (COM4%+U1,0%)</b>            | 4%:1,0% | X |
| <b>Cinzas (CZ4%)</b>                                 | 2%      | X |
| <b>Cal virgem (CaO1,0%)</b>                          | 1,0%    | X |
| <b>Controles dos processos</b>                       |         |   |
| <b>Controle Efluente (CE)</b>                        |         |   |
| <b>Controle Lodo (CL)</b>                            |         |   |
| <b>Controle em tampão pH 7,0</b>                     |         |   |
| <b>Controle em tampão pH 9,0</b>                     |         |   |

---



### b.3 Análises físico-químicas

Os tratamentos e controles foram monitorados quanto ao pH, concentração de amônia total (NAT), temperatura amostral, série de sólidos totais (fixos (SF), voláteis (SV) e totais (ST)). A concentração de amônia não-ionizada (N-NH<sub>3</sub>) foi calculada em função do pH, temperatura e concentração de NAT. Todas as análises foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

### b.4 Inativação dos patógenos

Para avaliação da inativação dos patógenos, *S. enterica*, PhiX-174 e HAAdV-2 foram quantificados de acordo com o descrito no *Capítulo III*. *E. coli* foi quantificada em ágar MacConkey por contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC) após 18±2h de incubação a 37°C das placas contendo as amostras avaliadas. Já MS2 foi enumerado segundo a ISO 10705:1-1995, em Unidade Formadora de Placa (UFP) após 16±2h de incubação a 37°C das placas contendo as amostras avaliadas. Todos os patógenos foram avaliados por até 90 dias, tendo a frequência amostral variado em função da inativação dos mesmos.

Para avaliação da viabilidade e desenvolvimento dos ovos de *A. lumbricoides*, os sacos foram removidos nos tempos 20, 60 e 90 dias após os respectivos tratamentos, bem como dos controles amostrais não tratados e em pH neutro e alcalino. Após esse processo os sacos contendo os ovos foram incubados por 28

dias a 28°C completamente imersos em Ácido Sulfúrico 0,1N (como o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> evapora durante a incubação é necessário sempre completar o volume para garantir a completa imersão dos ovos). Como critério de contagem, considerou-se ovo viável aquele que após o período de 28 dias de incubação apresentou em seu interior características de formação larval (aumento do ovo, desenvolvimento da larva).

#### b.5 Avaliação de potencial agrônômico do efluente e lodo suinícola sanitizados

A fim de avaliar o potencial agrônômico dos tratamentos prospectados as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Solos, Corretivos, Fertilizantes e Resíduos Sólidos Industriais do Instituto de Pesquisas Ambientais Tecnológicas (IPAT) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os tratamentos mais promissores e seus respectivos controles foram avaliados de acordo com a Instrução Normativa (IN) 25/2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que estabelece os requisitos mínimos para fertilizantes orgânicos.

#### b.6 Análises dos resultados

One-way (ANOVA) foi aplicado para avaliar diferenças físico-químicas e de inativação de patógenos entre os tratamentos, bem como entre tratamentos e controles não tratados. Posteriormente o teste de *Bonferroni's (Multiple*

*Comparison Test*) foi aplicado para ordenar e agrupar os tratamentos de acordo com suas diferenças específicas e semelhanças, respectivamente, utilizando o *software* GraphPad EUA (2005). Essas análises foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0,05$ .

Os tempos para a redução de  $1\text{Log}_{10}$  dos patógenos entéricos ( $iT_{90}$ ) no efluente e lodo tratados foram calculados considerando curvas em regressão linear (sempre que houve ajuste com  $r^2 \geq 7,5$ ), usando *Microsoft Excel*.

### **c) Resultados**

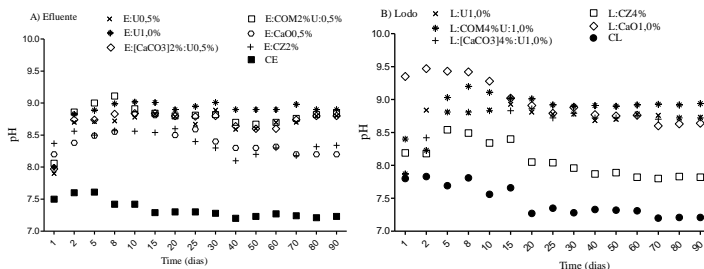
#### **c.1 Características físico-químicas do efluente e lodo suinícola tratados**

O perfil de pH, NAT e amônia não-ionizada ( $\text{N-NH}_3$ ) produzida nos diferentes tratamentos foram medidos e avaliados em função do tempo. O efluente utilizado no início do experimento apresentou um pH inicial de 7,2 e o lodo um pH de 7,4. Sobre a concentração de sólidos iniciais, o efluente continha  $1.370,7 \text{ mgL}^{-1}$  de sólidos totais, sendo desses 18% sólidos voláteis e o lodo continha  $23.630 \text{ mgL}^{-1}$  de sólidos totais, sendo desses 32% sólidos voláteis.

Após os tratamentos serem aplicados, todos os aditivos testados foram capazes aumentar significativamente o pH no efluente e no lodo, se comparados com seus respectivos controles. Houve estabilização do pH em todos os tratamentos

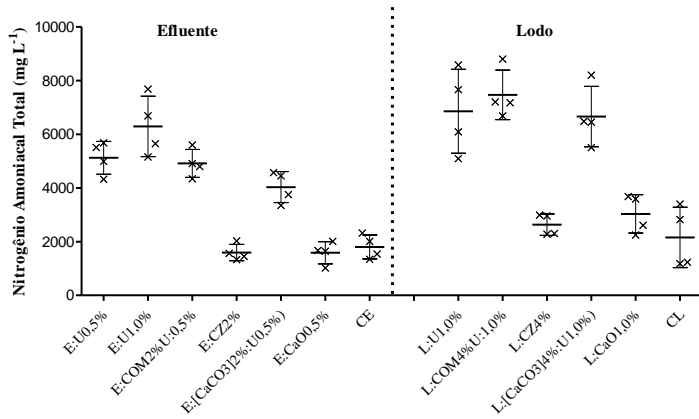
entre os primeiros 10 e 20 dias do início do tratamento no efluente e lodo, respectivamente (**Figura 18**).

**Figura 18:** Perfil de pH nos diferentes tratamentos no efluente (A) e lodo (B), em função do tempo



Todos os aditivos testados implicaram num aumento significativo da concentração de NAT no efluente e lodo quando comparado ao teor de NAT em seus respectivos controles (CE e CL) ( $p=0,01$ ), exceto os aditivos CZ e CaO (já que não continham fontes de Nitrogênio) ( $p=0,08$ ). Quanto às equivalências dos aditivos no que se refere a capacidade de incrementar o valor nutricional do efluente e lodo, baseado em NAT, E:U0,5%, E:U1,0% e E:COM2%U:0,5% foram equivalentes ( $P=1,26$ ), bem como L:U1,0%, L:COM4%U:1,0% e L:[CaCO<sub>3</sub>]4%:U1,0%) foram equivalentes ( $P=1,35$ ). A **Figura 19** apresenta a variação e a média de NAT em cada um dos tratamentos e seus controles.

**Figura 19:** Variação e média de NAT em cada um dos tratamentos e seus respectivos controles.



A **Tabela 08** apresenta resumidamente a média de pH, concentração de NAT e N-NH<sub>3</sub>, bem como o teor de sólidos totais e voláteis ao longo dos 90 dias de tratamentos com os aditivos testados. De acordo com a análise dos desvios padrões de pH, no lodo L:COM4%U:1,0% e [CaCO<sub>3</sub>]4%:U1,0%) propiciaram menor variação do pH ao longo de todo o experimento, sugerindo maior estabilidade do lodo nessas condições.

**Tabela 7:** Média de NAT, pH e amônia não-ionizada durante os 90 dias de tratamento.

| Aditivo                   | NAT mg L <sup>-1</sup> | pH         | N-NH <sub>3</sub> mM | Sólidos Totais mg | ólidos Voláteis mg |
|---------------------------|------------------------|------------|----------------------|-------------------|--------------------|
|                           | (n=6)                  | (n=12)     | (n=5)                | L <sup>-1</sup>   | L <sup>-1</sup>    |
|                           | (média±DP)             | (média±DP) | (média±DP)           | (n=3)             | (n=3)              |
|                           |                        |            |                      | (média±DP)        | (média±DP)         |
| <b>E:U0,5%</b>            | 5125,0 ± 470,0         | 8,7 ± 0,13 | 73,0 ± 9,6           | 1280,7 ± 23,1     | 376,2 ± 43,1       |
| <b>E:U1,0%</b>            | 6290,0 ± 890,0         | 8,9 ± 0,12 | 122,5 ± 14,6         | 1312,3 ± 87,3     | 375,4 ± 65,4       |
| <b>E:COM2%U:0,5%</b>      | 4912,5 ± 343,7         | 8,8 ± 0,15 | 72,3 ± 4,4           | 1325,2 ± 54,9     | 361,1 ± 28,4       |
| <b>E:[CaCO3]2%:U0,5%)</b> | 4030,0 ± 480,0         | 8,7 ± 0,11 | 62,2 ± 7,7           | 1316,1 ± 1,4      | 239,3 ± 32,9       |
| <b>E:CZ2%</b>             | 1592,5 ± 218,7         | 8,4 ± 0,82 | 12,8 ± 4,6           | 1365,2 ± 23,4     | 342,2 ± 68,3       |
| <b>E:CaO0,5%</b>          | 1585,0 ± 282,5         | 8,4 ± 0,77 | 13,4 ± 2,5           | 1346,2 ± 0,2      | 353,7 ± 34,2       |
| <b>L:U1,0%</b>            | 6605,0 ± 383,7         | 8,8 ± 0,17 | 101,3 ± 23,7         | 23456 ± 0,7       | 12030,1 ± 182,7    |
| <b>L:COM4%U:1,0%</b>      | 6712,5 ± 1515,0        | 8,9 ± 0,01 | 122,7 ± 61,4         | 22976,3 ± 0,4     | 11740,2 ± 132,7    |
| <b>L:[CaCO3]4%:U1,0%)</b> | 6657,5 ± 771,25        | 9,0 ± 0,02 | 111,4 ± 22,1         | 23148,3 ± 4,1     | 5690,2 ± 145,      |

|                  |        |          |     |        |      |       |         |       |        |        |
|------------------|--------|----------|-----|--------|------|-------|---------|-------|--------|--------|
| <b>L:CZ4%</b>    | 2632,5 | ± 1516,2 | 8,1 | ± 0,92 | 18,6 | ± 7,8 | 22987,2 | ± 7,0 | 8090,3 | ± 91,4 |
| <b>L:CaO1,0%</b> | 2782,5 | ± 342,5  | 8,7 | ± 0,38 | 37,3 | ± 2,8 | 23453,1 | ± 4,2 | 9310,4 | ± 38,5 |
| <b>CE</b>        | 1552,5 | ± 852,5  | 7,3 | ± 0,11 | 1,0  | ± 0,3 | 1367,2  | ± 7,2 | 162,1  | ± 27,4 |
| <b>CL</b>        | 2157,5 | ± 952,5  | 7,5 | ± 0,22 | 1,3  | ± 0,5 | 23660,2 | ± 5,4 | 2810,3 | ± 29,3 |

De acordo com os resultados a concentração de N-NH<sub>3</sub> foi significativamente maior em todos os tratamentos quando comparados com os seus respectivos controles, sendo esse aumento relacionado positivamente com o pH ( $r^2=0,86$ ). Os aditivos que continham ureia em sua formulação elevaram significativamente a concentração de N-NH<sub>3</sub> ( $p=0,002$ ) quando comparados com os que não continham ureia (CZ e CaO).

### **c.1 Inativação de patógenos entéricos**

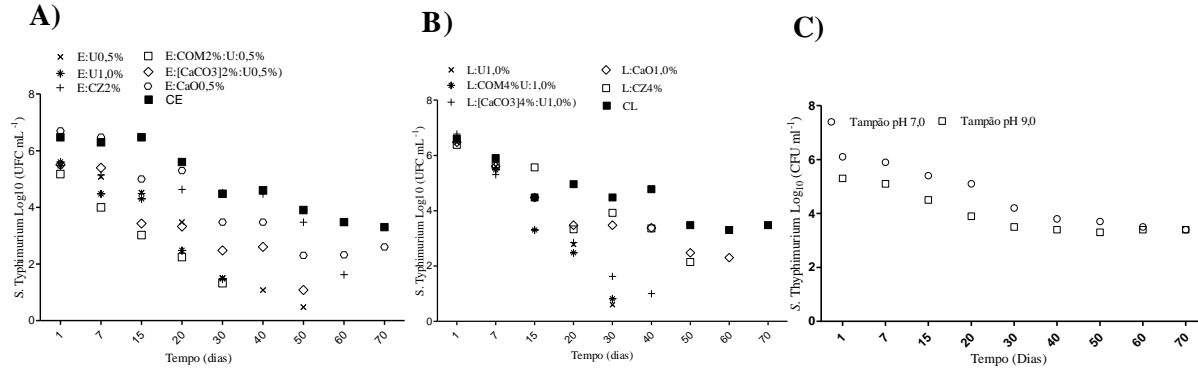
#### *c1.1 S. enterica e E. coli*

A concentração de *S. enterica* foi significativamente reduzida ( $\geq 2 \text{ Log}_{10}$ ) em todos os tratamentos propostos, sendo que ANOVA comprovou que os tratamentos passaram a apresentar-se eficientes no que se referiu à inativação de *S. enterica*, entre os dias 7 e 15 ( $p=0,03$ ) no efluente e entre os dias 15 e 20 no lodo ( $p=0,02$ ), ressaltando que o aditivo CZ e CaO no lodo apenas apresentaram resultado significativamente diferente do respectivo controle após 40 e 50 dias de tratamento, respectivamente. Já no efluente CZ e CaO apresentaram eficiência na inativação *S. enterica* ( $\geq 2 \text{ Log}_{10}$ ) após 50 e 30 dias de tratamento, respectivamente. Quanto à estabilidade de *S. enterica* nos tampões 7,0 e 9,0 houve inativação significativa ( $2,4 \text{ Log}_{10}$  e  $2,6 \text{ Log}_{10}$ , respectivamente) ao final dos 90 dias, porém significativamente inferior aos tratamentos propostos que ao final



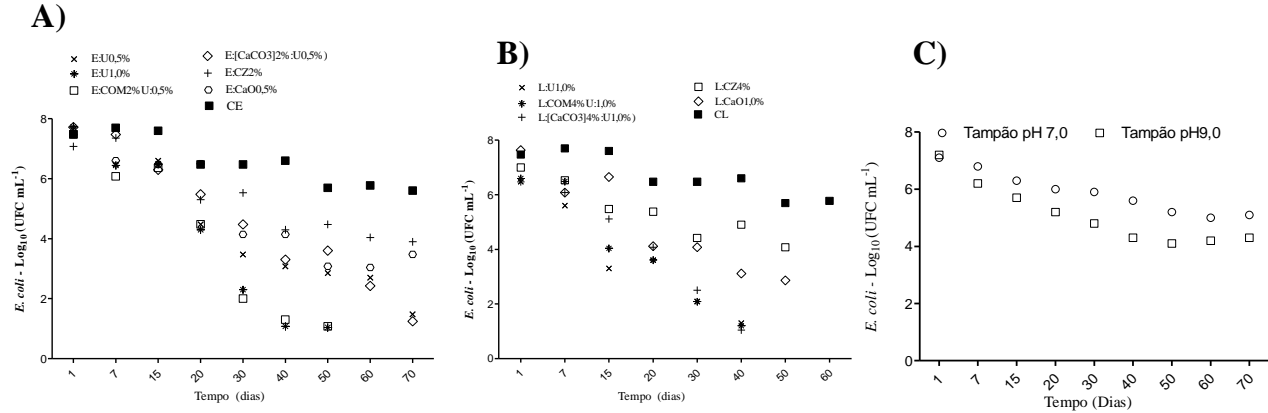
de 90 dias inativaram quantidades superiores à 3 Log<sub>10</sub> (**Figura 20**).

**Figura 20:** Concentração de *S. enterica* nos tratamentos testados ao longo do tempo. A) Efluente; B) Lodo; C) Controle em tampão 7,0 e 9,0.



A concentração de *E. coli* foi significativamente diminuída ( $\geq 2 \text{ Log}_{10}$ ) em todos os tratamentos propostos ntre os dias 15 e 20 ( $p=0,03$ ) no efluente e lodo, respectivamente, destacando que os aditivos CZ e CaO no efluente apenas mostraram-se eficientes para promover a inativação dos patógenos após 40 e 30 dias, respectivamente. Quanto à estabilidade de *E. coli* nos tampões 7,0 e 9,0, houve inativação significativa ( $2,3 \text{ Log}_{10}$  e  $3,1 \text{ Log}_{10}$ , respectivamente) ao final dos 90 dias, porém significativamente inferior à inativação nos tratamentos propostos (**Figura21**)

**Figura 21:** Concentração de *E. coli* nos tratamentos testados ao longo do tempo. A) Efluente; B) Lodo; C) Controle em tampão 7,0 e 9,0.



Quando os tratamentos foram comparados entre si, todos os contendo ureia no aditivo foram equivalentes, bem como E:CaO0,5% e E:CZ2% que não foram significativamente diferentes entre si ( $p \geq 0,05$ ) e portanto foram agrupados.

### **c1.2 Inativação de PhiX-174, MS2 e HAdV-2**

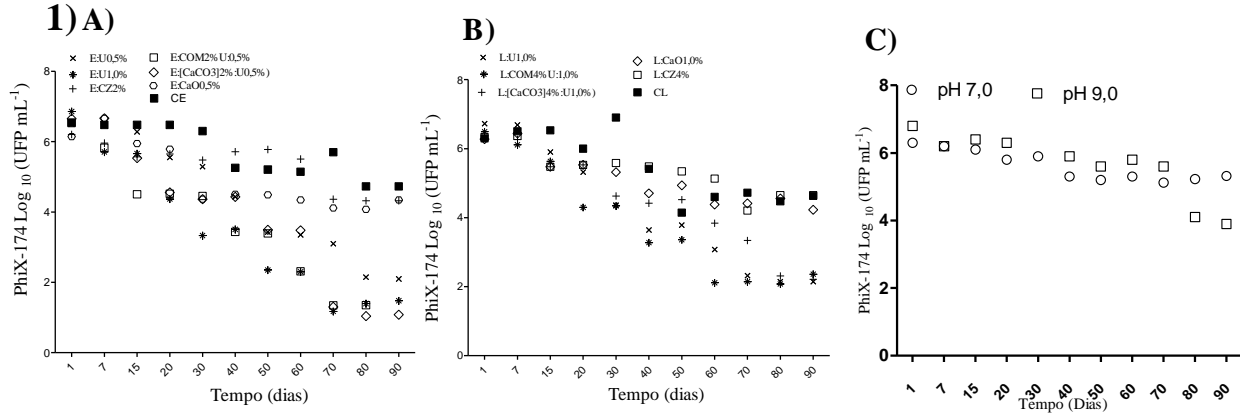
Quanto ao comportamento dos patógenos entéricos virais, ANOVA comprovou que a concentração de PhiX-174 ficou estável até os primeiros 15 dias no efluente e até os primeiros 30 dias no lodo em todos os tratamentos. Após este período os aditivos que continham ureia iniciaram comportamento diferente dos que não continham ureia e dos respectivos controles, sendo que os primeiros reduziram significativamente ( $\geq 2 \text{ Log}_{10}$ ) a concentração de PhiX-174. No efluente CZ e CaO não apresentaram comportamento significativamente diferente do controle não tratado ( $p \geq 0,05$ ). No lodo o tratamento composto por CaO passou a inativar significativamente PhiX-174 a partir de 40 dias; já as CZ no lodo não diferenciaram do comportamento no controle não tratado ( $p \geq 0,05$ ), sem apresentar tendência de inativação de PhiX-174. Quanto à estabilidade de PhiX-174 nos tampões 7,0 e 9,0 não ocorreu inativação significativa até os primeiros 70 dias de tratamento, no entanto, no tampão pH 10 após esse período houve inativação significativa ( $2,1 \text{ Log}_{10}$ ) (**Figura 22-1**).

No que se referiu à inativação do MS2, ANOVA comprovou que sua concentração não variou significativamente em nenhum dos tratamentos nos primeiros 30 dias, sendo que após esse período nos tratamentos que continham ureia houve decaimento significativo, porém isso não ocorreu nos tratamentos baseados em CZ e CaO ( $\geq 2 \text{ Log}_{10}$  de redução). Tanto no efluente quanto no lodo CZ e CaO não diferenciaram-se do comportamento do controle não tratado ( $p \geq 0,05$ ), sem apresentarem tendência de inativação de MS2. Quanto à estabilidade de MS2 nos tampões não houve redução significativa até os primeiros 90 dias de tratamento ( $\leq 2,0 \text{ Log}_{10}$ ) (**Figura 22-2**).

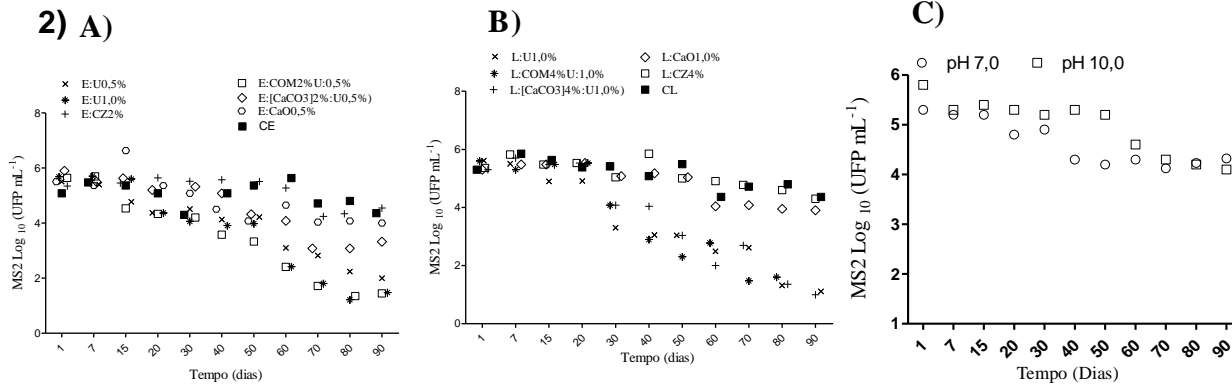
Quanto à inativação de HAdV-2, ANOVA comprovou que esse vírus foi significativamente mais inativado que os modelos PhiX-174 e MS2 em todos os tratamentos contendo ureia ( $p \leq 0,05$ ). Todos os tratamentos contendo ureia apresentaram significativa redução de HAdV-2 após os primeiros 15 e 20 dias, no efluente e no lodo, respectivamente. No efluente E:CaO1% e E:CZ2% comportaram-se sem diferença significativa com relação ao controle não tratado ( $p \geq 0,05$ ); já no lodo o tratamento com L:CaO1% inativou significativamente HAdV-2 ( $\geq 2 \text{ Log}_{10}$  de redução) após 40 dias de exposição, diferindo-se do seu controle ( $p \leq 0,05$ ) o que não ocorreu com L:CZ4% ( $p \geq 0,05$ ). Quanto à estabilidade de HAdV nos tampões houve redução significativa após 60 dias de exposição ( $\leq 2,0 \text{ Log}_{10}$ ), tanto em pH 7,0 quanto em pH 9,0 (**Figura 22**)



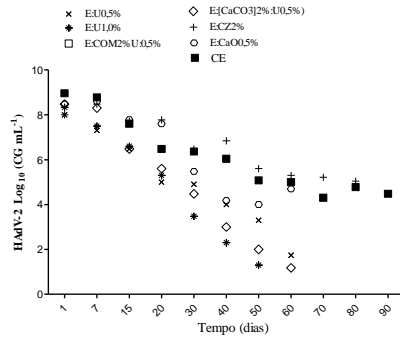
**Figura 22:** Concentração de PhiX-174 (1), MS2 (2) e HAdV (3) nos tratamentos testados ao longo do tempo. A) Efluente; B) Lodo; C) Controle em tampão 7,0 e 9,0.



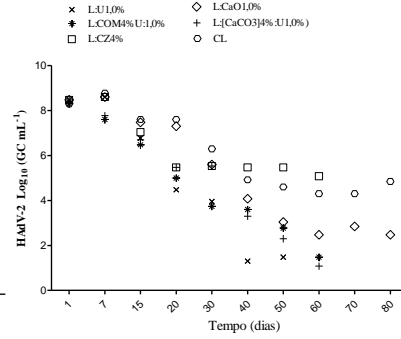




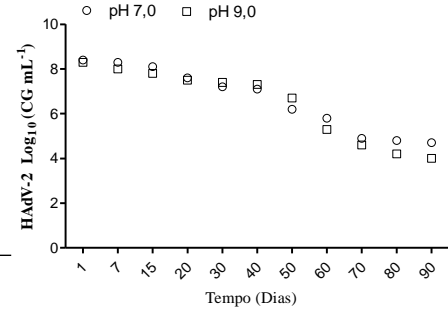
3) A)



B)



C)



Quando os tratamentos foram comparados entre si e agrupados de acordo com o comportamento frente à inativação tanto de PhiX-174 e MS2, no efluente EU0,5%, E:COM2%U:0,5% e E:COM2%U:0,5% E:U1,0% ( $p \geq 0,05$ ), bem como E:CaO0,5% e E:CZ2% não foram significativamente diferentes entre si e portanto foram agrupados. Já no lodo L:U1,0%, L:COM4%U:1,0% e L:[CaCO<sub>3</sub>]4%:U1,0% ( $p \leq 0,05$ ), bem como L:CZ4% e L:CaO1,0% ( $p \geq 0,05$ ) não foram significativamente diferentes entre si e portanto foram agrupados.

Quando os tratamentos foram agrupados de acordo com o comportamento de estabilidade de HAdV-2, no efluente todos os aditivos que continham ureia foram agrupados, bem como CZ e CaO ( $p \geq 0,05$ ); Já no lodo todos os aditivos que continham ureia foram igualmente agrupados ( $p \geq 0,05$ ), sendo CaO diferente de CZ após 40 dias de tratamentos ( $p \leq 0,05$ ), portanto não agrupando-se.

### **c1.3 Ovos de *Ascaris lumbricoides***

Os ovos de *Ascaris lumbricoides* nas mesmas condições de tratamentos utilizadas para os demais patógenos foram contabilizados,  $n=1.000$  ovos/saco em triplicata, porém não apresentaram tendência de inativação em até 90 dias de avaliação, permanecendo estáveis e viáveis tanto em efluente quanto em lodo suinícola, sem diferenciarem-se de seus respectivos controles, não sendo possível inferir sua inativação nas demais análises.

## c.2 Inativação de patógenos entéricos em função da concentração N-NH<sub>3</sub>

Todos os tratamentos contendo ureia no aditivo implicaram em  $iT_{90}$  significativamente menor que os tratamentos baseados em CZ e CaO. Tanto no efluente quanto no lodo os tratamentos que continham ureia em sua formulação apresentaram  $iT_{90}$  entre 18 e 26 dias; Já os tratamentos baseados em CZ e CaO apresentaram  $iT_{90}$  mínimo de 50 dias. Como apresentado na **Tabela 08** anteriormente, os tratamentos que continham ureia em sua formulação foram os mais promissores para elevação do pH e conversão de N-NH<sub>3</sub>. Assim, a **Tabela 09** apresenta a média das concentrações de N-NH<sub>3</sub> de cada um dos tratamentos de bem como o  $k$  dia<sup>-1</sup> (coeficiente de inativação) dos patógenos, obtido por regressão linear, considerando  $r^2 \geq 0,7$ , a partir das curvas de inativação dos patógenos avaliados, bem como o  $iT_{90}$  em dias para cada modelo patogênico avaliado em efluente e lodo suinícola ( $iT_{90} \text{ dias} = 1 / k \text{ dia}^{-1}$ ).

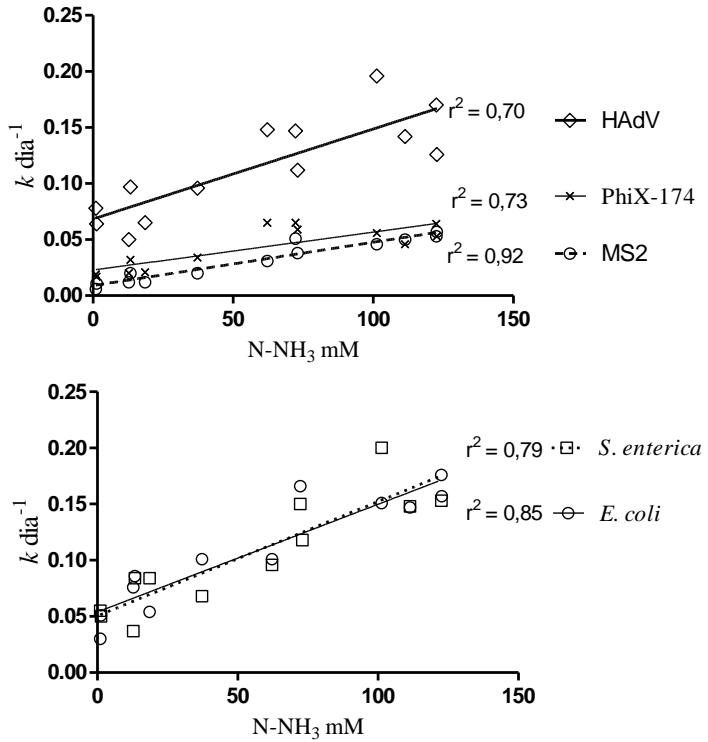
**Tabela 8:** Concentração média de N-NH<sub>3</sub> obtido em cada tratamento, *k* dia-1 e *iT*<sub>90</sub> dos patógenos avaliados (-) Não se aplica.

| Aditivo                              | N-NH <sub>3</sub> mM | PhiX-174                 |   | MS2                      |   | HAdV-2                   |   | <i>S. enterica</i>       |   | <i>E. coli</i>           |   |
|--------------------------------------|----------------------|--------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|---|
|                                      |                      | <i>k</i> d <sup>-1</sup> | <i>iT</i> <sub>90</sub> d <sup>-1</sup> | <i>k</i> d <sup>-1</sup> | <i>iT</i> <sub>90</sub> d <sup>-1</sup> | <i>k</i> d <sup>-1</sup> | <i>iT</i> <sub>90</sub> d <sup>-1</sup> | <i>k</i> d <sup>-1</sup> | <i>iT</i> <sub>90</sub> d <sup>-1</sup> | <i>k</i> d <sup>-1</sup> | <i>iT</i> <sub>90</sub> d <sup>-1</sup> |
| <b>E:U0,5%</b>                       | 73,0                 | 0,059                    | 16,94                                   | 0,038                    | 26,31                                   | 0,112                    | 8,92                                    | 0,118                    | 8,47                                    | 0,091                    | 10,98                                   |
| <b>E:U1,0%</b>                       | 122,5                | 0,064                    | 15,62                                   | 0,053                    | 18,86                                   | 0,170                    | 5,88                                    | 0,153                    | 6,53                                    | 0,176                    | 5,68                                    |
| <b>E:COM2%U:0,5%</b>                 | 72,3                 | 0,065                    | 15,38                                   | 0,051                    | 19,60                                   | 0,147                    | 6,80                                    | 0,150                    | 6,66                                    | 0,166                    | 6,02                                    |
| <b>E:[CaCO<sub>3</sub>]2%:U0,5%)</b> | 62,2                 | 0,065                    | 15,38                                   | 0,041                    | 24,39                                   | 0,148                    | 6,75                                    | 0,096                    | 10,41                                   | 0,101                    | 9,90                                    |
| <b>E:CZ2%</b>                        | 12,8                 | 0,020                    | 50,00                                   | 0,012                    | 83,33                                   | 0,050                    | 20,0                                    | 0,037                    | 27,02                                   | 0,076                    | 13,15                                   |
| <b>E:CaO0,5%</b>                     | 13,4                 | 0,032                    | 31,25                                   | 0,020                    | 50,00                                   | 0,097                    | 10,30                                   | 0,084                    | 11,90                                   | 0,086                    | 15,15                                   |
| <b>L:U1,0%</b>                       | 101,3                | 0,056                    | 17,85                                   | 0,046                    | 21,73                                   | 0,196                    | 5,10                                    | 0,200                    | 5,00                                    | 0,151                    | 6,62                                    |
| <b>L:COM4%U:1,0%</b>                 | 122,7                | 0,053                    | 18,86                                   | 0,057                    | 17,54                                   | 0,126                    | 7,93                                    | 0,100                    | 10,00                                   | 0,157                    | 6,36                                    |
| <b>L:[CaCO<sub>3</sub>]4%:U1,0%)</b> | 111,4                | 0,046                    | 21,73                                   | 0,050                    | 20,00                                   | 0,142                    | 7,04                                    | 0,148                    | 6,75                                    | 0,147                    | 6,80                                    |
| <b>L:CZ4%</b>                        | 18,6                 | 0,021                    | 47,61                                   | 0,012                    | 83,33                                   | 0,065                    | 15,38                                   | 0,084                    | 11,90                                   | 0,054                    | 18,51                                   |
| <b>L:CaO1,0%</b>                     | 37,3                 | 0,034                    | 29,41                                   | 0,020                    | 50,00                                   | 0,096                    | 10,41                                   | 0,068                    | 14,70                                   | 0,101                    | 9,90                                    |
| <b>CE</b>                            | 1,0                  | 0,019                    | 52,63                                   | 0,006                    | 158,7                                   | 0,078                    | 12,82                                   | 0,055                    | 18,18                                   | 0,030                    | 29,41                                   |
| <b>CL</b>                            | 1,3                  | 0,017                    | 58,82                                   | 0,011                    | 90,90                                   | 0,064                    | 15,62                                   | 0,050                    | 20,00                                   | 0,051                    | 19,60                                   |
| <b>Tampão pH 7,0</b>                 | -                    | 0,014                    | 71,42                                   | 0,013                    | 76,92                                   | 0,046                    | 21,73                                   | 0,424                    | 23,58                                   | 0,029                    | 34,48                                   |
| <b>Tampão pH 9,0</b>                 | -                    | 0,015                    | 66,66                                   | 0,017                    | 58,82                                   | 0,052                    | 19,23                                   | 0,238                    | 35,71                                   | 0,039                    | 25,64                                   |

Quando os valores de  $k$  foram comparados entre os patógenos, considerando seus respectivos tratamentos, MS2 e PhiX-174 foram significativamente mais estáveis que HAdV, *S. Typhimurium* e *E. coli* ( $p \leq 0,05$ ), sendo que entre esses três últimos *E. coli* foi significativamente mais propícia aos tratamentos propostos ( $p \leq 0,05$ ).

A inativação de patógenos entéricos nos tratamentos realizados foi parametricamente correlacionada com a concentração de N-NH<sub>3</sub> convertida em função do pH e do tempo, comprovando o potencial biocida da amônia não-ionizada/amônia livre em cada um dos tratamentos. A **Figura 23** apresenta a correlação obtida entre o  $k$  dia<sup>-1</sup> em função do tempo com a concentração de N-NH<sub>3</sub> disponível em efluente e lodo suinícola (considerando os valores de N-NH<sub>3</sub> obtidos em ambas as matrizes após os tratamentos). Das correlações encontradas entre a concentração de N-NH<sub>3</sub> e a estabilidade dos patógenos testados, MS2 ( $r^2 = 0,92$ ) e *E. coli* ( $r^2 = 0,85$ ) foram mais fortemente correlacionados com a variação de N-NH<sub>3</sub> quando comparados aos valores de “ $r$ ” do HAdV-2, PhiX-174 e *S. enterica*, os quais apresentaram  $r^2 = 0,70$ ,  $0,73$  e  $0,79$ , respectivamente.

**Figura 23:** Correlação linear entre o  $k$  dia<sup>-1</sup> de HAdV-2, PhiX-174, MS2, *S. enterica* e *E. coli* em função da concentração de  $N-NH_3$  em digestato suinícola.



### **c.3 Avaliação do potencial agronômico dos efluentes e lodos suinícolas após higienização**

Os tratamentos mais promissores foram avaliados quanto ao potencial agronômico de acordo com a IN 25/2009 do MAPA, que indica e dá limites às propriedades e características do putativo fertilizante a ser registrado. As características do efluente e lodo suinícola, após higienização, quando comparados com o exigido pelo MAPA, demonstram potencial agronômico dos digestatos suinícolas, para aplicação em solos, porém maior conformidade para nutrição foliar, devido à necessidade de adição de micronutrientes suplementares (boro, cálcio). A adição das CZ e COM elevou a quantidade de enxofre, cálcio e potássio nos digestatos, quando comparado com seus respectivos controles. O uso de U incrementou a concentração de nitrogênio nos digestatos, de forma não expressiva em relação aos respectivos controles. .

Os efluentes e lodos suinícolas higienizados, estudados no presente capítulo, possuem características similares aos descrito no Artigo 1 da IN/25-2009 do MAPA: *“Fertilizante organomineral fluido: produto de natureza fundamentalmente orgânica cuja natureza física é líquida, quer seja solução ou suspensão”*. No que se referiu a possível classificação, os efluentes e lodos avaliados nesse trabalho poderiam ser enquadrados, segundo o Artigo 2 da IN/25-2009 do MAPA, na Classe "A": *“Fertilizante orgânico que, em sua produção, utiliza matéria-prima de origem vegetal, animal ou de processamentos da agroindústria, onde não sejam utilizados, no processo, metais pesados tóxicos, elementos ou compostos orgânicos sintéticos potencialmente*



*tóxicos, resultando em produto de utilização segura na agricultura” já que não excederam os valores permitidos de metais, como zinco, cobre molibdênio, níquel e zinco (Tabela 9).*

**Tabela 9:** Características agrônômicas de micronutrientes, macronutrientes e metais a partir do efluente e lodo suinícola higienizado, comparados com os teores mínimos e máximos exigidos na IN 25/2009.

| Parâmetro                  | Efluente |                 |       |            | Lodo     |         |                   |               | IN 25/2009 - MAPA    |        |
|----------------------------|----------|-----------------|-------|------------|----------|---------|-------------------|---------------|----------------------|--------|
|                            | Ureia1 % | Calcário +Ureia | Cinza | COM+ Ureia | Ureia 1% | CaO4%   | Controle Efluente | Controle Lodo | Mínimo               |        |
|                            |          |                 |       |            |          |         |                   |               | Solo                 | Folhas |
| Boro %                     | NR       | NR              | NR    | NR         | NR       | <0,0001 | <0,0001           | <0,0040       | 0,01                 | 0,01   |
| Cálcio Total %             | 0,02     | 0,07            | 0,3   | 0,17       | 0,09     | NR      | 0,02              | NR            | 0,5                  | 0,3    |
| Carbono Orgânico %         | 0,27     | 0,23            | 0,23  | 0,17       | 0,1      | 4,1     | 0,14              | 4,32          | 3                    | 3      |
| Carbono total mmol./Kg     | 7,12     | 21,4            | NR    | NR         | NR       | 51      | 4,3               | 18            | SR                   | SR     |
| Enxofre total %            | 0,03     | 0,02            | 0,3   | 0,24       | 0,02     | 0,6     | 0,02              | 0,6           | 0,05                 | 0,01   |
| Ferro total %              | NR       | NR              | NR    | NR         | NR       | NR      | 0,001             | 0,06          | 0,1                  | 0,05   |
| Fósforo total %            | 0,012    | 0,011           | 0,023 | 0,011      | 0,01     | NR      | 0,012             | NR            | 0,5                  | 0,01   |
| Magnésio Total%            | 0,005    | 0,005           | NR    | NR         | NR       | 0,005   | 0,05              | 1             | 0,5                  | 0,03   |
| Manganês %                 | NR       | NR              | NR    | NR         | NR       | NR      | 0,002             | 0,005         | 0,05                 | 0,02   |
| Nitrogênio Total %         | 0,49     | 0,36            | 0,16  | 0,180      | 0,19     | 0,5     | 0,24              | 0,28          | 0,5                  | 0,05   |
| Potássio solúvel em água % | 0,07     | 0,07            | 0,2   | 0,07       | 0,07     | 0,08    | 0,05              | 0,09          | 0,5                  | 0,05   |
|                            |          |                 |       |            |          |         |                   |               | <b>Limite Máximo</b> |        |

|               |         |         |         |         |         |         |         |         |       |       |
|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|-------|
| Zinco %       | 0,007   | 0,0071  | 0,007   | 0,008   | 0,008   | 0,0071  | 0,007   | 0,007   | 0,05  | 0,05  |
| Cobre Total % | 0,0001  | 0,0001  | 0,0001  | 0,0001  | 0,0001  | 0,0028  | <0,0001 | 0,003   | 0,005 | 0,005 |
| Molibidênio % | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 | 0,005 | 0,005 |
| Níquel %      | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 | 0,005 | 0,005 |

Em conformidade com a IN 25/2009-MAPA

Inconformidade com a IN 25/2009-MAPA

NR: Não Regulamentado na IN/2009-MAPA.

#### **d) Discussão**

A necessidade de pós-tratamento dos subprodutos suinícolas provenientes de BAs (efluente e lodo acumulado) foi comprovada por nossos estudos iniciais (descritos no *Capítulo I* da presente tese doutoral) (FONGARO et al., 2014). Os pós-tratamentos propostos no presente estudo foram capazes de diferenciarem-se significativamente ( $p \leq 0,05$ ) de seus respectivos controles (não tratado, pH neutro e pH alcalino) no que se referiu ao pH, concentração e  $N-NH_3$  e na inativação de patógenos entéricos, exceto PhiX-174 e MS2 quando tratados com CZ2-4% e Cao2-4% ( $p \leq 0,05$ ). Os aditivos contendo fonte de carbonato (COM e  $CaCO_3$ ) mantiveram o pH mais estável em função do tempo quando comparados com os demais tratamentos. Explica-se que as cascas de ovos são constituídas por mais de 60% de  $CaCO_3$ , o que justifica seu uso para no reciclo agrícolas como substituto de  $CaCO_3$  obtido comercialmente (FISHBEIN, 2004). Estudos similares foram realizados por Himathongkham et al. (2000), Park & Diez-Gonzalez (2003), Chandran et al. (2009) e por Magri et al. (2013) utilizando lodo de estação de tratamento, esterco bovino e de aves e fezes frescas, respectivamente.

No efluente e lodo os tratamentos contendo ureia no aditivo aceleraram significativamente o processo de inativação dos patógenos entéricos (em  $1,3 \pm 1,0$  vezes) quando comparados com os tratamentos que não continham ureia. A combinação da troca de pH (neutro  $\rightarrow$  alcalino) promoveu a elevação da concentração de  $N-NH_3$ , sendo que os aditivos contendo ureia

mostraram-se mais eficientes no aumento do pH, propiciando a atuação de  $N-NH_3$  como agente biocida. A ureia disponível nos tratamentos é facilmente solubilizada e, em contato com as ureases presente naturalmente nos dejetos é hidrolisada propiciando um meio alcalino (PECSON et al., 2007).

Quanto ao mecanismo biocida da  $N-NH_3$ , sabe-se que este é citotóxico, uma vez que é altamente solúvel, não apenas em água mas também em lipídeos, facilitando o transporte em membranas celulares. Em contato com células viáveis, como as bacterianas,  $N-NH_3$  atua desestruturando a membrana celular, bem como desnaturando proteínas celulares, levando o organismo alvo à inativação (BUJOZEK, 2001). Outro mecanismo possível se dá pela entrada do gás amoníaco no citoplasma celular, tornando rapidamente tal citoplasma alcalino, fazendo com que as células percam potássio na proporção de 0,1 de elevação no pH celular, o que implicará em perda de potássio, levando à morte celular (DIEZ-GONZALEZ et al., 2000; BUJOZEK, 2001). Já, o mecanismo do  $N-NH_3$  proposto na inativação viral, é pouco conhecido. Estudos têm indicado que poliovírus e bacteriófagos F2 sofrem clivagem dos seus ácidos nucleicos (RNA) durante o tratamento com  $N-NH_3$ , o que não impede a adsorção viral à célula, porém impede sua tradução e replicação (BURGE et al, 1983;. WARD 1978). Recentemente Decrey et al. (2015) utilizaram o bacteriófago MS2, com genoma RNA simples fita, para avaliar sua inativação frente à exposição a  $N-NH_3$ , utilizando concentrações variando entre 0-160 mM (dentro das faixas

utilizadas no presente estudo), observando a perda de infecciosidade viral devido a uma transesterificação alcalina, levando à clivagem do material genético. Processos semelhantes ao realizado nesse trabalho já foram reportados na sanitização de fezes humanas e lodo de esgoto (MAGRI et al., 2015; VINNERÅS, 2013), mas não em digestato suinícola.

O uso de CZ e CaO deveu-se à sua popularidade e uso na higienização de excretas e derivados, também por serem aditivos preconizados pela Agência Americana de Proteção Ambiental para tal fim. A adição de CZ e CaO diretamente em solos é reportada, visando suprir demanda de potássio (uso de cinzas resultantes da incineração de lenha), bem como na correção da acidez dos solos, por meio da adição de CaO (USEPA-1992; ANDREOLI et al., 1996). Nos tratamentos aqui propostos, os baseados em CZ e CaO, implicaram em aumento significativo do pH no efluente e no lodo suinícola quando comparados aos seus controles não tratados. Assim, houve significativa inativação de *E. coli* e *S. Typhimurium* nos primeiros 50 dias de experimento. No entanto no efluente CZ2% não foi eficiente na inativação dos patógenos entéricos virais; Já CaO apresentou capacidade significativa de inativação de HAdV-2 após 40 dias de tratamento no lodo suinícola. Explica-se que o uso de CZ e CaO aqui propostos deveu-se à iniciativa de converter N-NH<sub>4</sub> naturalmente presente no digestato à N-NH<sub>3</sub>, sem adicionar uma fonte de nitrogênio. Nos primeiros 7 dias, o pH obtido estava na faixa desejada, entre 8,9 e 8,6 (propiciando a conversão de N-NH<sub>3</sub>), no entanto ao longo dos 90 dias de experimentos houve variação

significativa do pH nos tratamentos baseados em CZ e CaO (como apresentado na Tabela 07), os quais diminuíram ao longo do tempo, indicando portanto que a conversão de N-NH<sub>3</sub> tenha sido prejudicada minimizando a inativação de patógenos. Sugere-se que esse fato esteja relacionado com a característica do digestato em função do processo de biodigestão, já que o processo resulta da hidrólise de compostos orgânicos simples como álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos graxos voláteis de cadeia curta, bem como pode acumular ácidos graxos voláteis, que em sua conversão liberam H<sup>+</sup>, acidificando o meio (BELLI FILHO, 1995), dificultando o aumento do pH e assim a formação de N-NH<sub>3</sub>.

Considerando a correlação entre o *k* dos patógenos entéricos em função da concentração de N-NH<sub>3</sub>, verificou-se que os bacteriófagos foram menos susceptíveis à inativação que os HAdV-2, enquanto que o HAdV-2 foi menos susceptível à inativação que as bactérias entéricas estudadas. Sabe-se que os bacteriófagos, como os utilizados no presente trabalho, são apontados como um dos bioindicadores microbianos mais resistentes utilizados para inferir eficiência de tratamentos de águas e esgotos (MOCE-LLVINA et al., 2003; MANDILARA et al., 2006; GUZMAN et al., 2007; ASTALS et al., 2012). Os HAdV-2 são considerados patógenos virais entéricos modelo frente à infecção de células eucarióticas, uma vez que possuem maior resistência à exposição à radiação U.V, temperatura e variação de pH, quando comparados a outros modelos de vírus

entéricos animais. Isso se deve à ausência de envelope lipoproteico e ao seu genoma de DNA dupla fita, o qual pode utilizar enzimas presentes na célula hospedeira infectada para o reparo de danos no seu genoma (GERBA; NWACHUKU; RILEY, 2003). Já a maior susceptibilidade das bactérias entéricas aos tratamentos, pode estar relacionada com a alcalinização do citoplasma celular, levando a perda de potássio e morte celular, bem como a capacidade de penetração de  $N-NH_3$  pela membrana bacteriana, sendo tóxica para tais células (DIEZ-GONZALEZ et al., 2000; BUJOZEK, 2001). Todos os tratamentos contendo ureia implicaram na inativação de ao menos  $3\text{Log}_{10}$  dos patógenos entéricos aqui testados ao longo dos 90 dias de exposição, indo ao encontro da regulamentação nº1774 de 2002 da União Europeia que exige a redução de infecciosidade de patógenos entéricos virais e bacterianos em pelo menos 99,9% em processos de higienização de excretas animais para fins de reciclo agrícola.

No entanto, os ovos de *Áscaris lumbricoides* nas mesmas condições de tratamentos utilizadas nesse trabalho para os demais patógenos não apresentaram tendência de inativação até os primeiros 90 dias avaliados, permanecendo estáveis e viáveis. Os ovos de helmintos são considerados muito resistentes aos processos de desinfecção mediado por CaO e temperatura, por exemplo. Porém, para seu franco desenvolvimento, os ovos dependem de condições oxigenadas e úmidas, por isso, solos úmidos e sombreados favorecem seu embrionamento e sobrevivência (CDC, 2010). Essa resistência deve-se às



características morfológicas e fisiológicas dos ovos de helmintos. Os ovos de *Ascaris* spp. são protegidos por quatro camadas membranosas, tendo em média uma espessura total de 4,5  $\mu\text{m}$ , compostas, na ordem interna para a externa: (i) camada lipídica resistente à dessecação e à penetração de substâncias polares; (ii) a camada quitinosa, que confere rigidez e proteção mecânica; (iii) a camada vitelínica de lipoproteína; e (iv) a camada externa uterina, quase impermeável a gases e solventes lipídicos (QUILÈS et al.,2006), dificultando sua inativação, quando comparados aos vírus entéricos e bactérias.

As características do efluente e lodo suinícola, após higienização, quando comparados com o exigido pelo MAPA (IN 25/2009), demonstram potencial agrônomo dos digestatos suinícolas, para aplicação em solos, porém maior conformidade para nutrição foliar. Esse fato pode estar fortemente correlacionado com a nutrição e capacidade de conversão alimentar animal, uma vez que houve necessidade de aumentar a concentração dos macronutrientes, como magnésio, cálcio e boro para atender a IN do MAPA, macronutrientes esses aproveitados na digestão animal (EMBRAPA, 2009). Mesmo considerando que a adição de CZ2-4% não apresentou potencial na higienização dos digestatos, essa mistura foi capaz de aumentar a quantidade de enxofre, cálcio e potássio nos digestatos, bem como a adição de COM, que igualmente colaboraram para essa melhoria nutricional. Cinzas contém Mg, MgO, K<sub>2</sub>O, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e outros nutrientes na sua constituição, assim como as cascas de

ovos que podem ser fonte de cálcio e enxofre (OSAKI, 1991; FISHBEIN, 2004), que portanto podem valorar as características nutricionais dos digestatos como fertilizantes para uso em solos e nutrição foliar.

Atualmente, fertilizantes organominerais disponíveis no mercado para nutrição de solos e nutrição foliar (30% de Nitrogênio), custam em média R\$ 10,00 reais por litro (pesquisa de mercado das marcas: Ultraverde®, Forth® e Nutriorgan®). Considerando os nossos tratamentos, sendo os mais promissores os que continham ureia, simulando-se o máximo necessário de ureia para o tratamento de digestato de 1-2%, assume-se v/v de ureia/digestato, sendo, portanto necessários 10-20 Kg de ureia para tratar e produzir 1.000 L de fertilizante, o que custaria R\$ 0,02-0,04/L, respectivamente. Considerando que uma granja de suínos, com 800 animais em CT gera diariamente cerca de 2.000 L de dejetos (mistura de fezes, urina e água de lavagem), pelo processo de biodigestão pode-se produzir cerca de 441m<sup>3</sup> de biogás. Esse biogás convertido a energia elétrica poderá gerar cerca de 272,68 kW de eletricidade diária, o que equivale a 9.000 kW a cada mês, considerando o custo de R\$ 0,3376 por kW (KUNZ et al., 2009; RIZZONI et al., 2012). Ao final da biodigestão, ainda considerando os resultados aqui apresentados, o digestato gerado poderá ser utilizado como fertilizante seguro com valoração agrônômica embutida, por meio de processo que vise sua higienização e reaproveitamento sanitariamente seguro.

Quanto à recomendação do uso dos fertilizantes aqui propostos, isso deverá variar de acordo com as condições nutricionais e características dos solos agricultáveis, bem como da cultura desejada. Normalmente fertilizantes contendo mais de 20% de Nitrogênio são recomendados para melhorar o rendimento de produção de cana-de-açúcar, plantação de banana e milho, bem como de soja e pastagens para alimentação de gado leiteiro e de corte (ROTZ, 2004). O fertilizante aqui obtido pode ser facilmente incorporado pelo solo, devido à solubilidade, porém deve-se considerar a gestão de seu uso no que diz respeito à mitigação de seu impacto frente aos patógenos ainda presentes, se for o caso, formação de aerossóis durante a aplicação por aspersão, percolação e lixiviação, podendo acometer rios e reservas ambientais (EPA, 1994; ROTZ, 2004). Destaca-se ainda a necessidade de ajuste do pH para neutro (podendo-se utilizar ácidos fracos), bem como podendo-se estudar a aplicação por injeção nos solos, visando correção de solos ácidos e evitando-se perdas de amônia por volatilização. Em geral, todos os fertilizantes organominerais das classes "A" e "B" que utilizem esterco suíno como matéria-prima ou outros subprodutos pecuários, segundo a IN-2009 do MAPA, só poderão ser comercializados mediante recomendação técnica firmada por engenheiro agrônomo ou engenheiro florestal, respeitada a área de competência, considerando o tipo de solo e cultivo desejado, necessitando-se estudos para mitigar a percolação e lixiviação de nutrientes e patógenos para corpos hídricos.

#### e) **Considerações finais do *Capítulo IV***

A higienização de efluentes e lodos suinícolas, pós-anaerobiose, mediada por  $N-NH_3$  é promissora, tendo em vista o custo benefício, devido à eficiência na sanitização e baixa complexidade operacional associada, possuindo a vantagem da amônia não ser consumida durante o processo de tratamento, agregando valor nutricional para uso agrônômico, o que valoriza os digestatos suinícolas, sendo, portanto um possível produto biotecnológico .

Estudos direcionados para avaliar o comportamento dos potenciais fertilizantes em solos brasileiros são requeridos, tendo em vista a demanda nutricional do solo e do cultivo a ser testado, visando à proteção ambiental.

**f) Referências utilizadas no Capítulo IV**

ANDREOLI, C.V. DOMASZAK, S FERNANDES, F LARA, A. I. Proposta preliminar de regulamentação para a reciclagem agrícola do lodo de esgoto no Paraná. Sanare:Curitiba, 1997, 7 (7):53-60 BISCAIA,R.C.M. & MIRANDA,G.M. Uso de lodo de esgoto calado na produção de milho. Sanare, Curitiba, 5 (5):86-89. 1996.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22<sup>st</sup> ed. American Public Health Association 2012, Washington, DC.

AZBAR, N., URSILLO, P., SPEECE, R. E. Effect of process configuration and substrate complexity on the performance of anaerobic processes, Water Research, v. 35, n. 3, p. 817-829, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 28/2007 de 27 de julho de 2007. Aprova os Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizantes Minerais, Orgânicos, Organo-Minerais e Corretivos, disponíveis na Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial - CGAL/DPA/MAPA, na Biblioteca Nacional de Agricultura – BINAGRI e no sítio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. DF: Diário Oficial na União, 31 de jul. 2007.

BUJOZEK, G. Influence of ammonia and other abiotic factors on microbial activity and pathogen inactivation during processing of high-solid residues. Diss. Manitoba:University of Manitoba. (2001).

BURGE, W.D., CRAMER, W.N. & KAWATA, K. Effect of heat on virus inactivation by ammonia. *Applied & Environmental Microbiology* 46(2), 446-51, 1983.

CHANDRAN, A., PRADHAN, S.K. & HEINONEN-TANSKI, H. (2009). Survival of enteric bacteria and coliphage MS2 in pure human urine. *Journal of Applied Microbiology*, 107(5), 1651-1657, 2009.

CDC Parasitology Diagnostic Web Site - DPDx - Laboratory Identification of Parasites. [www.dpd.cdc.gov/](http://www.dpd.cdc.gov/) (2010).

DECREY, L.; KAZAMA, S.; UDERT, K. M.; KOHN, T. Ammonia as an *in situ* sanitizer: inactivation kinetics and mechanisms of the ssRNA virus MS2 by NH<sub>3</sub>. *Environmental Science & Technology*, v. 49, n. 2, p. 1060-1067, 2015.

DIEZ-GONZALEZ, F., JARVIS, G.N., ADAMOVICH, D.A. & RUSSELL, J.B. Use of carbonate and alkali to eliminate *Escherichia coli* from dairy cattle manure. *Environmental Science & Technology*, 34(7), 1275-1279, 2000.

DIKA, C.; DUVAL, F.L.; LY-CHATAIN, H.M.; MERLIN, C.; GANTZER, C. Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses: comparison between MS2 phage and corresponding virus-like particles. *App. Environ. Microbiol.*, v.77, p.4939-4948, 2011.

EPA. Environmental Protection Agency. Health effects of land application of municipal sludge. Research and Development. Cincinnati. USEPA/600/1-85/015. 78 p. 1985.

FISHBEIN, L. Multiple sources of dietary calcium - some aspects of its essentiality. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, New York, v. 39, p. 67-80, 2004.

FONGARO G, VIANCELLI A, MAGRI ME, ELMAHDY EM, BIESUS LL, KICH JD, KUNZ A, BARARDI CR. Utility of specific biomarkers to assess safety of swine manure for biofertilizing purposes. *Sci Total Environ.* (479-480):227-283, 2014.

FONGARO, G., NASCIMENTO, M .A., RIGOTTO, C., RITTERBUSCH G., DA SILVA A.D., ESTEVES, P.A., BARARDI, C.R.M. Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. *Vir J* 10:166, 2013.

GASSILLOUD, B.; SCHWARTZBROD, L.; GANTZER, C. Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p.3965-3969, 2003.

GERBA, C. P.; NWACHUKU, N.; RILEY, K. R. Disinfection resistance of waterborne pathogens on the United States Environmental Protection Agency's Contaminant Candidate List (CCL). *Journal of Water Supply: Research and Technology - Aqua*, v. 52, n. 2, p. 81-94, 2003.

HAUG, R.T. *The practical handbook of compost engineering*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO 10715-2:2000. *Water Quality – Detection and enumeration of bacteriophages.*, 2000.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO 6579:2002. *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*, 2002.

KO, G., CROMEANS, T.L., SOBSEY, M.D. Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69:7377–84, 2002.



KREIBEL, K, BOŠL, M, HU, M. Inactivation of F-specific bacteriophages during flocculation with polyaluminum chloride e A mechanistic study. *Water Research*, 51, 144 e 151, 2014.

KUNZ, A., MIELE, M., STEINMETZ, R.L.R. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. *Bioresour Technol*, 100: 5485–9, 2009.

MAGRI, M. E, PHILIPPI, L.S; VINNERÅS, B. Inactivation of Pathogens in Feces by Desiccation and Urea Treatment for Application in Urine-Diverting Dry Toilets. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(7), p. 2156–2163, 2013.

MANDILARA, G., MAVRIDOU, A., LAMBIRI, M., VATOPOULOS, A., RIGAS, F. The use of bacteriophages for monitoring the microbiological quality of sewage sludge. *Environ Technol*, 27:367–370, 2006.

MOCE' - LLIVINA, L., MUNIESA, M., PIMENTA-VALE, H., LUCENA, F., JOFRE, J. Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Appl Environ Microbiol*, 69(3):1452–1456, 2003.

NORDIN, A.; OTTOSON, J.; VINNERÅS, B. Sanitation of faeces from source-separating dry toilets using urea. *Journal of Applied Microbiology*, v.107, p. 1579-1587, 2009b.

OSAKI & DAROL. ESTUDO DA QUALIDADE DE CINZAS VEGETAIS PARA USO COMO ADUBOS NA REGIÃO

METROPOLITANA DE CURITIBA. Rev- Setor Ciências Agrárias 11 (1-2). 1989/1991.

PARK, G.W. & DIEZ-GONZALEZ, F. Utilization of carbonate and ammonia-based treatments to eliminate *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* DT104 from cattle manure. *Journal of Applied Microbiology* 94(4), 675-685, 2003.

QUILÈS, F., BALANDIER, J.-Y. & CAPIZZI-BANAS, S. In situ characterisation of a microorganism surface by Raman microspectroscopy: the shell of *Ascaris* eggs. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v.386 (2), 249-255, 2006.

ROTZ, C. A. Management to reduce nitrogen losses in animal production. *Journal of Animal Science*. 82(E. Suppl.): E119-137., 2004.

RIZZONI, L; TOBIAS, DEL BIANCHI, M; GARCIA,J. Anaerobic digestion to treat swine manure. *Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária – Issn: 1679-7353*, 2012.

SIDHU, J.P.S., TOZE, S.G. Human pathogens and their indicators in sludge: a literature review. *Environ Int* 35:187–201, 2009.

STUMBO, C.R. *Thermobacteriology in food processing*. 2nd ed. New York, Academic Press. 329 p., 1973.

UNIÃO EUROPEIA - REGULAMENTO (CE) N.º 1774/2002 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 3 de Outubro de 2002 que estabelece regras sanitárias relativas aos subprodutos animais não destinados ao consumo humano, 2002.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. Land Application of Biosolids: Process Design Manual Disposal. Cincinnati : EPA, s.d, 1992.

VINNERÅS, B. Sanitation and hygiene in manure management. In: Sommer, S.G., Jensen, L.S., Christensen, M.L., Schmidt, T. (eds). *Animal Waste – Recycling, Treatment and Management*. Wiley-Blackwell. Oxford UK (In Press). 2013. viral.

VINNERÅS, B.; HEDENKVIST, M.; NORDIN, A.; WILHELMSON, A. Peepoo bag: self-sanitising single use biodegradable toilet. *Water Science and Technology* v.59, p. 1743-1749, 2009.

WARD, R.L.; KNOWLTON, D.R.; WINSTON, P.E. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. *App. Environ. Microbiol.*, v.52, p.450-459, 1986.

WONG, K, ONAN, B.M., XAGORARAKI, I. Quantification of enteric viruses, pathogen indicators, and salmonella bacteria in Class B anaerobically digested biosolids by culture and molecular methods. *Appl Environ Microbiol*, 76(19):6441–6448, 2010.

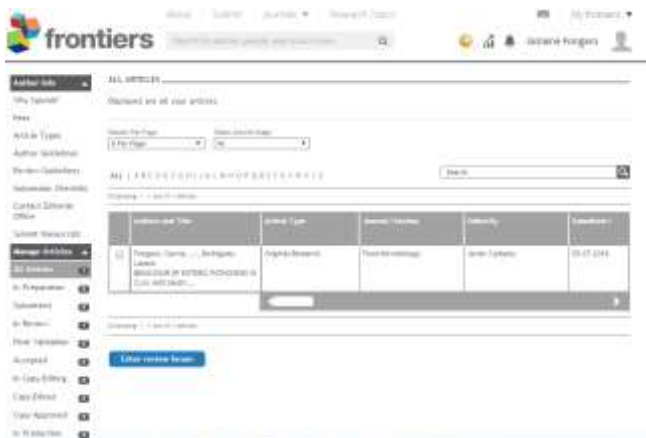


## - CAPÍTULO V -

*Comportamento de patógenos entéricos em solos fertilizados  
com digestato suínícola*



Artigo Enviado para Publicação  
**Revista: Frontiers in Microbiology**



a) **Objetivo específico**

Avaliar a sobrevivência, lixiviação e percolação de patógenos entéricos em solos fertilizados com digestato suinícola.

b) **Metodologia**

b.1 Digestato suinícola e solos

O experimento foi conduzido utilizando digestato suinícola proveniente de biodigestor anaeróbico mesofílico de uma granja produtora de suínos localizada na cidade de Salamanca, Espanha. Este biodigestato foi utilizado para fertilização dos solos (argiloso e arenoso) coletados nessa mesma região, caracterizada por áreas cultiváveis de milho e trigo, no entanto os

solos coletados para o presente experimento não havia sido fertilizado anteriormente.

O digestato suinícola foi caracterizado quanto à concentração de sólidos totais (ST) níctrogênio amoniacal total, fósforo total (PT) e pH. Os solos coletados foram avaliados à concentração de NT, PT, matéria orgânica (MO), carbonato ( $\text{CO}_3$ ), carbono orgânico total (COT), sódio extraível (SE), percentual de argila, percentual de areia, pH e condutividade, de acordo com APHA (2002).

## b.2 Microrganismos entéricos modelos

No presente experimento *Escherichia coli* O157:H7 cepa CECT 4267, *Salmonella enterica* - serovar Typhimurium (ATCC 14028), mengovírus geneticamente modificado (vMCo – cepa ATCC VR-1597) e PhiX-174 foram utilizados como patógenos modelos indicadores para avaliação de estabilidade, percolação e lixiviação em solos fertilizados com digestato suinícola. Estoques e de PhiX-174 foram produzidos e quantificados de acordo com o descrito previamente no Capítulo I. Estoques de vMCo foram produzidos em linhagem contínua de células de câncer de colo uterino (HeLa - ATCC CCL-2TM), de acordo com Costafreda et al. (2006).

A enumeração de *S. enterica* foi realizada usando ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD), de acordo com Magri et al., 2013 e *E. coli* foi enumerada de acordo com a ISO 4832:2006. Unidade formadoras de colônias (UFC) foram contabilizadas após 18, 24 e 48 h de incubação a 37°C para *E. coli* e *S. enterica*. PhiX-174 foi quantificado em *E. coli* ATCC 13706, e quantificado pelo método ágar de dupla camada, de acordo com a ISO 10705-2:2000. PhiX-174 foi contabilizado pela contagem de unidades formadoras de placa (UFP). vMCo foi quantificado por ensaio de placa de lise, descrito por Ernest et al. (1970). Para isso 1 mL ou 1 mg de amostra foi tratado com 10 U/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomicina e 0.025 µg/mL de anfotericina B e diluída em 9 mL de tampão salino (10%). Posteriormente as amostras foram inoculadas em triplicada em células HeLa,

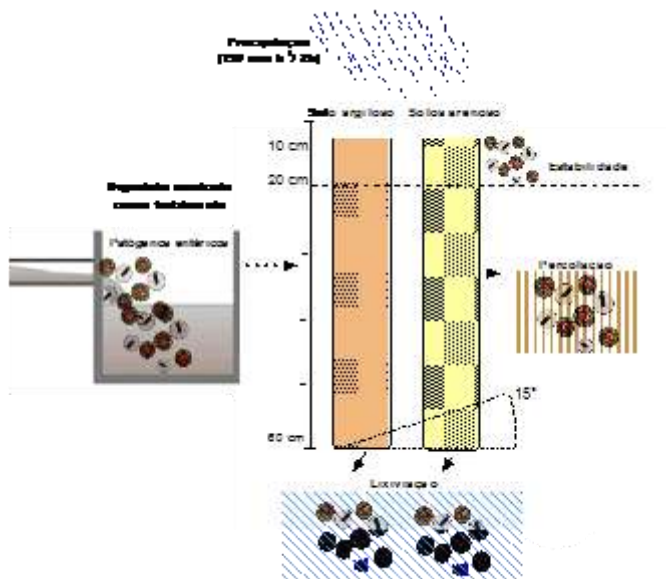


incubadas 1h sob rotação e posteriormente recoberta com meio mínimo essencial (MEM 1X) contendo 1,5% de carboximetilcelulose. Após 3-7 dias de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, as UFP foram contabilizadas.

b.3) Microcosmos de solos fertilizados com digestato suínico para ensaio de estabilidade, percolação e lixiviação de patógenos entéricos

Foram criados dois microcosmos em triplicatas, utilizando a coluna de solo original (argiloso e arenoso), sem previa fertilização, sendo removidos diretamente do ambiente para dentro de colunas de 60 cm de altura e 30 cm de diâmetro, em tubo de PVC previamente bloqueado com solução de 20% de leite desnatado (Fluka), para evitar deposição de patógenos e micropartículas nos poros do tubo, com abertura em ambas as extremidades. Os dois solos testados em suas respectivas colunas, montadas *ex situ*, foram expostos às condições que mimetizaram as condições climáticas locais de temperatura do solo (16±2 °C) e temperatura ambiente (22±2 °C). Os microcosmos foram posicionados na posição vertical, com uma inclinação de 10-15°, com relação à horizontal, representando um terreno agrícola de alto rendimento vegetativo (EPA 540/R-95/141 (EPA, 1995). A **Figura 24** apresenta esquematicamente o experimento *ex situ*.

**Figura 24:** Desenho esquemático do experimento conduzido ex situ realizado com solos argilosos e arenosos em colunas de 60 cm, onde a estabilidade, a percolação e a lixiviação dos patógenos foram avaliadas.



### b.3.1 Ensaio de estabilidade

O ensaio de estabilidade dos microrganismos entéricos foi realizado durante 120 dias em solo argiloso e arenoso. Todos os experimentos foram realizados em triplicata usando tubos sentinelas, descritos por Schwarz et al. (2014). Os tubos sentinelas caracterizam-se por possuírem dois compartimentos, o interno com poros entre 50-100 micrometros (Life Sciences, New York USA), onde foram alocados os patógenos testados nas seguintes concentrações: PhiX 174  $3,8 \times 10^6$  UFP mL<sup>-1</sup>, vMCo  $1,2 \times 10^5$  UFP mL<sup>-1</sup>, *S. enterica*  $9,0 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> e *Escherichia coli*  $1,2 \times 10^8$ , como modelos de patógenos entéricos. Num segundo compartimento poroso, com alta permeabilidade da face

externa para a interna foram alocados 3,5 g de cada um dos solos testados, já fertilizados por aspersão com digestato suinícola ( $50 \text{ m}^3 \cdot \text{hectare}^{-1}$ ). Os poros permitem trocas gasosas entre o tubo sentinela e o meio externo (onde o tubo é alocado), permitindo avaliar a persistência dos patógenos em quantidades representativas da matriz testada (solo, no presente estudo).

Nos microcosmos foram alocados 15 tubos sentinelas, em triplicata, numa profundidade entre 10 e 20 cm. Os tubos foram removidos nos seguintes tempos (dia): 1, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 e 120 dias após. Em cada evento, 3 tubos eram retirados, tendo um total de 30 tubos sentinelas avaliados em réplicas por solo ( $n=60$ ).

### b.3.2 Ensaio de percolação

Para o ensaio de percolação, os microcosmos compostos por solos arenosos e argilosos foram fertilizados por aspersão com digestato suinícola ( $50 \text{ m}^3 \cdot \text{hectare}^{-1}$ ) tendo a extremidade inferior fechada por uma rede de tecido para evitar perda de solo. O digestato utilizado foi previamente inoculado com PhiX 174 ( $3,8 \times 10^6 \text{ UFP mL}^{-1}$ ), vMCo ( $1,2 \times 10^5 \text{ UFP mL}^{-1}$ ), *S. enterica* ( $9,0 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ ) e *Escherichia coli* ( $1,2 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ ). Posteriormente, orifícios de  $1 \text{ cm}^2$  de diâmetro foram realizados nos microcosmos, nas profundidades 10, 20, 30, 40 e 50 cm, permitindo a coleta horizontal da coluna de solo utilizando sonda estéril com capacidade de 2g de volume, possibilitando avaliar a

percolação dos patógenos em 0, 3, 6, 12, 24, 48 h e aos 15 e 20 dias após o evento de fertilização.

### b.3.3 Ensaio de lixiviação

Para o ensaio de potencial de lixiviação dos patógenos entéricos após 20 dias da fertilização, os microcosmos foram expostos à precipitação, com constância média de  $150 \pm 20 \text{ mm h}^{-1}$ , durante 2 h. Um tubo coletor estéril e com capacidade útil de 100 mL foi alocado abaixo de cada microcosmo, permitindo ainda a inclinação de  $10\text{-}15^\circ$  e sob temperatura ambiente de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . O líquido lixiviado foi coletado após 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 e 48 h durante e após o evento chuvoso, sendo a partir dessa realizada a quantificação dos patógenos.

### b. 3.4. Análises estatísticas

Análise de variância (Kruskal–Wallis) foi realizada no programa Statistic 7.0, para avaliar diferenças significativas entre os parâmetros físico-químicos dos dois tipos de solos avaliados. Para avaliar se houve diferença entre as camadas dos solos em 10, 20, 30, 40 e 50 cm de profundidade *one-way analysis of variance* (ANOVA) (GraphPad Prism 5.0, EUA) foi aplicada, visando agrupar os semelhantes quanto à percolação dos patógenos. O tempo necessário para inativação de  $1 \log_{10}$  ( $iT_{90}$ ) foi calculado, usando o coeficiente de inativação ( $-k$ ) por meio de regressão linear, bem como para calcular o tempo de percolação de  $1 \log_{10}$  ( $pT_{90}$ ) utilizando o coeficiente de percolação ( $kp$ ), obtido por regressão linear.

ANOVA foi aplicado para avaliar a diferença entre os grupos a) de solos e b) de patógenos, seguido de *Bonferroni Test* para avaliação pontual, em profundidade. Análises de correlação foram realizadas por meio de *Pearson Correlation* sempre que se desejou obter respostas sobre possíveis relações entre os parâmetros avaliados. Para isso GraphPad Prism 5.0 foi utilizado e valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

### c) Resultados

#### c.1 Parâmetros físico-químicos

Os solos argilosos contiveram quantidades significativamente maiores de COT, MO e argila, bem como valores de pH e condutividade ( $p \leq 0,05$ ). A **Tabela 10** apresenta os valores dos parâmetros físico-químicos do solo argiloso e arenoso (anteriormente e posteriormente a fertilização).

**Tabela 10:** Parâmetros físico-químicos do solo argiloso e arenoso (anteriormente e posteriormente a fertilização).

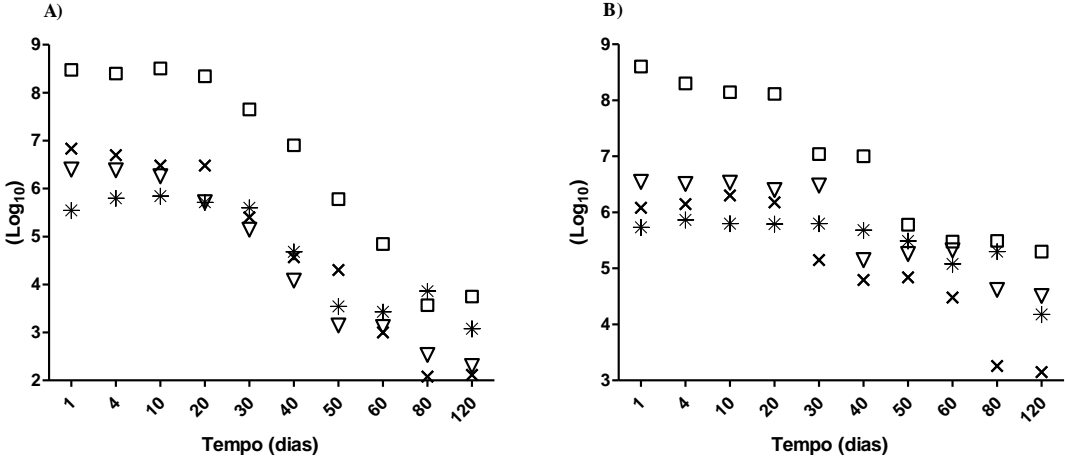
| Parâmetros               | Antes da fertilização<br>Média ± Desvio padrão |              | Após fertilização<br>Média ± Desvio padrão |              |
|--------------------------|--|--------------|--|--------------|
|                          | Solo argiloso                                  | Solo arenoso | Solo argiloso                              | Solo arenoso |
| NT (%)                   | 0,07 ± 0,01                                    | 0,02 ± 0,01  | 0,15 ± 0,11                                | 0,08 ± 0,04  |
| PT (%)                   | 0,04 ± 0,02                                    | 0,01 ± 0,01  | 0,11 ± 0,02                                | 0,05 ± 0,03  |
| COT (%)                  | 0,82 ± 0,05 *                                  | 0,27 ± 0,03  | 1,23 ± 0,15                                | 0,32 ± 0,01  |
| MO (%)                   | 1,16 ± 0,09 *                                  | 0,42 ± 0,05  | 2,57 ± 0,06*                               | 0,71 ± 0,02  |
| CO <sub>3</sub> (%)      | <3,00  | <3,00        | <3,00                                      | <3,00        |
| SE (mg g <sup>-1</sup> ) | <0,02  | <0,02        | 0,08 ± 0,01                                | 0,05 ± 0,01  |
| Argila (%)               | 32,2 ± 0,20 *                                  | 2,1 ± 0,41   | 34,8 ± 0,30                                | 3,41 ± 0,10  |
| Solo (%)                 | 12,0 ± 1,25 *                                  | 95,50 ± 1,41 | 13,0 ± 1,40                                | 94,0 ± 1,47  |
| pH                       | 8,33 ± 0,85 *                                  | 6,71 ± 0,55  | 8,62 ± 0,40                                | 6,71 ± 0,02  |
| Condutividade (uS/cm)    | 97,00 ± 3,20 *                                 | 12,21 ± 1,10 | 282,32 ± 4,10                              | 114,3 ± 0,12 |
| <b>Digestato</b>         |  |              |  |              |
| ST (mg L <sup>-1</sup> ) |  |              | 32,130 ± 267                               |              |
| NT (mg L <sup>-1</sup> ) |  |              | 5,936 ± 380                                |              |
| PT(mg L <sup>-1</sup> )  |  |              | 523 ± 43                                   |              |
| pH                       |  |              | 7,30 ± 0,20                                |              |

\* Diferença estatística significativa entre os solos(p<0,05).

## c.2 Estabilidade dos patógenos entéricos estudados

Reduções significativas ( $2,3 \log_{10}$ ;  $p < 0.05$ ) de *E. coli* O157:H7 e *S. enterica* foram observadas após 40 dias de estocagem de ambos os solos. No entanto, em solo argiloso os vírus entéricos testados tiveram comportamento muito semelhante ao das bactérias, tendo redução  $> 2 \log_{10}$  aos 40 e 50 dias para vMCo e PhiX-1274, respectivamente. Já no solo arenoso a estabilidade de vMCo foi significativamente afetada após 60 dias e de PhiX após 120 dias, com redução  $> 2 \log_{10}$  (**Figure 25**).

**Figura 25:** Estabilidade de patógenos entéricos modelos em A) solo argiloso e B) solo arenoso por até 120 dias após a biofertilização com digestato suíno contaminado. . (□) *E.coli* O157:H7, (×) *S. enterica*, (\*) PhiX-174 e (▽) cMCo.





Os dados apresentados na **Tabela 11** foram ajustados em regressão linear e foi possível calcular, com os  $-k$  o valor de  $iT_{90}$ , sendo de 6,62 e 9,34 dias para *E. coli* O157:H7 e *S. Typhimurium* em solo argiloso, respectivamente e de 10,75 e 11,90 em solo arenoso, respectivamente. Para os vírus entéricos o  $iT_{90}$  em dias foi de 10,52 e 21,2 para vMCo, em solo argiloso e arenoso, respectivamente; Para PhiX-174 o  $iT_{90}$  foi de 12,04 e de 43,47 em solo argiloso e arenoso, respectivamente (**Tabela 11**).

**Tabela 11:** Valor de  $iT_{90}$ , de  $-k$  e coeficiente de correlação ( $r^2$ ) dos patógenos entéricos estudados em solos fertilizados com digestato suínico (argiloso e arenoso) em função do tempo.

|                               | $-k$            | $iT_{90}$ dias | $r^2$         | $-k$          | $iT_{90}$ days | $r^2$         |
|-------------------------------|-----------------|----------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
|                               | Solo argiloso   |                |               | Solo arenoso  |                |               |
| <b><i>E. coli</i> O157:H7</b> | 0,151 ± 0,020   | 6,620 ± 0,500  | 0,870 ± 0,040 | 0,093 ± 0,030 | 10,750 ± 0,900 | 0,880 ± 0,040 |
| <b><i>S. Typhimurium</i></b>  | 0,0107 ± 0,030  | 9,340 ± 0,200  | 0,990 ± 0,050 | 0,084 ± 0,020 | 11,900 ± 0,900 | 0,810 ± 0,050 |
| <b>vMCo</b>                   | 0,095 ± 0,030 * | 10,520 ± 0,600 | 0,880 ± 0,020 | 0,047 ± 0,010 | 21,270 ± 1,100 | 0,930 ± 0,020 |
| <b>PhiX</b>                   | 0,083 ± 0,010 * | 12,040 ± 1,300 | 0,820 ± 0,030 | 0,023 ± 0,010 | 43,470 ± 1,300 | 0,840 ± 0,030 |

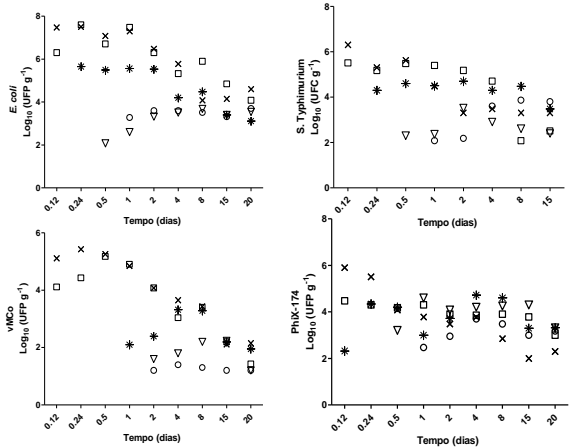
<sup>a</sup> Média ± Desvio Padrão; Diferença significativa entre ambos os solos ( $p < 0.5$ )

## **c.2 Estudo do potencial de percolação dos patógenos entéricos estudados**

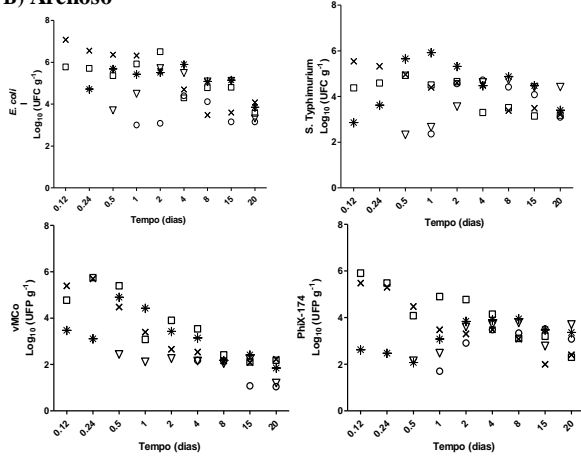
A **Figura 25** apresenta a média de percolação dos patógenos, sendo percolado: 3,80 Log<sub>10</sub> vs 3,92 Log<sub>10</sub> de *E. coli* O157:H7, 2,60 Log<sub>10</sub> vs 2,45 Log<sub>10</sub> de *S. enterica*, 4,2 Log<sub>10</sub> vs 4,2 Log<sub>10</sub> de vMCo e 2,8 Log<sub>10</sub> vs 2,32 Log<sub>10</sub> de PhiX-174 em solo argiloso e arenoso, respectivamente. No entanto, quando os patógenos foram comparados entre si, *E. coli* O157:H7 e vMCo foram significativamente mais percolados em ambos os solos testados ( $p < 0.05$ ).

**Figura 26:** Perfil de percolação em função do tempo de *E.coli* O157:H7, *S. enterica*, vMCo e PhiX em: (×) 10, (□) 20, (\*)30, (∇) 40 e (O) 50 cm de profundidade em solos fertilizados com digestato suínico. A) solo argiloso e B) solo arenoso.

**A) Argiloso**



**B) Arenoso**



O teste estatístico ANOVA foi aplicado para avaliar a diferença da distribuição dos patógenos ao longo da coluna dos solos testados e comprovou que as profundidades 10 e 20 cm (Grupo *a*) eram diferentes das profundidades 30, 40 e 50 cm (Grupo *b*), sendo que a percolação dos patógenos em função do tempo de “*a*” para o “*b*” ajustou-se em regressão linear e recepção pelo Grupo “*b*” com ajuste logarítmico(**Tabela 11**).

**Tabela 12:** Potencial de percolação (Grupo “a”) e recepção (Grupo “b”) dos patógenos entéricos avaliados (k dias-1) nos solos em função do tempo, com tendência linear e logarítmica, respectivamente.

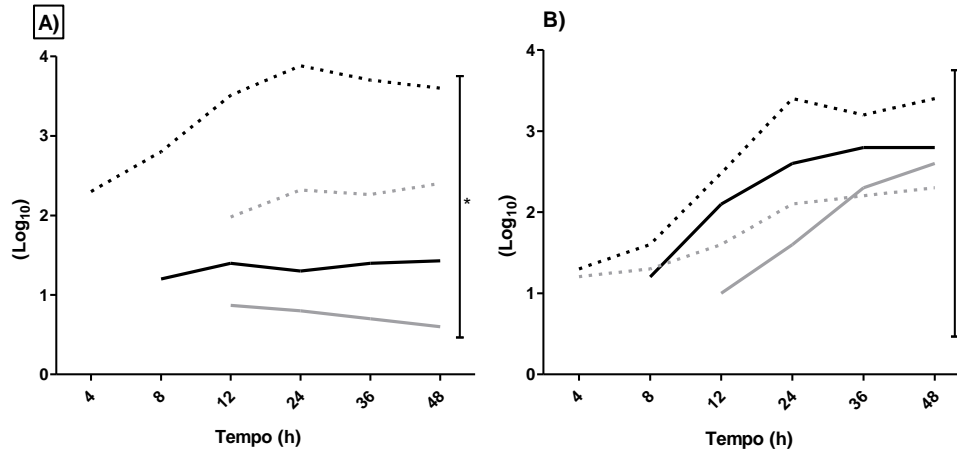
|                        | Grupo                | $k \text{ dias}^{-1}$ | $r^2$ | Ajuste      |  | Grupo               | $k \text{ dias}^{-1}$ | $r^2$ | Ajuste      |
|------------------------|----------------------|-----------------------|-------|-------------|--|---------------------|-----------------------|-------|-------------|
|                        | <i>Solo Argiloso</i> |                       |       |             |  | <i>Solo Arenoso</i> |                       |       |             |
| <i>E. coli</i> O157:H7 | a                    | 0,61                  | 0,94  | Linear      |  | a                   | 0,47                  | 0,91  | Linear      |
|                        | b                    | 1,11 *                | 0,76  | Logaritmico |  | b                   | 2,35 *                | 0,82  | Logaritmico |
| <i>S. enterica</i>     | a                    | 0,57                  | 0,92  | Linear      |  | a                   | 0,42                  | 0,91  | Linear      |
|                        | b                    | 0,60                  | 0,76  | Logaritmico |  | b                   | 1,10                  | 0,84  | Logaritmico |
| vMCo                   | a                    | 0,41                  | 0,95  | Linear      |  | a                   | 0,35                  | 0,79  | Linear      |
|                        | b                    | 0,42                  | 0,91  | Logaritmico |  | b                   | 0,49                  | 0,67  | Logaritmico |
| PhiX-174               | a                    | 0,27                  | 0,95  | Linear      |  | a                   | 0,41                  | 0,95  | Linear      |
|                        | b                    | 0,41                  | 0,72  | Logaritmico |  | b                   | *2,22                 | 0,91  | Logaritmico |

o Grupo “a” o valor de  $k \text{ dias}^{-1}$  do potencial de percolação dos patógenos das camadas 10 e 20 cm para as camadas 30-50 do Grupo “b”, obtidos por regressão linear; No Grupo b” o valor de  $k \text{ dias}^{-1}$  do potencial de recepção dos patógenos percolados em camadas mais profundas do solo (30-50cm),

### **c.3 Estudo do potencial de percolação dos patógenos entéricos estudados**

O potencial de lixiviação dos patógenos entéricos estudados foi avaliado após ocorrência de precipitação ( $150\text{mm h}^{-1}/2\text{h}$ ). A média de lixiviação foi obtida durante as primeiras 48h desde o início do evento chuvoso. A média de lixiviação em solos arenosos foi de 2,3, 1,8, 1,9 e 2,8  $\text{Log}_{10}$  para PhiX-174, vMCo, *S. enterica* e *E. coli*, respectivamente. Em solo argiloso foi de 1,34, 0,7, 2,24 e 3,81 para PhiX-174, vMCo, *S. enterica* e *E. coli*, respectivamente. A lixiviação de PhiX-174 foi significativamente maior ao longo das 48h ( $p \leq 0,05$ ) em solo arenoso que em solo argiloso, bem como *E. coli* O157:H7 dos patógenos avaliados foi o que apresentou significativo potencial de lixiviação em ambos os solos (**Figura 26**).

**Figura 27:** Perfil de lixiviação dos patógenos entéricos após evento de precipitação natural. (---) *S.enterica*, (---) *E. coli* O157:H7, (-) vMCo e(-) PhiX-174. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ )





#### **d) Discussão**

Solos argilosos são caracterizados por serem significativamente menos impermeáveis que os arenosos, possuindo baixa capacidade de desagregação e por isso formam terrenos viscosos e úmidos. Em termos de comportamento os solos argilosos são o oposto dos arenosos, principalmente no que se refere à plasticidade e capacidade de aglutinação, por isso solos argilosos possuem capacidade maior de reter MO, sendo mais produtivos para produção agrícola. No Brasil segundo o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos da Embrapa Solos (2013) 26% de todo o território nacional possui solos argilosos (EMBRAPA, 2013).

Uma variedade de fatores, como pH, temperatura, percentual de MO e salinidade dos solos podem afetar a estabilidade dos microrganismos, bem como seu comportamento de percolação e lixiviação (KIMURA et al., 2008). No entanto há maior preocupação acerca da estabilidade dos organismos patogênicos nos solos, podendo contaminar alimentos, águas e assim causar doenças. No presente estudo a escolha dos modelos de microrganismos patogênicos bacterianos (*E. coli* O157:H7 e *S. enterica*), bem como virais (PhiX-174 e vMCo) deu-se em função da importância de abordar o comportamento de patógenos zoonóticos, uma vez que os fertilizantes de origem animal podem conter tais microrganismos, em especial os dejetos suínos, pois esses animais são considerados reservatórios biológicos de possíveis agentes zoonóticos, como os rotavírus, *Salmonella* spp. e outros de importância veterinária e médica (GRIFFITH et al., 2006). O uso de PhiX-174 e de

vMCo (avirulentos para animais) dá-se como uma proposta de modelo de vírus entérico animal para avaliar comportamento de patógenos em solos, já que esses são estáveis em distintas temperaturas, pH e radiação UV. O PhiX-174 é um substituto reconhecido para vírus entéricos humanos e o vMCo é amplamente utilizado como modelo substituto aos norovirus humanos e vírus das hepatites A e E selvagens (todos não cultiváveis *in vitro* em culturas celulares estabelecidas) (COSTAFREDA et al., 2006; RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2012; BOUDAUD et al., 2012),

Os resultados apresentados nesse capítulo mostram duas matrizes de solos (argiloso e arenoso) e o comportamento de patógenos entéricos modelos em ambos os solos. Os resultados de inativação foram relacionados com a concentração de matéria orgânica presente nas amostras, podendo estar relacionados com a complexidade dos solos com maior concentração de MO, como os argilosos, uma vez que pode haver maior influência das proteases e nucleases provenientes da atividade microbiológica das comunidades presentes, bem como pode ocorrer predação entre microrganismos (WIESMANN et al., 2007; DIKA et al., 2011). O potencial de percolação e lixiviação dos patógenos diferenciado entre as matrizes pode estar intimamente relacionado com o pH e a concentração de sais, que interferem na condutividade dos solos. Explica-se que os patógenos virais tendem a agregar-se e adsorverem-se nas partículas sólidas, sendo essa força de atração dependente do ponto isoelétrico viral que, para PhiX-174, é de 6,5 e para vMCo está entre 4,5-6,5 (GERBA, 1984, SCHIJVEN et al., 2000, GERBA AND SMITH, 2005; PEPPER et al., 2006). Esse fato

pode justificar a capacidade de maior retenção e também inativação do vMCo e PhiX nos solos argilosos (pH 8,6), e portanto maior percolação e lixiviação em solos arenosos (pH 6,7).

A estabilidade de PhiX-174 indica que colifagos somáticos presentes em digestato suinícola podem ser marcadores em ensaios que visem detectar a presença e persistência de patógenos entéricos virais em solos fertilizados. A percolação dos patógenos entéricos nas profundidades iniciais (10 e 20 cm) em função do tempo foi linear para todos os modelos avaliados, no entanto a recepção desses percolados pelas camadas mais profundas (30, 40 e 50 cm) em função do tempo, teve tendência logarítmica. Isso pode estar relacionado com a capacidade de saturação dos solos, considerando que essa capacidade é cerca de  $3 \times$  maior em solos argilosos que nos arenosos (EMBRAPA, 2013), permitindo hipotetizar que após a saturação nas camadas iniciais ocorreu a percolação para as camadas mais profundas, transferindo assim os patógenos da superfície para o fundo. Quanto à capacidade individual dos patógenos percolarem *E. coli* O157:H7 atingiu camadas mais profundas em ambos os solos, bem como apresentou maior lixiviação, podendo ser indicada como biomarcador de contaminação microbiológica de solos, em profundidade e para análises de risco de lixiviação.

#### **e) Considerações finais do Capítulo V**

O presente estudo apresenta de forma inédita a possibilidade de avaliar *ex situ* a capacidade de persistência, percolação e lixiviação de patógenos entéricos em solos fertilizados com digestato suinícola,

podendo-se prever se tais parâmetros podem oferecer riscos de contaminação de plantas e águas. Esses resultados podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de análises de risco microbiológicas inerentes ao uso de digestato suinícola em diferentes tipos de solos, buscando a proteção dos corpos hídricos e a mitigação de riscos frente à produção alimentar no reciclo agrícola de dejetos de origem animal.

### Referências utilizadas no Capítulo V

APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22st ed, American Public Health Association 2012,

BOUDAUDN, M, FRÉVAL-, L.E, BOURDONNEC, A, JOSSENT J, BAKANGA F, ARNAL C, JAFFREZIC MP, OBERTI S, GANTZER C. Removal of MS2, Q $\beta$  and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale, *Water Res*, 15;46(8):2651-64, 2012..

DPDx - CDC Parasitology Diagnostic Web Site - DPDx - Laboratory Identification of Parasites. [www.dpd.cdc.gov/](http://www.dpd.cdc.gov/) (2010).

CHANGE, D, TILMAN, J, FARGIONE, B, WOLFF, C. et al, Forecasting Agriculturally Driven Global Environmental, *Science*, 292 (5515), 281-284, 2001..

CHART, H, VTEC enteropathogenicity, *Symp, Ser, Soc, Appl, Microbiol.*, 29(Suppl.), S12–S13, 2000.

COSTAFREDA, M.I, BOSCH, A, & PINTÓ, R.M, Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3846–3855, 2006.

DIKA, C, DUVAL, JF, LY-CHATAIN, HM, MERLIN, C, GANTZER, C. Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses:

comparison between MS2 phage and corresponding virus-like particles, *Appl Environ Microbiol*, 77(14):4939-48, 2011.

DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS, FERTILISER MANUAL (RB209), 2011,

EC, 2011, REGULATION (EC) N° 142/2011 COMMISSION REGULATION (EU) No 142/2011 of 25 February 2011.

EMBRAPA, SISTEMA BRASILEIRO DE CLASSIFICAÇÃO DE SOLOS / 3 ed. – Brasília, DF : Embrapa, 353 p., 2013.

ERNEST, C, BORDEN, G, WILLIAM GARY, JR, FREDERICK, AM. Comparison of Agar and Agarose Preparations for Mengovirus Plaque Formation, *Appl Microbiol*. 20(2): 289–291, 1970.

EU, 2002, EU Regulation No 1774/2002: Laying Down Health Rules Concerning Animal By-Products Not Intended for Human Consumption, *Official Journal of the European Communities*, pp, 195, 2002.

EU, 2015. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The state of food and agriculture—innovation in family farming, p, 161, 2014.

GERBA CP, Applied and theoretical aspects of vírus adsorption to surfaces, *Adv Appl Microbiol*, ;30:133-168, 1984.

GERBA C.P, SMITH J.E Jr. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes, *J Environ Qua.* v 34(1):42-8, 2005.

GRIFFITH RW, SCHWARTZ KJ, MEYERHOLZ DK, *Salmonella.*, In: Diseases of Swine. 9<sup>th</sup> Ed.. Eds: Straw. BE. Zimmerman JJ. D'Allaire S. Taylor DJ. Blackwell Publishing. 739-51, 2006..

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO 10715-2:2000. Water Quality – Detection and enumeration of bacteriophages, 2000.

KHETSURIANI N, LAMONTE-FOWLKES A, OBERST S, PALLANSCH MA. Centers for Disease Control and Prevention, Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005, *MMWR. Surveill Summ*, 55(8):1-20, 2006.

KIMURA. M. JIA. ZJ. NAKAYAMA. N. ASAKAWA. S. Ecology of viroses in soils: Past. present and future perspectives. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54:1-32, 2008.

KUNZ A. MIELE M. STEINMETZ RLR. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. *Bioresour Technol.* 100: 5485–9, 2009..

MAGRI, M.E., PHILIPPI, L.S. VINNERÅS, B. Inactivation of pathogens in feces by desiccation and urea treatment for application in

urine-diverting dry toilets. *Appl Environ Microbiol.*, v79 (7), 2156-2163, 2013.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA E ALIMENTAÇÃO (MAPA), Métodos Oficiais de Análisis, Tomo III, Serv, Publ, MAPA Madrid, 1984.

PEPPER, I.L, BROOKS, J.P, GERBA, C.P. Pathogens in biosolids, *Adv, Agron* 90, 141, 2006.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D, COOK, N, RUGGERI, FM, et al. Virus hazards from food, water and other contaminated environments, *FEMS Microbiol Rev.*,36(4):786-814,

SCHIJVEN JF, HASSANIZADEH S. Removal of viruses by soil passage: overview of modeling, processes, and parameters. *Criti Rev Environ Sci Technol.*, v30(1):49-127, 2001.

SCHWARZ, K, SIDHU, JPS, PRITCHARD, D LIY, TOZE, S. *Decay of Salmonella enterica, Escherichia coli* and bacteriophage MS2 on the phyllosphere and stored grains of wheat (*Triticum aestivum*), *Lett, Appl, Microbiol*, 58 (1), 16-24, 2014.

SEMENOV, A. V, VAN OVERBEEK, L, AND VAN BRUGGEN, A, H. Percolation and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in soil amended with contaminated dairy manure or slurry, *Appl, Environ, Microbiol*, v75, 3206–3215, 2007.



TOPP E, SCOTT A, LAPEN DR, LYAUTEY E, DURIEZ P. Livestock waste treatment systems for reducing environmental exposure to hazardous enteric pathogens: Some considerations, *Bior Technol.* 100(22): 5395-5398, 2009.

VENGLOVSKY, J, MARTINEZ, J, & PLACHA, I. Hygienic and ecological risks connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture, *Livestock Science*, 102(3), 197-203, 2006.

WIESMANN U, CHOI I S. Dombrowski E M, *Fundamentals of biological wastewater treatment*, Weinheim: Willey-VCH Verlag GmbH & Co. p,355, 2007.

## 5. SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ O *Capítulo I* demonstrou a ineficiência da biodigestão anaeróbia em BAs do tipo Lagoa Coberta, atuando em escala real, frente à inativação de patógenos entéricos em dejetos suinícolas; O *Capítulo II* por sua vez, mostrou que a remoção dos patógenos entéricos na ETDS esteve condicionada à sedimentação das partículas sólidas; deixando explícita a necessidade de gestão e tratamento secundário do lodo gerado durante o processo;
  
- ✓ O *Capítulo III* mostrou que a estocagem natural em temperaturas de regiões tropicais pode ser utilizada para a higienização do digestato suinícola (efluente e lodo), sendo relevante considerar o TRH em função da condição sanitária do digestato inicial e a estação do ano, devido à variação da temperatura média nessas regiões.
  
- ✓ A fim de acelerar o processo de higienização dos digestatos suinícolas o *Capítulo IV* mostrou que o emprego de alguns aditivos são promissores na aceleração da inativação de patógenos, com exceção dos ovos de *Ascaris* spp. . Ureia, mistura de ureia e casca de ovos, mistura de ureia e  $\text{CaCO}_3$ , e CaO foram aditivos que atuaram eficientemente na inativação de patógenos entéricos. Somente as cinzas não se apresentaram promissoras para tal fim.

- ✓ Os tratamentos contendo ureia foram significativamente mais eficientes na redução de patógenos entéricos virais, bacterianos, sendo que o produto final gerado teve seu valor nutricional valorado para uso agrônômico.
- ✓ Há necessidade de estudar tratamentos e concentrações dos aditivos focando na inativação de ovos de *Ascaris* spp.
- ✓ A aplicação de fertilizantes e derivados em solos dependerá da qualidade sanitária do fertilizante, bem como das características e demandas do solo. O **Capítulo V** apresentou a possibilidade de se avaliar *ex situ*: persistência, percolação e lixiviação de patógenos entéricos em solo fertilizados com digestato suinícola.
- ✓ Solos argilosos seriam mais recomendados que os arenosos para aplicação de digestato suinícola, já que nele há menor estabilidade e lixiviação dos patógenos entéricos.

Por fim, com a prospecção do aumento pela demanda mundial por alimentos o Brasil deverá ampliar em até 80% a produção interna de carne e grãos até 2050 (FAO, 2014). Dessa forma, por um lado haverá demanda por fertilizantes para tal produção (Brasil atualmente já importa cerca de 75% ); Por outro lado haverá intensa produção de dejetos animais, o que poderá suprir totalmente ou parcialmente tal demanda brasileira por fertilizantes. Assim, a presente tese apresenta um possível produto com valor biotecnológico embutido, que leva em consideração a sustentabilidade, sanidade e a gestão dos resíduos gerados na cadeia produtiva de suínos. Esses fatores aqui discutidos

devem estar à frente no planejamento nacional e internacional de produção alimentar, visando segurança sanitária no âmbito “*Saúde Única*”.

## 6. ESTUDO FUTUROS

- ➔ Estudar em escala piloto os tratamentos mais promissores na higienização de fezes frescas de suínos, digestato e lodo ativado da ETDS;
- ➔ Estudar em escala piloto tratamentos com maiores concentrações dos aditivos aqui testados, frente à inativação de *Ascaris* spp.
- ➔ Estudar em escala piloto a eficiência dos possíveis fertilizantes gerados frente ao cultivo de milho e soja;
- ➔ Utilizando os dados gerados nessa tese doutoral, prospectar estudos de análises quantitativas de risco microbiológico em cenários nacionais frente ao reciclo agrícola de dejetos, digestato e água residuária da suinocultura. :



## **7. OUTRAS ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O DOUTORAMENTO**

### **1) Trabalhos publicados em Revistas Internacionais Qualis “A” e “B” na área da Biotecnologia e Biociências:**

**FONGARO, G.;** KUNZ, A.; MAGRI, M.E.; SCHISSI, C.D.; VIANCELLI, A.; PHILIPPI, L.S.; BARARDI, C.R.M. Settling and survival profile of enteric pathogens in the swine effluent for water reuse purpose. International Journal of Hygiene and Environmental Health (Print). , 2016.

**FONGARO, G.;** HERNÁNDEZ, MARTA; GARCÍA-GONZÁLEZ, MARÍA CRUZ; BARARDI, C. R. M.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, DAVID. Propidium Monoazide Coupled with PCR Predicts Infectivity of Enteric Viruses in Swine Manure and Biofertilized Soil. Food and Environmental Virology. , v.XX, p.1 - 7, 2016.

**FONGARO, GISLAINE;** PADILHA, J.; SCHISSI, C. D.; NASCIMENTO, M. A.; BAMPI, G. B.; VIANCELLI, A.; BARARDI, C. R. M. Human and animal enteric virus in groundwater from deep wells, and recreational and network water. Environmental Science and Pollution Research International. , v.01, p.01 - 08, 2015.

**FONGARO, G.;** VIANCELLI, A.; MAGRI, M.E.; ELMAHDY, E.M.; BIESUS, L.L.; KICH, J.D.; KUNZ, A.; BARARDI, C.R.M. Utility of specific biomarkers to assess safety of swine manure for biofertilizing

purposes. *Science of the Total Environment*. , v.479-480, p.277 - 283, 2014.

**FONGARO, GISLAINE**; NASCIMENTO, MARIANA A; RIGOTTO, CAROLINE; RITTERBUSCH, GISELI; DA SILVA, ALESSANDRA D'; ESTEVES, PAULO A; BARARDI, CÉLIA R. Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. *Virology Journal*. , v.10, p.166 - , 2013.

**Colaboradora:**

ELMAHDY, M.E.I.; **FONGARO, G.**; MAGRI, M.E.; PETRUCCIO, M.M; BARARDI, C.R.M. Spatial distribution of enteric viruses and somatic coliphages in a Lagoon used as drinking water source and recreation in Southern Brazil. *International Journal of Hygiene and Environmental Health (Print)*. , 2016.

SILVA, HUGO DELLEON; PESSOA-DE-SOUZA, MARCO AURÉLIO; **FONGARO, GISLAINE**; ANUNCIACÃO, CARLOS E.; SILVEIRA-LACERDA, ELISÂNGELA DE P.; BARARDI, CÉLIA REGINA MONTE; GARCIA-ZAPATA, MARCO TULIO ANTONIO. Behaviour and recovery of human adenovirus from tropical sediment under simulated conditions. *Science of the Total Environment*. , v.530-531, p.314 - 322, 2015.

SILVA, HUGO D.; **FONGARO, GISLAINE**; GARCÍAZAPATA,



MARCO T. A.; MELO, ARTHUR T. O.; SILVEIRA-LACERDA, ELISÂNGELA P.; DE FARIA, KARLA M. S.; ANUNCIACÃO, CARLOS E. High Species C Human Adenovirus Genome Copy Numbers in the Treated Water Supply of a Neotropical Area of the Central-West Region of Brazil. *Food and Environmental Virology.* , v.7, p.1/9 - , 2015.

VIANCELLI, A.; DEUNER, C. W.; RIGO, M.; PADILHA, J.; MARCHESI, J. A. P.; **FONGARO, G.** Microbiological quality and genotoxic potential of surface water located above the Guarani aquifer. *Environmental Earth Sciences (Print).* , v.01, p.15 - , 2015.

VIANCELLI, A.; KUNZ, A.; **FONGARO, G.**; KICH, J. D.; BARARDI, C. R. M.; SUZIN, L. Pathogen Inactivation and the Chemical Removal of Phosphorus from Swine Wastewater. *Water, Air and Soil Pollution (Print).* , v.226, p.226 - 263, 2015.

ELMAHDY, E. M.; **FONGARO, G.**; SCHISSI, C. D.; PETRUCIO, M. M.; BARARDI, C. R. M. Enteric viruses in surface water and sediment samples from the catchment area of Peri Lagoon, Santa Catarina State, Brazil. *Journal of Water and Health.* , v.14, p.142 - 154, 2016.

CESA, M.; FONGARO, G.; BARARDI, C. R. M.. Waterborne diseases classification and relationship with social-environmental factors in Florianopolis city - Southern Brazil. *Journal of Water and Health.* , v.14, p.340 - 348, 2016.

## 2) **Capítulo de livro publicado**

**FONGARO, G.;** MORESCO, V.; GARCIA, L. A. T.; ELMAHDY, E.M.; SOUZA, D; NASCIMENTO, M. A.; PILOTTO, M. R.; BARARDI, CÉLIA R. MOLECULAR AND CELL CULTURE METHODS FOR EVALUATION OF VIRAL CONTAMINATION IN ENVIRONMENTAL SAMPLES USING HUMAN ADENOVIRUSES as Model In: Model.Epidemiology - Theory, Research and Practice.1, 2014, p. 1-.

## 3) **Cursos e Palestras Ministrados**

### **Palestra Ministrada na Fundação Ezequiel Dias:**

Bioprospecção de patógenos entéricos (bactérias e vírus) em águas de distribuição dos municípios de: Ouro Preto, Mariana e Itabirito - MG, 2016

### **Palestra Ministrada no Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto:**

Métodos alternativos e sustentáveis para desinfecção de excretas no âmbito '*Saúde Única*', 2016.

### **Curso Ministrado na CETESB – São Paulo**

Curso Teórico-prático de ICC-RT-qPCR para pesquisa de vírus no ambiente, 2012

### **Curso ministrado na Universidade Federal de Goiás:**

Curso Teórico-Prático intensivo em Métodos Moleculares e de Cultura Celular aplicados no monitoramento de Patógenos Ambientais, 2013.

### **Curso Ministrado na Universidade do Contestado**

Biologia Viral e Técnicas Moleculares e de Cultivo Celular Aplicadas no Diagnóstico de Patógenos Ambientais, 2012.

#### **4) Orientações e Supervisões**

##### **Trabalhos de conclusão de curso de graduação:**

Ana Carolina Baltazar Zeredo. **EFICIÊNCIA DE BIODIGESTORES ANAERÓBIOS PSICROFÍLICOS NA HIGIENIZAÇÃO DE DEJETOS SUINÍCOLAS PARA FINS DE RECICLO AGRÍCOLA.** 2015.

Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina

Co-orientadora: Gislaine Fongaro

Situação: Concluído

Camila Daminelli Schissi. **INATIVAÇÃO DE PATÓGENOS ENTÉRICOS EM DIGESTATO SUINÍCOLA UTILIZANDO ADENOVÍRUS HUMANO COMO MODELO.** 2015.

Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina

Co-orientadora: Gislaine Fongaro

Situação: Concluído

##### **Iniciação científica**

Aurora Paz Vargas. **Estudo de vírus entéricos em águas de mananciais.** 2012. Iniciação científica

Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina

Co-orientadora: Gislaine Fongaro

Situação: Concluído

### **Orientação de outra natureza**

1. Mariana Cristina Zuchi. **Vivência em Pesquisa: Laboratório de Virologia Aplicada**. 2012. Orientação de outra natureza (Abi - Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina.