

110

Circular
TécnicaJuiz de Fora, MG
Setembro, 2015

Autores

Juliana Alves de Resende

Graduação em Farmácia-Bioquímica e doutorado em Ciências Biológicas, UFJF, bolsista de pós-doutorado pela Fapemig na UFJF, Juiz de Fora, MG

Cláudio Galuppo Diniz

Graduação em Ciências Biológicas e Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia), UFMG/East Carolina University, EUA, Professor Associado, UFJF, Juiz de Fora, MG

Vania Lúcia da Silva

Graduação em Ciências Biológicas e Doutorado em Microbiologia, UFMG, Professora Adjunta do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, UFJF, Juiz de Fora, MG

Jailton da Costa Carneiro

Graduado em Zootecnia, Doutorado em Ciências Animal, Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Marlice Teixeira Ribeiro

Graduada em Farmácia e Bioquímica, UFJF, Mestrado em Microbiologia Veterinária, UFRRJ, Especialização em Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, UFJF, Analista da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Júnior Cesar Fernandes Lima

Graduação em Química Licenciatura Bacharelado, UFJF, Analista da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Marcelo Henrique Otenio

Graduado em Farmácia e Bioquímica, Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG



Dejetos bovinos para produção de biogás e biofertilizante por biodigestão anaeróbica

Biodigestão anaeróbica

A digestão anaeróbia é o processo de degradação da matéria orgânica pela ação de micro-organismos, na ausência de oxigênio. Este processo produz dois produtos de grande valor: o biogás (composto principalmente de metano e dióxido de carbono) e um líquido efluente, utilizado comumente como fertilizante, por conter minerais e nutrientes essenciais para solo e planta na agricultura. Atualmente, o processo de biodigestão anaeróbica a partir de dejetos bovinos é a chave para um sistema de produção mais sustentável, devido à redução do uso de energias convencionais, fertilizantes comerciais, além de fornecer um método altamente eficiente para reciclagem de recursos e fechamento do ciclo de produção (ABBASI, TAUSEEF e ABBASI, 2012).

O aumento do uso de fertilizantes inorgânicos em todo o mundo tem sido fundamental para o aumento da produção agrícola. Neste contexto, a substituição deste fertilizante comercial pelos efluentes de biodigestores é extremamente útil, com redução dos custos associados. Apesar disso, o uso correto destes fertilizantes deve ser conduzido corretamente, pois caso os critérios técnicos não sejam seguidos, impactos negativos ao ambiente poderão ocorrer. Já que estes efluentes podem conter micro-organismos potencialmente patogênicos capazes de causar contaminação do solo, das águas e do ar. Neste sentido, para a utilização dos biofertilizantes de biodigestores em sistemas de produção agrícola deverá ser observada a segurança microbiológica para sua aplicação.

Material e métodos

Dois ensaios de biodigestão anaeróbia em dois biodigestores contínuos de escala laboratorial (Figura 1) foram realizados na sede da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG. Estes biorreatores tinham capacidade útil de 60 litros de substrato em fermentação, e foram mantidos em condições naturais de temperatura e ambiente. Os ensaios foram realizados em dois períodos. O primeiro no verão (18 de janeiro de 2012 a 19 de março de 2012) e o outro durante outono/inverno (11 de abril de 2012 a 10 junho de 2012) com tempo de retenção hidráulico (TRH) de 60 dias.

No processo de biodigestão anaeróbia os dejetos utilizados tanto no carregamento inicial (afluente) quanto dos abastecimentos diários (2 L), foram coletados no sistema de produção de leite na fazenda da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco – MG. Os substratos foram preparados a partir da diluição de fezes bovinas frescas com água de lavagem dos pisos (água de reuso) do *free stall*, até teor de sólidos totais de 2 a 3%. As coletas de dejetos foram realizadas semanalmente e armazenadas à – 20 °C para realização das cargas diárias (Figura 2). Volume diário abastecido em cada biodigestor foi de dois litros do substrato e, após cada abastecimento, procedia-se a retirada do efluente na mesma quantidade da carga diária (2 L).

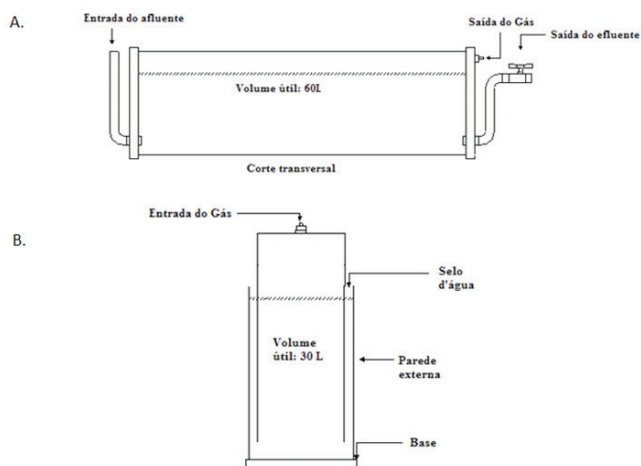


Figura 1. Representação de um dos biodigestores (A) de escala laboratorial e do gasômetro (B) usados para avaliação do processo de digestão anaeróbica, operados a temperatura ambiente.



Figura 2. Preparação do substrato, mistura de fezes bovinas frescas juntamente com água de lavagem dos pisos do free stall, coletadas no campo experimental da Embrapa Gado de Leite.

Para o acompanhamento do processo de biodigestão anaeróbica, o volume de biogás produzido foi quantificado. Assim, o deslocamento vertical do gasômetro foi medido diariamente e multiplicado pela área da seção transversal interna do gasômetro. Após cada leitura os gasômetros foram zerados, utilizando-se o registro de descarga do biogás. A correção do volume de biogás para condições de 1 atm. e 20 °C foi efetuada com base no trabalho de Caetano (1985). Para a correção do volume de biogás, foi utilizado a expressão resultante da combinação das leis de Boyle e Gay-Lussac, sendo que:

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

V_o = volume de biogás corrigido (m_3);

P_o = pressão corrigida do biogás, para 1 atm. (10.332,27 mm de H_2O);

T_o = temperatura corrigida do biogás (293,15 °K);

V_1 = volume do gás no gasômetro;

P_1 = pressão do biogás na leitura (9.621,9239 mm de H_2O);

T_1 = temperatura do biogás (°K) no instante da leitura.

A temperatura do biogás dentro do gasômetro foi monitorada utilizando-se um termômetro digital de haste longa.

As caracterizações microbiológicas dos afluentes (carregamento inicial) e efluentes (biofertilizante) foram realizadas semanalmente. Assim, alíquotas foram processadas para o isolamento de potenciais patógenos humanos de interesse, considerando-se cocos Gram-positivos (CGP) dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, bastonetes Gram-negativos anaeróbios facultativos da família *Enterobacteriaceae* (ENT) e bastonetes Gram-negativos não fermentadores (BGN NF) e anaeróbios estritos. Posteriormente, para a identificação específica dos isolados, foram utilizados kits comerciais BBL *Crystal Gram-Positive Identification System* (Becton, Dickinson and Company, EUA) para CGP, API 20E (BioMerieux®, França) para ENT, API 20NE (BioMerieux®, França) para BGN NF e API 20A *Anaerobe Identification* para os anaeróbios estritos. Os kits foram utilizados conforme instrução do fabricante.

As análises de qualidade do biogás produzido foram realizadas semanalmente para determinação dos teores de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2).

Resultados

As médias de temperatura ambiente e o rendimento médio de metano durante ambas as estações analisadas são apresentados na Figura 3. Durante os dois períodos as temperaturas estavam na faixa mesofílica, entre 14 e 25 °C (média de 19,5 °C) no inverno e entre 24 e 35 °C no verão (média de 29,5 °C). O afluente (esterco bovino e água de reuso) apresentou pequena variação de pH durante as duas estações, entre 6,55 e 6,86, e nos efluentes o pH variou de 6,95 a 7,41 durante todo o estudo. De acordo com os resultados obtidos, não houve efeito da temperatura na produção de biogás. A média diária de biogás produzido nos meses de verão e no inverno foi de 18,7 e 16 L/dia, respectivamente.

Setecentos e noventa e seis ($n = 796$) bactérias foram recuperadas, sendo 67 nos afluentes e 729 nos efluentes. Pelas tabelas 1, 2 e 3 é possível observar a diversidade bacteriana (afluente e efluente) recuperadas no sistema de biodigestão avaliado em ambas as estações.

Enterococos e *Enterobacteriaceae* foram os micro-organismos mais identificados em todas as amostras. Trata-se de micro-organismos

ubíquos e oportunistas. Além disso, eles ocorrem naturalmente no intestino de humanos e animais e são reconhecidos por serem capazes de sobreviver e se multiplicar mesmo em situação de estresse e/ou em ambientes hostis, devido a tolerância a vários fatores, como a mudança de temperatura e pH, exatamente variações que ocorrem nos biodigestores (COSTA et al., 2013). Segundo outros estudos, populações de enterococos e *Enterobacteriaceae* são predominantes em digestores operados em temperaturas tropicais utilizando esterco bovino como substrato (SAWANT et al., 2007). Outras comunidades microbianas (por exemplo, presença de estafilococos coagulase negativo ou BGN NF) podem variar devido às práticas de manejo dos dejetos, condições ambientais e dos tipos de dejetos (SAHLSTRÖM et al., 2004).

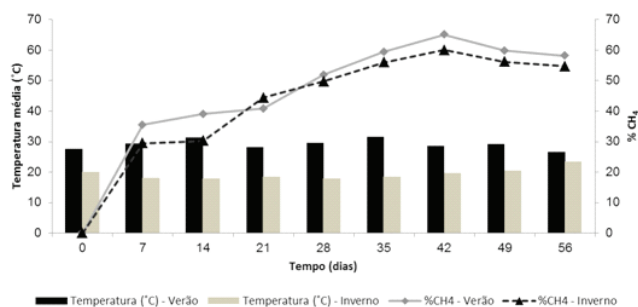


Figura 3. Produção de metano a partir da digestão anaeróbica de dejetos bovinos e temperatura média no dia da coleta em função de padrões sazonais (verão e inverno) e temporais (período de 60 dias de fermentação). Os dados são expressos como a média dos dois biodigestores operados em cada estação.

Ao considerar a utilização dos efluentes da digestão anaeróbica como biofertilizante em solos onde cultivam verduras, frutas ou grãos é importante destacar que, eventualmente, estas bactérias potencialmente patogênicas podem chegar aos humanos e serem causadoras de infecções alimentares. A inativação de patógenos, como os enterococos, enterobactérias e BGN NF oportunistas, como *Pseudomonas* spp. justifica a relevância microbiológica de lidar corretamente com efluentes de digestão anaeróbica. Assim, devem ser levadas em consideração melhorias neste processo de biodigestão, para uma remoção mais eficiente das bactérias patogênicas, como escolha de um sistema de pós-tratamento dos efluentes, por exemplo, as lagoas de estabilização (BERNETA e BÉLINE, 2009).

Vale destacar, que estes resultados mostram os dados da biodigestão anaeróbica em escala laboratorial. No entanto, em biodigestores de escala real espera-se que a recirculação do efluente e seu tempo de manutenção na lagoa de estabilização possa favorecer a inativação ou destruição dos micro-organismos encontrados.

Tabela 1. Espécies bacterianas aeróbias ou anaeróbias facultativas recuperadas de amostras dos afluentes (carregamento inicial) dos biodigestores operados durante verão e inverno.

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

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

Tabela 2. Espécies bacterianas aeróbias ou anaeróbias facultativas recuperadas de amostras dos efluentes (biofertilizante) dos biodigestores operados durante verão e inverno.

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

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

Tabela 3. Espécies bacterianas anaeróbias recuperadas de amostras dos efluentes obtidas dos biodigestores operados durante verão e inverno.

Espécies bacterianas (n) e frequência de identificação das espécies (%)	
Anaeróbias (n = 136)	
<i>Prevotella melaninogenica</i>	17,6
<i>Bacteroides fragilis</i>	16,9
<i>Bacteroides uniformis</i>	13,2
<i>Bacteroides distasonis</i>	8,8
<i>Peptostreptococcus group</i>	8,8
<i>Bacteroides ovatus</i>	7,4
<i>Bacteroides stercoris</i>	7,4
<i>Bacteroides vulgatus</i>	5,9
<i>Bifidobacterium spp.</i>	5,9
<i>Bacteroides caccae</i>	4,4
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,5
<i>Actinomyces meyeri</i>	0,7
<i>Prevotella intermedia</i>	0,7
<i>Propionibacterium spp.</i>	0,7

Considerações finais

A crescente busca por novas fontes alternativas para produção de energia e reciclagem de resíduos aponta para a utilização dos dejetos bovinos como opção economicamente viável dada a relevância da atividade agropecuária no Brasil. Os resíduos gerados pela pecuária são altamente poluentes e questões ambientais sobre sustentabilidade são

levantadas. Neste sentido a digestão anaeróbia destes resíduos promove a reciclagem e a geração de energia. Ainda, em função da natureza das transformações biológicas durante o processo de digestão anaeróbia, o produto final tem potencialidade de uso com biofertilizante.

Do ponto de vista da produção de biogás, nosso estudo mostra que a digestão anaeróbia a

temperatura ambiente, em condições tropicais, utilizando os dejetos bovinos como substrato, é uma tecnologia viável. No entanto questões sobre a sustentabilidade do processo devem ser abordadas dentro de critérios técnicos, o que leva em consideração a distribuição de micro-organismos potencialmente patogênicos. Embora os patógenos putativos humanos e animais sejam importantes para as primeiras etapas do processo de digestão anaeróbica, devida atenção deve ser dada a sua persistência ao longo do processo, sobretudo ao se destacar o uso do produto final como biofertilizante.

Este trabalho abordou a temática da persistência e resistência de micro-organismos em escala laboratorial. Trabalhos posteriores estão sendo conduzidos para acompanhamento em escala real da biodigestão anaeróbica de dejetos bovinos para posterior aplicação do biofertilizante em produção de forragem.

Agradecimentos

CNPq, Fapemig, Embrapa e Capes pelo suporte financeiro e as bolsas de estudo para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências

- ABBASI, T.; TAUSEEF, S. M.; ABBASI, S. A. Anaerobic digestion for global warming control and energy generation - An overview. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 16, n. 5, p. 3228-3242, 2012.
- BERNETA, N.; BÉLINE, F. Challenges and innovations on biological treatment of livestock effluents. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5431-5436, 2009.
- COSTA, P. M.; LOUREIRO, L.; MATOS, A. J. F. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. **International Journal of environmental research and public health**, v. 10, n. 1, p. 278-294, 2013.
- SAHLSTRÖM, L. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. **Bioresource technology**, v. 87, p. 161-166, 2003.
- SAWANT, A. A.; HEGDE, N. V.; STRALEY, B. A.; DONALDSON, S. C.; LOVE, B. C.; KNABEL, S. J.; JAYARAO, B. M. Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, p. 156-163, 2007.

Circular Técnica, 110

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Gado de Leite
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco
Fone: (32)3311-7400
Fax: (32)3311-7401
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente *Pedro Braga Arcuri*
Secretária-Executiva *Inês Maria Rodrigues*
Membros *Jackson Silva e Oliveira, Leônidas Paixão Passos, Alexander Machado Auad, Fernando Cesár Ferraz Lopes, Francisco José da Silva Lédo, Pérsio Sandir D'Oliveira, Denis Teixeira da Rocha, Frank Ângelo Tomita Bruneli, Nívea Maria Vicentini, Letícia Caldas Mendonça, Rosângela Zoccal*

Expediente

Supervisão editorial *Marcelo Henrique Otenio*
Tratamento das ilustrações e editoração eletrônica
Carlos Alberto Medeiros de Moura