

Identificação e perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas na biodigestão anaeróbia de dejetos suínos e bovinos

Identification and profile of antimicrobial sensitivity of bacteria isolated in anaerobic biodigestion of swine and bovine waste

DOI:10.34117/bjdv8n7-029

Recebimento dos originais: 23/05/2022

Aceitação para publicação: 30/06/2022

Soraia Chafia Naback

Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados
Instituição: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Centro
Universitário Presidente Antônio Carlos (UNIPAC)
Endereço: Rua José Lourenço Kelmer, S/N, São Pedro, Juiz de Fora - MG,
CEP: 36036-900
E-mail: soraianaback41@hotmail.com

Álvaro José Fernandes

Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados
Instituição: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Centro
Universitário Presidente Antônio Carlos (UNIPAC)
Endereço: Rua José Lourenço Kelmer, S/N, São Pedro, Juiz de Fora - MG,
CEP: 36036-900
E-mail: alvaro.gerin@embrapa.br

Marlon do Valle Barroso

Mestre em Microbiologia Agrícola
Instituição: Embrapa Gado de Leite, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Endereço: Rua Eugênio do Nascimento, 601, Juiz de Fora, MG, 36038-330, Brasil
E-mail: marlonvalle.bio@hotmail.com

Clérison Wagner Nascimento

Graduado em Farmácia; Mestrando em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados
Instituição: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Centro
Universitário Presidente Antônio Carlos (UNIPAC)
Endereço: Rua José Lourenço Kelmer, S/N, São Pedro, Juiz de Fora - MG,
CEP: 36036-900
E-mail: clerisonwn@gmail.com

Aline Dias Paiva

Doutora em Microbiologia Agrícola
Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro Universidade, Departamento de
Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Endereço: Av. Frei Paulino, 30, Nossa Sra. da Abadia, Uberaba - MG, CEP: 38025-180
E-mail: alinedpaiva@yahoo.com.br

Marta Fonseca Martins

Doutora em Genética e Melhoramento

Instituição: Embrapa Gado de Leite

Endereço: Rua Eugênio do Nascimento, 601, Juiz de Fora - MG, CEP: 36038-330,
Brasil

E-mail: marta.martins@embrapa.br

Marcelo Henrique Otenio

Doutor em Microbiologia Aplicada

Instituição: Embrapa Gado de Leite

Endereço: Rua Eugênio do Nascimento, 601, Juiz de Fora - MG, CEP: 36038-330,
Brasil

E-mail: marcelo.otenio@embrapa.br

RESUMO

Os dejetos animais podem ser utilizados em biodigestores anaeróbicos com intuito de produzir biogás e biofertilizante. Entretanto, a identificação e o conhecimento do perfil de resistência a antimicrobianos da microbiota presente no composto se faz necessário. Microrganismos presentes nas amostras foram identificados genotipicamente pelo sequenciamento do rRNA 16S. O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi determinado pelo método de disco-difusão. Os grupos microbianos encontrados foram os Bacilos Gram Negativos da família *Enterobacteriaceae* e cocos Gram positivos. Quanto a susceptibilidade aos antimicrobianos, para os isolados do gênero *Staphylococcus* a penicilina foi a droga que apresentou o maior índice de resistência (78,9%), seguida da oxacilina (57,9%), sendo a maioria dos isolados (94,7%) sensíveis à combinação de ampicilina-sulbactam e ao levofloxacino (78,9%). Para os isolados do gênero *Enterococcus* os maiores índices de resistência foram detectados para a rifamicina (48%) e eritromicina (32%), com elevada sensibilidade ao levofloxacino (88%) e à vancomicina (80%). As linhagens de *Escherichia coli* avaliadas apresentaram uma alta sensibilidade à amicacina (85,7%) e a maior resistência se deu para o antimicrobiano ampicilina (42,8%). A utilização do biofertilizante gerado deve ser criteriosa devido à persistência de espécies potencialmente patogênicas no efluente final, onde algumas das quais apresentam relevante resistência a antimicrobianos.

Palavras-chave: microbiologia agrícola, dejetos animais, saúde única.

ABSTRACT

Animal waste can be used in anaerobic digesters to produce biogas and biofertilizers. However, the identification and knowledge of the antimicrobial resistance profile of the microbiota present in the compound is necessary. Microorganisms present in the samples were genotypically identified by 16S rRNA sequencing. The antimicrobial susceptibility profile was determined by the disk-diffusion method. The microbial groups found were Gram-negative Bacillus of the *Enterobacteriaceae* family and Gram-positive cocci. As for antimicrobial susceptibility, for the isolates of the *Staphylococcus* genus, penicillin was the drug that presented the highest resistance rate (78.9%), followed by oxacillin (57.9%), with most isolates (94.7 %) sensitive to the combination of ampicillin-sulbactam and levofloxacin (78.9%). For isolates of the *Enterococcus* genus, the highest resistance rates were for rifamycin (48%) and erythromycin (32%), with high sensitivity to levofloxacin (88%) and vancomycin (80%). The *Escherichia coli* strains evaluated showed high sensitivity to amikacin (85.7%) and the highest resistance was to the

antimicrobial ampicillin (42.8%). The use of the generated biofertilizer must be judicious due to the persistence of potentially pathogenic species in the final effluent, where some of which present relevant resistance to antimicrobials.

Keywords: agricultural microbiology, animal waste, unique health.

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura e a suinocultura estão entre as atividades mais lucrativas do agronegócio brasileiro, e o País ocupa posição de destaque no cenário mundial estando entre os principais produtores e exportadores de proteína animal na atualidade (Food and Agriculture Organization of the United Nation, 2020). Embora tais atividades contribuam para o desenvolvimento socioeconômico do país, elas podem gerar problemas ambientais. O setor pecuário está relacionado diretamente com o desmatamento de áreas florestais e são responsáveis por uma das maiores fontes de emissão de gases de efeito estufa na atmosfera, principalmente, através da fermentação entérica e o manejo inadequado de dejetos (Barros, et al., 2017). Além disso, o elevado número de animais nos sistemas de confinamento contribui para o aumento de dejetos que são liberados no ambiente (Kuriqi, 2016).

Dejetos não tratados gerados por bovinos e suínos constituem uma importante fonte poluidora dos recursos naturais, podendo levar a desequilíbrios ambientais e causar agravos à saúde, tanto em humanos quanto em animais (Arango-Osorio et al., 2019). Nas últimas décadas, diversos estudos sobre novas tecnologias referentes ao processo de digestão anaeróbia têm sido realizados. Efetivamente, para manejo adequado de resíduos orgânicos, têm sido empregados biodigestores como uma tecnologia ambientalmente sustentável eficaz e como ferramenta de desenvolvimento na economia circular (Salvador, 2019).

Um dos principais produtos da biodigestão anaeróbia de dejetos animais é o biogás, uma fonte de energia renovável, constituído por uma mistura de gás metano (65-70%), dióxido de carbono (30-35%) (Arango-Osorio et al., 2019). O biogás pode ser utilizado em diferentes sistemas, como combustível para geração de energia elétrica, no funcionamento de motores e na geração de energia térmica, representando um ganho econômico para o produtor (Kreusch et al., 2018).

Além da produção do biogás, o resíduo da biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos e suínos podem ser utilizados como biofertilizante. Dessa forma, os dejetos que

antes constituía-se como uma importante fonte de contaminação ambiental pode se tornar um recurso que auxilia no desenvolvimento da sustentabilidade da produção agropecuária, diminuindo os danos causados pela produção animal ao meio ambiente (Kunz, 2015). No entanto, tal finalidade requer a utilização de dejetos tratados devido possibilidade de presença de bactérias patogênicas que apresentam resistência a múltiplos antibióticos com poder de contaminar o solo e se transformar num fator complicador para a destinação deste resíduo (Amador et al., 2019).

O uso excessivo de antibióticos terapêutico e subterapêutico na produção animal tem contribuído para a seleção de microrganismos resistentes (Roushan, 2018) tornando necessário identificar a população bacteriana presente nos dejetos de suínos e bovinos, assim como traçar o perfil fenotípico de resistência desses microrganismos, avaliando o risco microbiológico dos mesmos na sua aplicação no solo.

Este trabalho avalia a biodigestão anaeróbia como processo de tratamento de dejetos suínos e dejetos bovinos, avaliando microbiologicamente a presença de microrganismos, determinando nesses isolados a sensibilidade a antimicrobianos, com interesse para saúde única.

2 METODOLOGIA

2.1 COLETA DE AMOSTRAS E ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os experimentos foram realizados em dois períodos, inverno e verão, no ano de 2014. Os dejetos de bovinos e suínos foram coletados no Instituto Federal Sudeste de Minas, no departamento de Zootecnia em Rio Pomba, Minas Gerais, Brasil. Os dejetos foram acondicionados em tambor plástico revestido internamente com saco plástico e transportados até a sede da Embrapa gado de Leite em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Foram diluídos em água e peneirados para homogeneização, remoção de sólidos grosseiros e obtenção de 6% de sólidos.

Foram utilizados oito biodigestores, mantidos ao ar livre. Quatro desses biodigestores foram abastecidos com dejetos de bovinos e quatro com dejetos de suínos, e operados durante 60 dias. O efluente dos oito biodigestores foi coletado nos tempos 30, 45 e 60 dias. A determinação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) nos afluentes e efluentes foi realizada a partir da incubação das amostras sob agitação, por 5 dias a 20 °C (APHA, 2005). Para a determinação da demanda química de oxigênio (DQO) as amostras foram aquecidas em Termo Reator a 150 °C, por 2h, e a leitura foi realizada em Fotômetro Multiparâmetro (APHA, 2005).

Sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV) nos afluentes e efluentes também foram determinados. Ainda alcalinidade foi determinada por titulometria com ácido sulfúrico (1N) e a acidez foi determinada por titulação com hidróxido de sódio (1N), segundo as normas APHA (2005). A temperatura dos biodigestores durante o processo fermentativo foi determinada utilizando o equipamento Data Logger ONSET® e o volume de gás produzido foi determinado com uso de um gasômetro.

2.2 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Para isolamento de enterobactérias e bastonetes Gram-negativos não fermentadores foi utilizado meio Eosina Azul de Metileno (EMB) (HiMedia Laboratories, West Chester, PA, Estados Unidos). Para isolamento de cocos Gram-positivos catalase positiva (CGP/C+) foi utilizado meio manitol (MAN) (HiMedia Laboratories, West Chester, PA, Estados Unidos) e cocos Gram-positivos catalase negativa foram em meio bile esculina (BE) (HiMedia Laboratories, West Chester, PA, Estados Unidos). Foi coletado 1 mL de amostra foram transferidos para tubos contendo 9 mL de salina (0,9%). Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas (10^{-3} a 10^{-6}) e alíquotas de 100 μ L foram plaqueadas em duplicadas usando a técnica de *spread plate*, em seguida, foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o crescimento, com o auxílio de um contador de colônias (Pholenix) foi realizado a enumeração das colônias e as que apresentaram características fenotípicas diferentes foram isoladas para ensaios posteriores e armazenados no banco de microrganismos da Embrapa Gado de Leite.

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

A extração de DNA dos isolados foi realizada utilizando o Kit Dneazy^(R) (Quiagen, Hildem, Alemanha). Para a quantificação do DNA foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific) e as amostras foram diluídas (20 ng/ μ L) para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação de PCR foi realizada utilizando os *primers* universais 27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) e 907R (CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 μ L, utilizando-se 9,0 μ L de água milli-Q, 12,5 μ L de GoTaq Master Mix 2x, 0,75 μ L de *primer* F (10 μ M), 0,75 μ L de *primer* R (10 μ M) e 2,0 μ L de DNA (20ng/ μ L). A reação da PCR foi realizada em termociclador Gene Amp^{*} PCR System 9700, utilizando as seguintes condições: temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação,

58°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C por 1 minuto para a extensão dos *primers*. O ciclo de amplificação foi seguido por uma extensão final a 72°C por 7 minutos e os tubos foram mantidos sob refrigeração à 4°C. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%), o gel foi corado com brometo de etídio (0,2 µg/mL) e fotodocumentado sob luz ultravioleta.

O sequenciamento dos produtos de PCR foi feito pela empresa ACT Gene Análises utilizando o sequenciador automático *AB 3500 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP 7 (Applied Biosystems). Todas as sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI) e o alinhamento das sequências foi realizado usando o Algoritmo da ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local para nucleotídeos (BLASTn) (Altschul *et al.* 1990). Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS).

2.4 PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

A avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi feita pelo método de disco-difusão, seguindo recomendações do CLSI (2012). Para os cocos Gram-positivos foi avaliada a sensibilidade aos seguintes antimicrobianos: oxacilina (10 µg/mL), vancomicina (30 µg/mL), levofloxacino (5 µg/mL), rifamicina (5 µg/mL), penicilina (10 µg/mL), eritromicina (15 µg/mL) e ampicilina/sulbactam (20 µg/mL), enquanto para os Gram-negativos foram utilizados os antimicrobianos gentamicina 10 (µg/mL), levofloxacino (5 µg/mL), ampicilina (10 µg/mL), cefepime (30 µg/mL), ampicilina/sulbactam (20 µg/mL), amicacina (30 µg/mL), piperaciclina/tazobactam (110 µg/mL) e meropenem 10 (µg/mL). Os halos ao redor dos discos contendo antimicrobianos foram aferidos com o auxílio de um paquímetro e os resultados foram analisados conforme as recomendações descritas pelo CLSI (2012).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da produção de biogás foram analisados pelo programa SISVAR-UFLA (Ferreira 2003) e comparados pelo teste T LSD para comparação das médias. As taxas de frequência para a susceptibilidade aos antimicrobianos foram calculadas pelo procedimento FREQ do SAS Windows (2001) e o nível de significância dos testes foram de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PRODUÇÃO DE BIOGÁS.

Os resultados obtidos ao final dos 60 dias de TRH refletem o comportamento dos dejetos durante a biodigestão anaeróbia. Para os dois dejetos estudados o pH manteve-se moderadamente ácido durante as duas estações. Entretanto, os dejetos de suínos coletados no inverno apresentaram uma maior variação da acidez volátil quando comparado aos dejetos de bovinos, enquanto no verão essa variação foi maior para os dejetos de bovinos. Referente à alcalinidade, ambas as estações avaliadas, os dejetos de bovinos apresentaram aumento quando comparado aos dejetos de suínos (tabela 1).

Tabela 1: Perfil dos parâmetros físico-químicos pH, acidez e alcalinidade, em mg/L, nas amostras de afluente e efluente durante o processo de biodigestão dos dejetos bovinos e suínos, com variação sazonal.

Parâmetros	Ponto de Coleta	Inverno		Verão	
		Bovino	Suíno	Bovino	Suíno
pH	Afluente	6,7	6,77	6,96	6,73
	Efluente	6,35	6,26	6,26	6,26
Acidez	Afluente	639	828	300	820
	Efluente	962	1661	1569	1868
Alcalinidade	Afluente	6532	7763	5453	7590
	Efluente	6868	8061	6438	8227

No período de inverno, a DBO dos dejetos de suínos apresentou uma maior redução quando comparada à DBO dos dejetos de bovinos, enquanto no verão foi observado o inverso (maior redução na DBO para os dejetos de bovinos). Já no que se refere à DQO foi observada maior redução para os dejetos de bovinos no inverno, enquanto no verão os dejetos de suínos apresentaram maior redução. Em relação aos teores de sólidos totais e voláteis, os resultados mostram redução do valor do afluente para o efluente nas duas estações do ano para ambos os tratamentos (tabela 2).

Tabela 2: DBO, DQO, sólidos totais e sólidos voláteis, nas amostras de afluente e efluente durante o processo de biodigestão dos dejetos bovinos e suínos, com variação sazonal.

Parâmetros	Ponto de Coleta	Inverno		Verão	
		Bovino	Suíno	Bovino	Suíno
DBO mg/L	Afluente	16875	23775	21325	24700
	Efluente	13118	16112	9593	14925
DQO mg/L	Afluente	93150	33500	133850	176000
	Efluente	42437	23050	38850	52462
Sólidos Totais mg/L	Afluente	54	43	56	68
	Efluente	43,45	33,25	46,25	35,5
Sólidos Voláteis mg/L	Afluente	40	42	44	47
	Efluente	32,35	24,75	36	27,5

Os bovinos em geral são alimentados com alimentos de origem fibrosa (volumoso), e produzem dejetos ricos em componentes fibrosos, acarretando uma produção mais lenta de biogás. A produção volumétrica de metano é influenciada pela concentração de sólidos voláteis. Segundo Yadvika (2004), o valor de sólidos totais muito alto ou muito baixo nos dejetos podem inibir o processo de fermentação prejudicando a produção de biogás.

As temperaturas internas dos biodigestores apresentaram valores máximos de 27,8°C no verão e de 13,7°C no inverno. Ao longo das cinco primeiras semanas, a produção de biogás utilizando dejetos de bovinos não apresentou diferença significativa nas duas estações do ano avaliadas ($p < 0,05$). Já na 6ª semana houve diferença significativa com um aumento na produção de biogás no verão. A produção de biogás utilizando dejetos de suínos foi a mesma ao longo das semanas 1, 2, 4, 5 e 6, tanto no verão como no inverno, sendo observada diferença estatisticamente significativa somente durante a 3ª semana de produção do biogás. Portanto, os dejetos de bovinos apresentaram maior variação na produção de biogás que os dejetos de suínos, que mantiveram sua produção mais constante independente da estação do ano (tabela 3).

Tabela 3: Volume de biogás produzido (em m³) utilizando dejetos bovinos e suínos, nos períodos de inverno e verão

Semanas	INVERNO		VERÃO	
	BOVINO	SUÍNO	BOVINO	SUÍNO
I	0,011750 a A	0,026500 a A	0,016333 a A	0,030250 a A
II	0,005750 a A	0,041500 a A	0,017500 a A	0,038000 a AB
III	0,004250 a A	0,085000 b B	0,039000 a AB	0,039500 a AB
IV	0,008500 a A	0,056750 b AB	0,057000 a B	0,063000 a AB
V	0,006000 a A	0,038750 a A	0,064333 a B	0,067500 a B
VI	0,014000 a A	0,053250 b AB	0,107125 b C	0,061750 a AB

*linhas horizontais com letras minúsculas a comparação entre os dejetos dentro da mesma semana, e nas linhas verticais com letras maiúsculas a comparação das semanas dentro do mesmo dejetos.

3.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Ao todo, 50 isolados sendo 33 provenientes de dejetos de suínos e 17 de dejetos bovinos tiveram o sequenciamento do gene rRnA 16S, incluindo cocos Gram-positivos (n=43), bacilos Gram-positivos (n=4) e bacilo Gram-negativos (n=3). Dentre os cocos Gram-positivos foram identificados 4 gêneros e 10 espécies distintas, sendo mais prevalente o gênero *Enterococcus* e, dentre as espécies, *Enterococcus faecium* (n=21).

Esses resultados levam ao resultado final semelhante aos encontrados por Macedo, et al. (2020), que destaca o risco da prevalência e persistência na dispersão da resistência aos antimicrobianos. O predomínio de *Enterococcus* e enterobactérias também

foi reportado em outros biodigestores abastecidos com dejetos bovinos (Resende, et al., 2015). Alguns fatores contribuem para o predomínio dos gêneros *Enterococcus* e membros da família *Enterobacteriaceae* em efluentes de biodigestores. Isso se deve ao fato desses microrganismos habitarem o trato gastrointestinal de mamíferos e dessa forma eles são eliminados através de suas fezes. Além disso, eles apresentam maior capacidade de sobreviver em ambientes desfavoráveis, facilidade de metabolizar diversos substratos e de rápida proliferação em vários tipos de ambientes (Singh et al., 2017; Sandberg et al., 2016). Diversos estudos têm relatado a presença de *Escherichia coli* resistentes a diversos antibióticos (multirresistentes) isoladas dos dejetos de animais e de efluentes de sistemas de tratamento com digestão anaeróbia (Turbett et al., 2019; Branco et al., 2018; Manyi-Loh et al., 2019).

As populações bacterianas podem variar em virtude do tipo e manejo dos dejetos bem como as condições do ambiente (Leite et al., 2017). *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp. sobrevivem às etapas de biodigestão anaeróbia, podendo ser disseminados pela aplicação dos efluentes dos biodigestores (Palmer et al., 2019). Estudos tem relatado a presença de *Clostridium botulinum* nos dejetos de animais utilizados para alimentar os biodigestores, que posteriormente, foi relacionado com a propagação desses patógenos pelos efluentes (Bagge et al., 2005; Markou et al., 2018).

A prevalência bacteriana é de suma importância quando há a utilização do efluente dos biodigestores em fertirrigação, onde estes microrganismos serão lançados no ambiente e deverão interagir com a microbiota do solo. Dentre as enterobactérias isoladas e sequenciadas neste estudo, destaca-se a presença de *Escherichia coli* (n=1), *Shigella flexneri* (n=1) e *Escherichia* sp (n=1). (Tabela 4).

Tabela 4: Identificação molecular dos isolados bacterianos selecionados.

Tipo de dejetos	Amostra	Identificação molecular	Identidade	Número de acesso
Suíno	SCP 001F	<i>Enterococcus hirae</i>	86%	KX752873.1
	SCP 005F	<i>Enterococcus faecium</i>	81%	KX185054.1
	SCP 006F	<i>Enterococcus faecium</i>	82%	KP261836.1
	SCP 007F	<i>Enterococcus faecium</i>	86%	KP261836.1
	SCP 008F	<i>Enterococcus faecium</i>	85%	KP261836.1
	SCP 011F	<i>Enterococcus faecium</i>	88%	KP261836.1
	SCP 012F	<i>Enterococcus faecium</i>	79%	KU324893.1
	SCP 013F	<i>Arthrobacter</i> sp	83%	KU363017.1
	SCP 021F	<i>Enterococcus faecium</i>	86%	KP261836.1
	SCP 023F	<i>Staphylococcus lentus</i>	67%	JX415369.1
	SCP 024F	<i>Enterococcus faecium</i>	82%	KP261836.1
	SCP 032F	<i>Enterococcus faecium</i>	83%	KP261836.1
	SCP 036F	<i>Enterococcus faecium</i>	86%	KP261836.1
	SCP 046F	<i>Enterococcus hirae</i>	81%	KM016947.1

	SCP 047F	<i>Enterococcus faecium</i>	82%	JX847619.1
	SCP 050F	<i>Enterococcus faecium</i>	83%	KP261836.1
	SCP 054F	<i>Enterococcus</i> sp	84%	AB682475.1
	SCP 086F	<i>Staphylococcus simulans</i>	82%	KP202162.1
	SCP 087F	<i>Staphylococcus simulans</i>	81%	KX348374.1
	SCP 090F	<i>Clostridium bifermentans</i>	77%	KT633853.1
	SCP 092F	<i>Clostridium bifermentans</i>	85%	KT598254.1
	SBN 124F	<i>Enterococcus</i> sp	82%	KF621060.1
	SBN 132F	<i>Enterococcus faecium</i>	83%	KP261836.1
	SBN 135F	<i>Enterococcus hirae</i>	76%	KT261027.1
	SBN 137F	<i>Shigella flexneri</i>	83%	LC090480.1
	SBN 140F	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	100%	KF668024.1
	SBN 150F	<i>Escherichia coli</i>	86%	KX443706.1
	SBN 152F	<i>Enterococcus faecium</i>	83%	KP261836.1
	SCP154F	<i>Enterococcus faecium</i>	83%	KT368999.1
	SCP 155F	<i>Enterococcus faecalis</i>	81%	JQ411244.1
	SCP 157F	<i>Enterococcus hirae</i>	84%	KM016947.1
	SBN 158F	<i>Enterococcus faecalis</i>	85%	JX536109.1
	SCP 163F	<i>Enterococcus faecium</i>	83%	KP261836.1
Bovino	BCP002F	<i>Aerococcus</i> sp	84%	KC978874.1
	BCP009F	<i>Staphylococcus aureus</i>	85%	JF168897.1
	BCP 018F	<i>Enterococcus faecium</i>	84%	KP261836.1
	BCP 019F	<i>Enterococcus faecium</i>	85%	KP261836.1
	BCP 027F	<i>Staphylococcus</i> sp	82%	JN411552.1
	BCP 039F	<i>Bacillus licheniformis</i>	85%	HQ911359.1
	BCP 052F	<i>Aerococcus</i> sp	89%	HQ433478.1
	BCP 071F	<i>Enterococcus pseudoavium</i>	83%	KU311979.1
	BCP 076F	<i>Escherichia</i> sp	80%	JN221546.1
	BCP 079F	<i>Enterococcus faecium</i>	84%	KP261836.1
	BCP 081F	<i>Enterococcus faecium</i>	82%	KP261836.1
	BCP 083F	<i>Enterococcus faecium</i>	85%	KP261836.1
	BCP 084F	<i>Aerococcus</i> sp	84%	HQ433478.1
	BCP 102F	<i>Clostridium bifermentans</i>	84%	KT598254.1
	BBN 142F	<i>Enterococcus faecalis</i>	85%	KC510232.1
	BBN 145F	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	73%	KC545902.1
	BBN 167F	<i>Enterococcus hirae</i>	76%	KM016947.1

3.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE DOS ISOLADOS

Para a análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foram selecionados 31 isolados (21 provenientes de dejetos suínos e 10 de dejetos bovinos; 26 isolados no período do inverno e 5 no período do verão). Dos 31 isolados, 25 (80,6%) foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Os cocos Gram-positivos (n=29) apresentaram maior resistência à penicilina (41,3%), seguido por rifamicina (24,13%). Os antimicrobianos levofloxacino e vancomicina foram os mais eficazes, apresentando taxas de sensibilidade de 86,2% e 72,4%, respectivamente (tabela 5a).

Em relação ao gênero *Enterococcus*, 72,7% das linhagens foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados. Tal condição pode ser explicada pela resistência intrínseca a alguns antimicrobianos presentes nesses microrganismos e também à capacidade de aquisição de genes de resistência a diferentes antimicrobianos (Faron et al., 2016). Para a espécie *Enterococcus faecium*, considerada a mais prevalente dentre as

bactérias avaliadas, a maior taxa de resistência foi observada para a penicilina (23,5%), seguida da eritromicina e rifamicina (17,6%). A maior taxa de sensibilidade foi observada para vancomicina (94,11%), seguida de levofloxacino (82,35%).

A elevada resistência aos β -lactâmicos observada em *Enterococcus* deve se a presença de proteínas de ligação à penicilina de baixa afinidade juntamente com a aquisição de genes resistência através da transferência horizontal de genes. Já a resistência intrínseca a antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos é devido à baixa capacidade do antimicrobiano penetrar pela parede celular bacteriana (Menon et al., 2018; Miller et al., 2016; Peyvasti et al., 2019) (tabela 5c).

O isolado identificado como *Shigella flexineri* apresentou resistência à ampicilina e também à combinação de ampicilina/sulbactam, sendo que resistência intermediária foi observada para gentamicina. Para o isolado identificado como *Escherichia coli* foi evidenciada resistência somente ao antimicrobiano amicacina (tabela 5b).

Tabela 5a: Perfil de susceptibilidade a antibióticos dos isolados cocos gram positivos obtidos a partir de dejetos de bovinos.

Isolado	VAN	OXA	LVX	PEN	ERI	RIF	ASB
<i>Aerococcus sp</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Staphylococcus aureus</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Staphylococcus sp</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Staphylococcus lentus</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■

■ Sensível ■ Resistente ■ Intermediário ■ Não determinado; VAN: Vancomicina; OXA: Oxaciclina; LVX: Levofloxacino PEN: Penicilina; ERI: Eritromicina; RIF: Rifampicina; ASB: Ampicilina + Sulbactam.

Tabela 5b: Perfil de susceptibilidade a antibióticos dos isolados bacilos gram negativos obtidos a partir de dejetos de suínos.

Isolado	GEN	LVX	AMP	CPM	AMI	PPT	ASB	MER
<i>Shigella flexineri</i>	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Escherichia coli</i>	■	■	■	■	■	■	■	■

■ Sensível ■ Resistente ■ Intermediário ■ não determinado; GEN: Gentamicina; LVX: Levofloxacino; AMP: Ampicilina; CPM: Cefepime; AMI: Amicacina; PPT: Piperaciclina + Tazobactam; ASB: Ampicilina + Sulbactam; MER: Meropenem.

Tabela 5c: Perfil de susceptibilidade a antibióticos dos isolados cocos gram positivos obtidos a partir de dejetos de suínos.

Isolado	VAN	OXA	LVX	PEN	ERI	RIF	ASB
<i>Arthrobacter sp.</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Staphylococcus simulans</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Staphylococcus simulans</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus hirae</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus sp.</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecalis</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus hirae</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Enterococcus faecium</i>	■	■	■	■	■	■	■

■ Sensível ■ Resistente ■ Intermediário ■ Não determinado; VAN: Vancomicina; OXA: Oxaciclina; LVX: Levofloxacino PEN: Penicilina; ERI: Eritromicina; RIF: Rifampicina; ASB: Ampicilina + Sulbactam.

O crescente consumo de proteína animal tem levado ao aumento específico da produção da carne dos suínos e do leite bovino para atendimento aos mercados emergentes. Este aumento de produção decorre dos sistemas de criação em confinamento que também concentram a geração dos resíduos. Em se tratando de saúde única, onde além dos cuidados na criação dos animais e da sua relação com a saúde humana deve-se atentar para as questões da contaminação ambiental, esta questão é fator determinante (Spratt, E. et al., 2021). Além disso, é importante destacar a questão do uso indiscriminado de antibióticos, que foram amplamente utilizados na cadeia produtiva animal e que hoje tem se tentado desabonar o produtor e os técnicos quanto a sua utilização desmedida.

Neste contexto, diversos estudos têm debatido sobre como o uso de antibióticos na produção animal pode contribuir na seleção de bactérias patogênicas multirresistentes (Fang et al. 2018; Burow et al. 2019). Resende e colaboradores (2014), analisando o perfil de sensibilidade de linhagens bacterianas isoladas de biodigestores operados com dejetos bovinos, observaram que dentre os cocos Gram-positivos a maior resistência foi observada para penicilina, de modo similar ao observado neste presente estudo.

A presença de bactérias resistentes a antibióticos oriundas de dejetos de animais também tem sido reportada em outros trabalhos. Em um estudo realizado por Adesoji e colaboradores (2016), ao avaliarem linhagens bacterianas isoladas de fezes de abatedouros de animais, reportaram elevada resistência a vários antimicrobianos, incluindo amoxicilina.

Assim como observado em nosso estudo, a elevada resistência a estes antimicrobianos pode estar relacionada ao histórico de uso desses antibióticos no manejo e a produção animal (Pereira et al., 2016; Pfeifer et al. 2010). Este uso contribui para a seleção de microrganismos naturalmente resistentes (intrínsecos) e por resistência adquirida no ambiente, ou por linhagens presentes nas fezes dos animais. Além disso, a presença de concentrações baixas de resíduos de antibióticos presentes no esterco pode contribuir na seleção de bactérias resistentes a antibióticos (Fogolari, O. et al., 2018; Pereira et al., 2016).

4 CONCLUSÃO

A utilização de dejetos de suínos e bovinos como biofertilizantes deve atender a princípios, que compreendem a obrigatoriedade de tratamento dos dejetos, visando a redução do número de patógenos como, por exemplo, através da biodigestão anaeróbia para uma garantia da qualidade microbiológica dos mesmos. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, fica evidente a presença de bactérias resistentes a antimicrobianos nos dejetos animais, tanto suínos como bovinos, mesmo após o tratamento com biodigestão anaeróbia. Dessa forma, o uso desses dejetos no processo de adubação deve ser feito com cautela.

REFERÊNCIAS

Adesoji AT, Abubakar F and Ipinlaye JS. (2016). Occurrence of Antibiotic Resistant Bacteria in Faeces from Abattoir Waste, Processing Water and Products from Dutsin-Ma, Katsina State, Nigeria. *Journal of Bacteriology and Mycology*. 3(1), 1-6. ID:1022. ISSN: 2471-0172

APHA (2005), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed. Washington DC: American Public Health Association.

Amador, P., Fernandes, R., Prudêncio, C., & Duarte, I. (2019). Prevalence of Antibiotic Resistance Genes in Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae on Portuguese Livestock Manure. *Antibiotics*, 8(1), 23. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8010023>

Amaral, C. M. C. et al. (2004). Biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros submetidos a diferentes tempos de retenção hidráulica. *Ciência Rural*, 34(6), 1897-1902. <https://www.scielo.br/j/cr/a/mQzHtkZ3CQpT7NcHsmnvB6C/?format=pdf&lang=pt>

Arango-Osorio, S., Vasco-Echeverri, O., López-Jiménez, G., González-Sánchez, J., & Isaac-Millán, I. (2019). Methodology for the design and economic assessment of anaerobic digestion plants to produce energy and biofertilizer from livestock waste. *Science of the total environment*, 685, 1169-1180. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.015>

Bagge, E., Persson, M., & Johansson, K. E. (2010). Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), 1549-1565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04790.x>

Bagge, E., Sahlström, L., & Albiñ, A. (2005). The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Research*, 39(20), 4879-4886. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.03.016>

Barros, J. P., de Paula, L. C., Oliveira, N. C., Oliveira, E. M. B., Ribeiro, J. C., Cezario, A. S., de Souza, C. M; Pedroso, L. B. (2017). Produção animal e os impactos ao meio ambiente. *Colloquium Agrariae*, 13 (especial-jan-jun), 381-390. <https://doi.org/10.5747/ca.2017.v13.nesp.000242>

Branco, P. M. P., Fernandes, A., Cangani, M. T., Souza-Pollo, A., Júnior. J. L., Amaral, L. A. (2018). Effects of sugarcane juice addition on the population dynamics of *Escherichia coli* and the presence of Shiga-toxigenic *E. coli* during the anaerobic codigestion of dairy cattle manure. *Ciência Rural*, 48 (3), 1-8, e20170382. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000600035>

Burow, E., Rostalskib, A., Harliziusc, J., Ganglb, A. Simoneita, C., Kollasa, C., Tenhagena, B., Käsbohrrera, A. (2019). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment. *Preventive Veterinary Medicine*, 165 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.02.008>

Cetinkaya, Y., Falk, P., & Mayhall, C. G. (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 686-707. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.686>

Chae, K. J., Jang, A. M., Yim, S. K., & Kim, I. S. (2008). The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. *Bioresource technology*, 99(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.063>

CLSI. (2012). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard. *CLSI document M11-A8*. Disponível em: https://clsi.org/media/1468/m11a8_sample.pdf, acessado em: 28/04/2022.

Da Costa, P. M., Loureiro, L., & Matos, A. J. (2013). Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *International journal of environmental research and public health*, 10(1), 278-294. <https://doi.org/10.3390/ijerph10010278>

Esiobu, N., Armenta, L., & Ike, J. (2002). Antibiotic resistance in soil and water environments. *International Journal of Environmental Health Research*, 12(2), 133-144. <https://doi.org/10.1080/09603120220129292>

Fang, H. et al. (2018). Dissemination of antibiotic resistance genes and human pathogenic bacteria from a pig feedlot to the surrounding stream and agricultural soils. *Journal of hazardous materials*, 357, 53-62. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.05.066>

Faron, M. L., Ledebor, N. A., & Buchan, B. W. (2016). Resistance mechanisms, epidemiology, and approaches to screening for vancomycin-resistant *Enterococcus* in the health care setting. *Journal of clinical microbiology*, 54(10), 2436-2447. <https://doi.org/10.1128/JCM.00211-16>

Food and Agriculture Organization of the United Nation. (2020). Statistic FAO Crops and livestock products. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>

Fedorka-Cray, P. J. et al., (1999). National antimicrobial Resistance Monitoring System: Results for Swine. 3, 248-249 <https://doi.org/10.31274/safepork-180809-1014>.

FERREIRA, D. F. (2003). Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows, Versão 4.2. Lavras: DEX/UFLA.

Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6), 1749-1757. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>

Fogolari, O., Magri, M. E., & Philippi, L. S. (2018). Sanitisation of sewage sludge in a solar heated reactor: inactivation of total coliforms and *Escherichia coli*. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 23(1), 91-100. <https://doi.org/10.1590/S1413-4152201875680>

Foley, J. A. et al., (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478(7369), 337-342. <https://doi.org/10.1038/nature10452>

García-Feliz, C. et al., (2007). Salmonella enterica infections in Spanish swine fattening units. *Zoonoses and Public Health*, 54(8), 294-300. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01065.x>

Kreusch, R. C. et, al., (2018). Produção de biogás obtida por dejetos suínos com suplementação de glicerol e óleo vegetal residual. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 9(3), 251-263. <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2018.003.0020>

Kunz, A., Higarashi, M. M., & Oliveira, P. A. (2015). Technologies for management and treatment of hog manure assessed by research institutions in Brazil. *Cadernos de Ciências e Tecnologia*, 22(3), 651-665. <https://doi.org/10.1590/S0100-69162014000500004>

Kuriqi, A., Kuriqi, I., & Poci, E. (2016). Simulink programing for dynamic modelling of activated sludge process: aerator and settler tank case. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25(8), 2891-2899. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20163304430>

Leite, M. A., Pan, Y., Bolem, J., Berge, H. T., Kuramae, E. E. (2017). Organic nitrogen rearranges both structure and activity of the soilborne microbial seedbank. *Scientific Reports*, 7 ID: 42634, 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep42634>

Liew, L. N., Shi, J., & Li, Y. (2012). Methane production from solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Biomass and Bioenergy*, 46, 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.014>

Macedo, G., Leal, L. H., Mass, P. V. D., Heederik, D., Mevius, D., Schmitt, H. (2020). The impact of manure and soil texture on antimicrobial resistance gene levels in farmlands and adjacent ditches. *Science of the Total Environment* 737, 139563. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139563>

Mach, N. et al., (2015). Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environmental microbiology reports*, 7(3), 554-569. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12285>

Manyi-Loh, C. E., Mamphweli, S. N., Meyer, E. L., & Okoh, A. I. (2019). Microbial anaerobic digestion: process dynamics and implications from the renewable energy, environmental and agronomy perspectives. *International journal of environmental science and technology*, 16(7), 3913-3934. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02380-w>
Markou, G., Wang, L., Ye, J., & Unc, A. (2018). Using agro-industrial wastes for the cultivation of microalgae and duckweeds: Contamination risks and biomass safety concerns. *Biotechnology advances*, 36(4), 1238-1254 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.003>

Masse, D. I., Masse, L., Hince, J. F., & Pomar, C. (2008). Psychrophilic anaerobic digestion biotechnology for swine mortality disposal. *Bioresour technology*, 99(15), 7307-7311. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.076>

Menon, V. et al., (2018). Failure of daptomycin β -Lactam combination therapy to prevent resistance emergence in Enterococcus faecium. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 90(2), 120-122. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.10.017>

Miller, W. R., Murray, B. E. Rice, L. B., Arias, C. A. (2016). Vancomycin-Resistant Enterococci Therapeutic Challenges in the 21st Century. *Infectious Disease Clinics North America*, 30(2), 415-439. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.006>

Møller, H. B., Sommer, S. G., & Ahring, B. K. (2004). Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass and bioenergy*, 26(5), 485-495. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.08.008>

Oliveira, P. A. V. (2004). Tecnologias para o Manejo de Resíduos na Produção de Suínos. *Manual de Boas Práticas. Embrapa Aves e Suínos. Concórdia*.

Disponível

em:

http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_n3r85f3h.pdf,

Acessado em: 28/04/2022.

Palmer, J. S., Hough, R. L., West, H. M., & Avery, L. M. (2019). A review of the abundance, behaviour and detection of clostridial pathogens in agricultural soils. *European Journal of Soil Science*, 70(4), 911-929. <https://doi.org/10.1111/ejss.12847>

Pereira, P. A. M., Sampaio, S. C., Reis, R. R., Rosa D. M., Correa, M. M. (2016). Swine farm wastewater and mineral fertilization in corn cultivation. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 20 (1), 49-54. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v20n1p49-54>

Peyvastı, V. S. et al., (2020). High-level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistance genes among Enterococcus spp. clinical isolates in Tehran, Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 318-323. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.008>

Pfeifer, Y., Cullik, A., & Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International journal of medical microbiology*, 300(6), 371-379. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.005>

Resende, J. A., Godon, J. J., Bonnafous, A. et al. (2015). Seasonal Variation on Microbial Community and Methane Production during Anaerobic Digestion of Cattle Manure in Brazil. *Microbial Ecology*, 71, 735–746. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0647-y>

Resende, J. A. et al., (2014). Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. *Bioresource Technology*, 153, 284-291. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.007>

Rousham, E. K., Unicomb, L., & Islam, M. A. (2018). Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: integrating behavioural, epidemiological and One Health approaches. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1876), 20180332. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0332>

Sahlström, L., Aspan, A., Bagge, E., Danielsson-Tham, M. L., & Albiñ, A. (2004). Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water research*, 38(8), 1989-1994. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.031>

Schmitt, H., Stoob, K., Hamscher, G., Smit, E., & Seinen, W. (2006). Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils: microcosm and field studies. *Microbial ecology*, 51(3), 267-276. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9035-y>

Singh, R. K. et al, (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of translational medicine*, 15(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1175-y>

SALVADOR, R. et al., (2019). Life cycle assessment of electricity from biogas: A systematic literature review. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 38(4), 1-8. <https://doi.org/10.1002/ep.13133>

Sandberg, K. D., & LaPara, T. M. (2016). The fate of antibiotic resistance genes and class 1 integrons following the application of swine and dairy manure to soils. *FEMS microbiology ecology*, 92(2), ID: iw001. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw001>

Spratt, E. et al., (2021). Accelerating regenerative grazing to tackle farm, environmental, and societal challenges in the upper Midwest. *Journal of Soil and Water Conservation*, 76(1), 15A-23A. https://www.naturefund.de/fileadmin/pdf/Weide/Spratt_et_al_2021.pdf

Limbago, B. M., & Swenson, J. M. (2015). Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. *Manual of Clinical Microbiology*, 1286-1313. <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch73>

Turbett, S. E. et al., (2019, May). Evaluation of a screening method for the detection of colistin-resistant Enterobacteriaceae in stool. In *Open forum infectious diseases* (Vol. 6, No. 6, p. ofz211). US: Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz211>

Venglovsky, J., Martinez, J., & Placha, I. (2006). Hygienic and ecological risks connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture. *Livestock science*, 102(3), 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.03.017>

Werres, S., Wagner, S., Brand, T., Kaminski, K., & Seipp, D. (2007). Survival of *Phytophthora ramorum* in recirculating irrigation water and subsequent infection of *Rhododendron* and *Viburnum*. *Plant Disease*, 91(8), 1034-1044. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-8-1034>

Yadvika, S.; Sreekrishnan, T. R.; Kohli, S., & Rana, V. (2004). Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques - a review. *Bioresource technology*, 95(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.010>