

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA VETERINÁRIA**

Mariangela Facco de Sá

**PARASITOS EM DEJETOS SUÍNOS APÓS COMPOSTAGEM
AUTOMATIZADA PARA USO NO PLANTIO DE RÚCULA**

Santa Maria, RS
2017

Mariangela Facco de Sá

**PARASITOS EM DEJETOS SUÍNOS APÓS COMPOSTAGEM AUTOMATIZADA
PARA USO NO PLANTIO DE RÚCULA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Prof.^a Dr^a Silvia Gonzalez Monteiro

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Facco de Sá, Mariangela
PARASITOS EM DEJETOS SUÍNOS APÓS COMPOSTAGEM
AUTOMATIZADA PARA USO NO PLANTIO DE RÚCULA / Mariangela
Facco de Sá.- 2017.
97 p.; 30 cm

Orientador: Silvia Gonzalez Monteiro
Coorientador: Luiz Antonio Sangione
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2017

1. Tratamento de dejetos 2. Suinocultura 3.
Dicianodiamida 4. Hortaliças 5. Tratamento de Dejetos I.
Gonzalez Monteiro, Silvia II. Sangione, Luiz Antonio
III. Título.

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Mariangela Facco de Sá. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: mariangelazoot@yahoo.com.br

Mariangela Facco de Sá

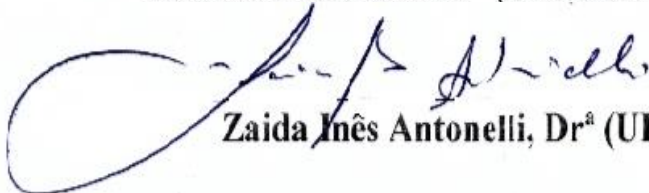
**PARASITOS EM DEJETOS SUÍNOS APÓS COMPOSTAGEM
AUTOMATIZADA PARA USO NO PLANTIO DE RÚCULA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 17 de fevereiro de 2017:


Silvia Gonzalez Monteiro, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Luciana Dalla Rosa Dr^a (UNICRUZ)


Zaida Inês Antonelli, Dr^a (UFSM)


Israel Silva Dr. (UFMG)


Alexandre Alberto Tonin, Dr. (UNOESC)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATORIA

*Ao meu querido e amado esposo, Roger, companheiro de todas as horas.
Aos meus filhos Rithiele (meu porto seguro) e Leonardo (meu anjo sem asas),
razões da minha existência, orgulho e realização da minha vida, pessoinhas que me
levam a seguir em frente sempre.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Durante nosso crescimento e aprendizado enfrentamos desafios, obstáculos e dificuldades, antes nem imaginados. Mas com garra e determinação seguimos nosso caminho, realizamos nossos sonhos. Sonhos partilhados com pessoas que se preocupam e fazem parte de nossa vida. Graças a essas pessoas cumpro mais uma etapa: meu Doutorado.

Agradeço primeiramente a Deus aquele que nos compreende muito mais do que podemos entender, criador de tudo que há, por permitir que minha jornada tenha chegado até aqui e ao Santo Expedito por aliviar minhas angustias nos momentos mais difíceis.

Ao Roger, amor da minha vida, companheiro inestimável e amigo fiel, pelo carinho, amor e incentivo durante toda minha vida acadêmica, e por sempre ter entendido minha ausência, principalmente quando a presença se fez necessária.

Aos meus amados filhos Rithiele e Leonardo, razões da minha vida e incentivo para me fazer querer sempre mais e me tornar uma pessoa realizada, pelo amor, carinho, companheirismo a mim dedicados e pela compreensão da minha ausência nos momentos em que precisaram durante esta jornada. Ao meu genro **Eduardo Perius** e minha filha **Rithiele**, pela ajuda na capina do terreno, plantio da rúcula e companhia até de madrugada para leitura das laminas no laboratório. Amo muito vocês.

A Prof^a Silvia Gonzalez Monteiro pela orientação e oportunidade no decorrer deste trabalho. Aos colegas de laboratório da Equipe LAPAVET, pelo apoio e companheirismo. Meu agradecimento especial ao **Ricardinho Aymay**, **Cristiana Marder** e **Laurem Hoffmann**, meus fieis escudeiros sempre prontos e disponíveis até altas horas e mesmo nos finais de semana, pela dedicação e ajuda no decorrer desta etapa, vocês foram fundamentais para o êxito deste trabalho, **meu obrigado de coração**, vocês são nota 1000.

Agradeço em especial ao Prof. Flávio Eltz, pela ajuda importante durante esta etapa. A amiga **Rosangela (KIKa)**, pelos momentos de descontração (musica chimarrão e algumas cervejinhas), mas também pelas chamadas no momento certo. Minha amada amiga, foste fundamental para realização da última etapa do experimento me emprestando o terreno, muito obrigada. A Michele Antunes, Adriana dos Santos Silva e Ane Carolina, amigas de todas as horas, sou muito grata pelo carinho, atenção e paciência.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Preventiva, pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação. Ao CNPq pela concessão da Bolsa de Estudo.

A todos que não estão citados aqui e que de uma forma ou de outra contribuíram em etapa da minha vida acadêmica, muito obrigado.

“ O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas sim, na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis. ”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

PARASITOS EM DEJETOS SUÍNOS APÓS COMPOSTAGEM AUTOMATIZADA PARA USO NO PLANTIO DE RÚCULA

AUTOR: Mariangela Facco de Sá

ORIENTADORA: Dr^a. Silvia Gonzalez Monteiro

A compostagem automatizada é uma técnica que vem sendo utilizada no tratamento de dejetos de animais, porém a segurança quanto à eliminação de patógenos zoonóticos ainda é pouco estudada. O objetivo do trabalho foi verificar a contaminação do composto quanto a presença de parasitos. O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Santa Maria, o substrato utilizado foi constituído da mistura de maravalha (30%) e serragem (70%) de eucalipto. Os dejetos líquidos de suínos (DLS) foram provenientes de animais em fase de terminação. Foram avaliados três tratamentos durante o processo de compostagem automatizada com revolvedor vertical: T1- Adição de dejetos líquidos de suínos (DLS); T2- Adição de DLS e Xisto retortado (XR) e T3- Adição de DLS + XR + Dicianodiamida (DCD). As adições dos diferentes DLS foram realizadas semanalmente durante 14 semanas. Foi realizado o acompanhamento da temperatura, da umidade, compostos nitrogenados e pH de cada pilha de compostagem. Antes de cada adição na leira, um litro de cada amostra de DLS foi coletado e avaliado para presença de parasitos. Para o material compostado foram coletados 100g em quatro alturas diferentes da leira, que foram misturadas. Uma amostra desse material foi retirada para análise parasitológica. As análises foram feitas com três repetições, um dia antes de cada nova adição de dejetos na leira. A análise parasitológica do composto para recuperação de ovos de helmintos no composto foi realizada através do método de Bailenger Modificado com adaptações (BMA). Para identificação de *Cryptosporidium* sp. foram confeccionadas lâminas e realizada a coloração de Ziehl-Neelsen. Para identificação de *Giardia* sp. foi realizada a técnica de Faust modificada. No tratamento controle (DLS) houve aumento do número de ovos entre o início e final da adição de DLS, enquanto que no período de maturação houve redução. Já para os demais tratamentos (DLS+XR e DLS+XR+DCD) houve redução gradual no número total de ovos do início até o fim da adição de DLS, e também no período de maturação. O tratamento DLS+XR+DCD promoveu redução total no número de ovos no período de maturação. A compostagem automatizada mostrou ser um processo eficiente para o tratamento de dejetos líquidos de suínos eliminando entre 98 e 100% dos ovos de helmintos presentes nos DLS. O potencial contaminante dos compostos foi avaliado em experimentos de campo, com o cultivo de rúcula. Quatro tratamentos foram avaliados, com 4 repetições: T1- Composto DLS; T2- Composto DLS + XR; T3- Composto DLS + XR + DCD; T4- testemunha (solo + Nitrogênio, Fosforo e Potássio (NPK)). Para esta análise foram coletados 100g de folhas de rúculas, em triplicata e foram realizados 3 cortes na rúcula. Não foram encontrados parasitos nas rúculas em nenhum dos cortes mesmo quando presentes no composto utilizado.

Palavras Chaves: Helmintos suínos. Suinocultura. Dicianodiamida. Hortaliça.

ABSTRACT

RESEARCH OF PARASITES IN PIG MANURE AFTER AUTOMATED COMPOSTING FOR USE IN ARUGULA CULTIVATION

AUTHOR: Mariangela Facco de Sá
ADVISOR: Dr^a. Silvia Gonzalez Monteiro

Automated composting is a technique applied for treatment of animal manure, however a safety form for elimination of zoonotic pathogens is still poorly studied. The objective of this paper was to verify contamination of the compost to presence of parasites. The experiment was conducted at Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), and the substrate consisted of a mixture of wood shavings (30%) and sawdust (70%). Liquid pig manure (LPM) was provided from animals in finishing phase. Three treatments were evaluated during the automated composting process with vertical mixer: T1- Addition of liquid pig manure (LPM); T2- Addition of LPM and retorted shale (RS) and T3- Addition of LPM + RS + Dicianodiamide (DCD). LPM additions were performed weekly for 14 weeks. Monitoring of temperature, humidity, nitrogen compounds and pH of each compost pile was carried out. Before each addition in the rows, one liter of LPM sample was collected and evaluated for the presence of parasites. For composted material, 100g were collected at four different heights of the rows, which were mixed. A sample of this material was removed for parasitological analysis. Analyzes were done with three replicates, one day before each new addition of waste in the row. Parasitological analysis of the compost for the recovery of helminth eggs was carried out using the Modified Bailenger method with adaptations (MBA). For identification of *Cryptosporidium* sp., glass slides were made and Ziehl-Neelsen staining was performed. For identification of *Giardia* sp. it was performed the modified Faust technique. In control treatment (LPM) there was an increase in number of eggs between the beginning and end of the LPM addition, whereas in maturation period there was a reduction. For the other treatments (LPM + RS and LPM + RS + DCD) there was a gradual reduction in the total number of eggs from the beginning to the end of addition of LPM, and from the end to maturation period. The LPM + RS + DCD treatment promoted a total reduction in number of eggs in the maturation period. Automated composting showed to be an efficient process for the treatment of liquid pig manure eliminating between 98 and 100% of the helminth eggs present. The contaminant potential of the compost was evaluated in field experiments with arugula cultivation. Four treatments were evaluated, with 4 replicates: T1- LPM compost; T2- LPM + RS compost; T3- LPM + RS + DCD compost; T4-control (soil + NPK). For this analysis 100g of leaves of arugula were collected in triplicate and three cuts were made. No parasites were found in the arugula in any of the cuts even if there were parasites present in the compost used.

Keywords: Helminths of swine. Swine breeding. Dicianodiamide. Vegetable.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figure 1- Relative effectiveness of the modified Bailenger method with adaptation (MBA) and modified Bailenger method (BM) in recovering *Ascaris suum* eggs from liquid pig manure compost39
- Figure 2- Relative effectiveness of the modified Bailenger method with adaptations (MBA) and the other methods, Willis-Mollay (WM), Faust modified (FM) and simple sedimentation (SS) in recovering *Ascaris suum* eggs from (A) compost and (B) manure.....39

ARTIGO 2

- Figure 1- Total number of parasite eggs found weekly in the three treatments (LPM, LPM + RS; and LPM + RS + DCD) throughout the experiment, by Kg-1 of compost.....61
- Figure 2- Total number of protozoan cysts of orders Amoebida (A) and oocysts of Eucoccidiorida (B) found in the three treatments (LPM; LPM + RS; LPM + RS + DCD) throughout the experiment by Kg-1 of compost.....64
- Figure 3- Variation between nitrogenous compounds (A) NH_4^+ , (B) NO_3^- and (C) NO_2^- throughout the experiment for each of the treatments, mg per Kg-1 compost.....65
- Figure 4- Variation in dry matter (A), humidity (B) temperature (C) and pH (D) of the compound throughout the experiment for each of the treatments.....66
- Figure 5- Relation between: dry matter and LPM + RS + DCD (A); Humidity and LPM + RS + DCD (B); Temperature and LPM (C), LPM + RS (D) and LPM + RS + DCD (E); PH and LPM + RS + DCD (D) for the total eggs per Kg-1 of compost.67

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

Table 1- Comparison between the total numbers of parasite eggs (kg-1 of compost) throughout the experiment in the three treatments.....62

Table 2- Comparison between the total numbers of eggs of each order of parasites (kg-1 compost) throughout the experiment in the three treatments.....63

ARTIGO 3

Table 1- Characterization of the compost used in sowing of arugula and quantity of *Ascaris suum* eggs per g of wet compost.....72

Table 2- Intensity of parasites found in arugula samples. (-) no parasite found per field read in the microscope (+) of one to five parasites per field read (++) of six to ten parasites per field read (+++) more than ten parasites per field read. The reading was performed throughout all the glass slide.....75

LISTA DE ABREVIATURAS

DLS	Dejetos Líquidos de Suínos
DCD	Dicianodiamida
XR	Xisto retornado
LPM	Liquid Pig Manure
RS	Retorted Shale
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket
BMA	Bailenger Modificado com adaptações
BM	Bailenger Modificado
WM	Willis Mollay
SS	Sedimentação Simples
FM	Faust modificado

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14
1 INTRODUÇÃO	14
2 CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 COMPOSTAGEM DE DEJETOS LÍQUIDOS DE SUÍNOS (DLS)	16
2.2 USO DE XISTO RETORTADO E DICIANODIAMIDA COMO REDUTORES DA CARGA PARASITÁRIA	17
2.2.1 Xisto Retortado (XR)	17
2.2.2 Dicianodiamida (DCD).....	19
2.3 INTRODUÇÃO AOS HELMINTOS E SUA RELAÇÃO COM PARASITOSE EM SUÍNOS.....	20
2.3.1 Principais Ordens de interesse e potencial contaminante.....	22
2.3.1.1 <i>Ordem Ascaridida</i>	22
2.3.1.2 <i>Ordem Eucoccidiorida</i>	24
2.3.1.3 <i>Ordem Diplomonadida</i>	27
2.3.1.4 <i>Ordem Amoebida</i>	29
2.4 Uso do composto orgânico de dejetos líquidos de suínos	30
2.5 Características e benefícios da Rúcula	31
3 CAPÍTULO II: ARTIGO 1	32
3.1 ABSTRACT	34
3.2 RESUMO	34
3.3 INTRODUCTION	35
3.4 MATERIALS AND METHODS	36
3.4 RESULTS	38
3.5 DISCUSSION.....	40
3.6 CONCLUSION	41
3.7 REFERENCES	41
4 CAPÍTULO III: ARTIGO 2	45
4.1 Abstract.....	46
4.2 Introduction	46
4.3 Materials and Methods	48
4.3.1 Statistical Analysis	50
4.4 Results	51
4.5 Discussion.....	53
4.5 Conclusion	55
4.6 Acknowledgements	56
4.7 References	56
5 CAPÍTULO IV: ARTIGO 3	68
5.1 ABSTRACT	69
5.2 INTRODUCTION	70
5.3 MATERIALS AND METHODS	71
5.4 RESULTS.....	73
5.5 DISCUSSION.....	76
5.6 CONCLUSION	78
5.7 Acknowledgements	78
5.8 REFERENCES	78
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
7 CONCLUSÕES	84
8 REFERÊNCIAS	85

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos. Essa tese de Doutorado está organizada seguindo a estrutura e apresentação de monografias, dissertações e teses (MDT) 2015. O item CONSIDERAÇÕES FINAIS, encontrado no final da tese, apresenta as interpretações discutidas sob um ponto de vista que buscou estabelecer uma conectividade entre os objetivos e resultados obtidos. As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS se referem somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO e REVISÃO DE LITERATURA desta tese. Os artigos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para as quais foram submetidos:

Artigo 1: Ciência Rural

Artigo 2: Waste Management

Artigo 3: Food Control

As análises parasitológicas descritas nesta tese foram desenvolvidas no Laboratório de Parasitologia Veterinária (LAPAVET) e o tratamento de dejetos líquidos de suínos através da compostagem automatizada no Laboratório de Análises de Biotransformações do Carbono e Nitrogênio (LABCEN) sob a coordenação da Prof.^a Silvia Gonzalez Monteiro e Prof. Celso Aita, respectivamente.

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira está bem consolidada, situando o Brasil como quarto maior produtor e exportador de carne suína no âmbito mundial (ABPA, 2015), ficando atrás da China, Estados Unidos e Alemanha. De acordo com IBGE (2014), no ano de 2012 o Brasil possuía um rebanho de aproximadamente 38 milhões de cabeças, e a produção de carne suína chegou a 3,483 milhões de toneladas. Estes dejetos são reservatórios potenciais de nutrientes e amplamente usados como fertilizantes orgânicos (BARROS et al., 2011), possibilitando maior produção de insumos a um custo mais baixo. No entanto, uma grande variedade de protozoários e helmintos podem ser encontradas nessas fezes e representam ameaça à saúde pública (WONG et al., 2009). Consequentemente, o aumento na produção significa também maior quantidade de dejetos e elevado risco de contaminação ambiental. E, estes parasitos podem permanecer no ambiente criatório por longos períodos, sendo que o risco de contaminação irá depender em grande parte da capacidade de sobrevivência destes no ambiente (JACOBSEN et al., 2012).

Devido a isso, os resíduos da produção suinícola requerem atenção especial. Várias são as tentativas pesquisadas para mitigar este problema. O fato dos animais permanecerem confinados durante todas as fases do ciclo produtivo, acumula um significativo volume de dejetos com alto teor de água oriunda do derramamento dos bebedouros, lavagem das baias e urina (SÁ et al., 2014). Assim, cresce a cada dia a importância de manejar adequadamente estes dejetos, além aumento das exigências dos órgãos fiscalizadores e da sociedade em geral (SEMENOV et al., 2010) minimizando, desta forma, os riscos de poluição advinda de uma maior consciência ambiental dos produtores.

Uma das alternativas, utilizada em países como a Itália (CHIUMENTI et al., 2007), França (PAILLAT et al., 2005), China (ZHU, 2007; JIANG et al., 2013), Espanha (ROS et al., 2006) e introduzida recentemente no Brasil (NUNES, 2003; DAI PRÁ, 2006; OLIVEIRA & HIGARASHI, 2006; KUNZ et al., 2008; GIACOMINI et al., 2014) é a compostagem dos dejetos líquidos, juntamente com substratos com elevada relação Carbono/Nitrogênio (C/N), como a maravalha e serragem.

Com essa tecnologia de manejo e tratamento dos dejetos é possível: a) converter os dejetos líquidos em uma matriz sólida, a qual pode ser facilmente exportada de áreas com elevada densidade de suínos e concentração de dejetos para áreas menos impactadas

(OLIVEIRA & HIGARASHI, 2006); b) concentrar nutrientes no composto, agregando maior valor ao produto final para uso como fertilizante (DAI PRA, 2006); c) sanitizar os dejetos, pela redução da população de microrganismos patogênicos em função das elevadas temperaturas durante a fase termofílica da compostagem (DAI PRÁ et al., 2009; SÁ et al., 2014).

Entretanto, um dos maiores entraves à adoção da compostagem como manejo dos dejetos líquidos de suínos é o grande dispêndio de mão de obra para incorporar os dejetos sobre os substratos, bem como, para o revolvimento das leiras. Para contornar esse problema, foi introduzida, no Sul do Brasil, uma tecnologia inovadora no processo de compostagem, a qual consiste em um equipamento que faz, de maneira simultânea, a adição dos dejetos líquidos a materiais orgânicos com elevada relação C/N e o revolvimento mecânico das leiras. O referido equipamento possui uma bomba que faz a sucção dos dejetos diretamente da esterqueira, ou do local onde os mesmos estão armazenados, aplicando-os sobre a leira de compostagem. Simultaneamente, ocorre o revolvimento da leira com helicoides, os quais movimentam o material desde o fundo até a superfície das leiras. Todo esse processo é realizado de maneira automatizada, o que representa uma grande economia de mão de obra ao suinocultor.

Apesar das inúmeras vantagens atribuídas ao processo de compostagem automatizada, nota-se que as mesmas ainda carecem de um respaldo maior da pesquisa, sobretudo para as condições do Rio Grande do Sul, onde o processo apresenta clara tendência de expansão a curto e médio prazo. Para isso, é indispensável ampliar a base de conhecimento em diversos pontos fundamentais da compostagem automatizada dos dejetos líquidos de suínos. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a sanitização dos dejetos líquidos de suínos quanto a presença de parasitos através do processo de compostagem automatizada.

2 CAPITULO I: REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COMPOSTAGEM DE DEJETOS LÍQUIDOS DE SUÍNOS (DLS)

A compostagem automatizada de DLS é uma tecnologia emergente no que diz respeito a sistemas de tratamento para resíduos da suinocultura. Atualmente a literatura em relação a eficiência de sanitização desta prática ainda é escassa ou inexistente, principalmente sobre a sobrevivência de parasitos após o processo de compostagem. A atividade microbiana, além de promover as transformações químicas e físicas do material compostado proporcionando um produto parcialmente mineralizado (SOUZA et al., 2008), determina a eficiência do processo de compostagem devido a temperatura no interior da leira. Temperaturas mais elevadas podem promover a desnaturação proteica ou a inativação de enzimas essenciais ao desenvolvimento do organismo (ANDREOLLI et al., 2006). Em temperaturas acima de 50° o ambiente torna-se desfavorável para a sobrevivência e o desenvolvimento de organismos patogênicos que geralmente são mesofílicos (VALENTE et al., 2009). Dessa forma, o principal fator sanitizante são as altas temperaturas que o material a ser compostado atinge durante a fase termofílica, sendo capaz de reduzir em 99% a incidência de patógenos como coliformes e ovos de helmintos (ORRICO et al., 2007).

A maioria dos trabalhos realizados analisando os benefícios da compostagem se refere a redução de gases de efeito estufa liberados para atmosfera (BAUTISTA et al., 2011; ANGNES et al., 2013; AITA et al., 2014), redução de coliformes fecais (SÁ, et al., 2014) e redução da evaporação da água (JIANG et al., 2013).

Estudos realizados por Luchese et al. (2007) e Hahn et al. (2012) verificaram que a contagem de oocistos de *Eimeria* sp. encontrados no início do processo não diferiu durante o período de compostagem analisado. Estes autores encontraram uma redução menor que 50% em relação ao número de oocistos encontrados na contagem inicial, o que comprova a baixa eficiência da compostagem para reduzir a contaminação por estes organismos, sugerindo alta resistência deste protozoário.

A manutenção de temperaturas acima de 70° restringe o número de microrganismos durante o processo de compostagem, aumentando o desprendimento de amônia e insolubilização de proteínas hidrossolúveis quando o material apresentar baixa relação C/N (COTTA et al., 2015). No entanto, o processo de compostagem torna-se mais eficiente na redução de microrganismos patogênicos se houver a manutenção de temperaturas termofílicas

uma vez que a eficiência da sanitização depende do tempo de exposição do material compostado a altas temperaturas (REBOLLIDO et al., 2008).

2.2 USO DE XISTO RETORTADO E DICIANODIAMIDA COMO REDUTORES DA CARGA PARASITÁRIA

O uso dos aditivos Xisto Retortado (XR) e Dicianodiamida (DCD) no processo de compostagem para redução de gases de efeito estufa tem sido bastante estudado na atualidade, porém a influência destes aditivos na sanidade em relação a parasitos presentes no composto ainda necessita de pesquisa.

O XR é resultante do tratamento térmico a altas temperaturas de uma rocha betuminosa sedimentar para a extração de óleo, apresenta porosidade elevada (PIMENTEL et al., 2006) e pH baixo, assim, pode-se formular a hipótese de que o XR contribua para reter o N amoniacal dos DLS durante a sua compostagem, reduzindo as emissões de NH_3 para a atmosfera, possibilitando a permanência deste por mais tempo na massa de compostagem.

Outro aditivo utilizado para minimizar a volatilização do N amoniacal dos dejetos inibindo a primeira fase da nitrificação e mantendo a amônia na forma livre, temos a molécula orgânica dicianodiamida (DCD). Ao utilizar esse aditivo devemos levar em conta que diversos fatores interferem na intensidade, bem como na duração do efeito inibitório da nitrificação pela DCD, com destaque para a temperatura, matéria orgânica, pH, tipo de substrato e dose do produto utilizado (RAJBANSHI et al., 1992; KELLIHER et al., 2008).

Até o momento os estudos realizados com XR e DCD são relativos ao seu potencial agrícola, viabilidade de uso, diminuição de gases de efeito estufa em compostagem de DLS, atividade microbiana do solo e redução dos nematoides de plantas com resultados que evidenciam benefícios ao solo e as culturas. No entanto, não há trabalhos sobre o uso do XR e DCD na compostagem de DLS como agente redutor da carga parasitária.

2.2.1 Xisto Retortado (XR)

O Brasil é detentor de uma das maiores reservas mundiais de xisto, que são rochas sedimentares resultantes da decomposição de materiais minerais e orgânicos no fundo de grandes lagos e mares (PIMENTEL et al., 2006). Ao longo de milhões de anos a ação de agentes químicos e microrganismos transformam a matéria orgânica presente nessas rochas

em uma matriz mineral chamada de querogênio, um complexo orgânico que quando aquecido produz gás e óleo semelhante ao petróleo (DOUMER et al., 2011). Por ser um resíduo com alta concentração de Silício (Si) o XR tem sido estudado como agente controlador de nematóides em diferentes culturas, como múltiplas espécies de *Meloidogyne* sp. (CHAVES, 2006). Na cultura do feijão o XR reduziu o número de galhas e de ovos deste parasito; no tomateiro houve redução na reprodução diminuindo o número de ovos do nematóides e no cafeeiro houve redução do número de galhas (DUTRA, 2004). Em relação as características biológicas indicadoras da qualidade do solo Doumer et al. (2011) verificaram que a aplicação do XR proporcionou melhor atividade microbiológica do solo reduzindo a emissão de CO₂ sem causar alteração no Carbono (C) da biomassa microbiana e sem impactar negativamente a atividade enzimática do solo. Porém, estes autores ressaltam a necessidade de novas pesquisas para confirmar a ação do XR sobre o C do solo.

Ao ser beneficiado industrialmente o Xisto gera uma grande quantidade de subprodutos resultantes da pirólise da rocha entre os quais está o XR que representa 80 a 90% de toda matéria prima que alimenta o processo, representando um dos maiores entraves para o desenvolvimento da indústria do xisto pelo grande volume gerado e impactos que causa ao ambiente (PIMENTEL et al., 2006).

Nos Estados Unidos Reddy et al. (1996) verificaram que em locais onde o XR era depositado em grandes quantidades impedia a instalação de nova vegetação e atribuíram este fato a forte alcalinidade deste subproduto (pH ~12,0). Bay et al. (2011) ao realizarem estudos com XR no Brasil encontraram valores de pH bem abaixo, próximos a 5,0 e constataram que os valores de pH do XR americano não condizem com a realidade do XR brasileiro (LEÃO et al., 2014). Ainda, segundo estes autores, o retorno do XR ao ambiente promovido pela unidade da Petrobrás em São Mateus do Sul não prejudica o restabelecimento de plantas (gramíneas, espécies florestais nativas, leguminosas e exóticas).

Visando tornar esse processo mais sustentável tanto em termos econômicos quanto ambientais, a busca de novas tecnologias para destinação deste subproduto tem sido estudada (SANTOS et al., 2010). Devido as características agrônômicas que o XR possui, tendo em sua composição considerável teor de matéria orgânica (MO 15%) e elevado teor de Si (52%) (PEREIRA et al., 2004) e outros elementos como P, Ca, Mg, S e micronutrientes (CHAVES et al., 2006) o XR apresenta potencial para ser usado como insumo na agricultura orgânica (LEÃO et al., 2014).

A pesquisa a respeito da utilização deste material abrange diversas áreas. O XR é bastante usado como adsorvente de vários compostos químicos orgânicos e inorgânicos em

áreas degradadas, uma vez que é capaz de substituir adsorventes comerciais já utilizados e que possuem custo elevado, como o carvão ativado, argilas e sílica gel (STACHIW, 2008). No estudo realizado por Pimentel et al. (2006) a utilização de 1,4 gramas de XR sem nenhum tipo de pré-tratamento foi suficiente para remover 100% dos 200 mg L⁻¹ de chumbo (II) contido em solução aquosa amostrada.

Al-Qodah (2000) utilizou cinzas de xisto como adsorvente para remoção de compostos coloridos da indústria têxtil, e observou que as cinzas apresentaram eficiência de remoção em 90% dos compostos analisados. Machado et al. (2007) utilizaram zeólitas produzidas a partir de XR tratado para remoção de arsênio em água e comprovaram a eficiência deste material para purificação de águas contaminadas. A literatura não relata nada sobre o tipo de influência que o XR exerce sobre parasitos em locais contaminados deixando uma grande lacuna a ser preenchida.

2.2.2 Dicianodiamida (DCD)

A DCD é uma molécula orgânica com ação bacteriostática em *Nitrosomonas* sp. ao promover o bloqueio nos sítios de ação da enzima amônia monooxigenase, responsável pela oxidação de amônio (NH₄⁺) à nitrito (NO₂⁻) (FRYE, 2005), durante a primeira etapa da nitrificação (SINGH et al., 2008). Ao inibir a primeira etapa de nitrificação, a DCD faz com que a amônia livre (NH₃) presente nos dejetos permaneça por mais tempo disponível na massa de compostagem (WHARTON, 1980). Esse tempo maior de exposição dos ovos de helmintos à amônia na forma livre NH₃ possibilita a inativação do parasito uma vez que ocorre redução na permeabilidade da membrana celular provocada pela baixa concentração de oxigênio no composto (GHIGLIETTI et al., 1997). Este mesmo autor sugere que a baixa permeabilidade da membrana que protege o ovo de *Ascaris suum* permite uma maior penetração da NH₃ para dentro da célula, ocasionando a sua inativação. A intensidade de redução da nitrificação é regulada pela temperatura, matéria orgânica, pH, tipo de solo e dose do produto utilizado (KELLIHER et al., 2008). A DCD é muito utilizada como estratégia para a preservação do nitrogênio (N) contido nos dejetos líquidos de suínos na forma de NH₃ após sua aplicação a campo (DAMASCENO, 2010), retardando a nitrificação do N amoniacal, reduzindo a emissão de óxido nitroso (N₂O) e evitando a lixiviação de nitrato (NO₃⁻) (AITA et al., 2014). A DCD também é utilizada para inibir a nitrificação do N amoniacal em camas de aviários utilizadas como fertilizante orgânico (ASING et al., 2008).

Estudos sobre o efeito da NH_3 em ovos de helmintos presentes nos resíduos agropecuários, especialmente ovos de *Ascaris* sp., começaram a ser realizados na década de 70. Chefranova (1977) observou que ovos de *A. suum* em resíduos sólidos e líquidos, em contato com determinada quantidade de NH_3 , eram inativados em menos de 15 dias e em temperaturas que variavam entre 18 e 22°C. Em estudos posteriores, Chefranova et al. (1978) relatou que outros helmintos como *Diphyllobothrium latum* e *Trichuris muris* foram ainda mais sensíveis à toxicidade da NH_3 sendo inativados em um período ainda mais curto. Mendez et al. (2004) conseguiram a inativação de 94% dos ovos de *A. suum* quando expuseram dejetos sólidos de suínos, com pH ajustado para 10,74, a altas concentrações de amônia (50%) no período de duas horas. Estes autores, observaram que pH acima de 8, associado a baixa temperatura (20°C), diminui o tempo de exposição para inativação dos ovos, pois estas condições proporcionam maiores níveis de amônia livre no material.

O mecanismo de ação da amônia na inativação de *A. suum* ainda não está bem definido. Pecson et al. (2006) sugerem que a associação do pH alcalino com a temperatura elevada aumenta a permeabilidade da membrana lipídica da casca do ovo, permitindo a difusão da amônia livre para dentro do reservatório, conseqüentemente ocorre o aumento do pH intracelular e inativação do parasito. Nordin et al., (2009) também relatam que a inativação pela amônia é dependente da temperatura, uma vez que esta influencia a permeabilidade do ovo potencializando a inativação.

Gonzatto et al. (2016) ao realizarem estudos com o uso da DCD como inibidor de nitrificação a uma taxa de 11,3 kg ha⁻¹ durante a aplicação de dejetos líquidos de suínos no solo, a nitrificação do N amoniacal foi completamente inibida durante os primeiros 12 dias após a aplicação. O efeito inibidor de nitrificação foi atribuído à ação da DCD no bloqueio do sistema enzimático envolvido na oxidação da amônia em nitrito (AITA et al., 2013).

No Brasil, ainda não foram realizados estudos para determinar a eficiência do uso de inibidores da nitrificação como redutores de carga parasitária em dejetos suínos compostados e na diminuição de impactos ambientais relacionados a esses parasitos no solo (LESSA et al., 2014; BARNEZE et al., 2014). Por isso, a necessidade de ampliar o conhecimento e proporcionar soluções para os riscos ambientais relacionados a suinocultura.

2.3 INTRODUÇÃO AOS HELMINTOS E SUA RELAÇÃO COM PARASITOSE EM SUÍNOS

Os helmintos de interesse na saúde pública caracterizam-se, do ponto de vista taxionômico, pela ausência de segmentação e celoma verdadeiro e podem se localizar em diferentes partes no corpo do hospedeiro. Estes, classificam-se em três grandes grupos: Nematódeos, ou vermes cilíndricos; Cestódeos ou vermes segmentados e chatos; e Trematódeos, providos de ventosas e sem segmentação (MONTEIRO, 2010).

Cada helminto possui ciclo evolutivo diferenciado podendo ou não necessitar de um hospedeiro intermediário (HI) para completar o ciclo. Uma espécie de parasito sozinho ou a associação de duas ou mais espécies trazem malefícios ao organismo parasitado (MENEZES, 2013) podendo incorrer na morte do hospedeiro. A morbidade relacionada a estas infecções associada a desnutrição grave, perda de sangue nas fezes e migração de estádios larvais dentro do organismo pode ocasionar consequências desastrosas ao indivíduo acometido (NORMAN et al., 2010).

Os primeiros registros de enfermidades ocasionadas por helmintos encontram-se datadas de 1500 A.C. onde são descritas espécies de tênias e lombrigas, os quais ainda são bastante incidentes em pleno século XXI, principalmente em regiões mais pobres, onde ocorre a associação de fatores como: falta de condições de higiene básicas (LOREILE et al., 2003), inexistência de tratamento de esgotos e da água.

Os suínos são afetados por uma ampla gama de parasitos, principalmente helmintos da Classe Nematoda. Estes parasitos podem ser localizados em praticamente todos os tecidos e cavidades no corpo do suíno (ROEPSTORFF et al., 1998). A morbidade ou mortalidade destes animais será diretamente proporcional a carga parasitária e a resistência individual e idade do hospedeiro, bem como estado nutricional, imunológico e fatores ambientais (WANG et al., 2008; DA SILVA et al., 2009). Travassos (1950) relatou que os helmintos pertencentes a esta classe, possuem corpo normalmente fusiforme, podendo ser subcilíndricos ou esféricos, com simetria bilateral e tubo digestivo completo, não apresentando traços de metamerização. Apresentam nas linhas laterais musculatura interrompida, em geral possuem dimorfismo sexual e corpo revestido por uma camada translúcida denominada cutícula. São na sua maioria ovíparos, podendo alguns serem vivíparos e com dimensões bem variadas, medindo de milímetros até 1 metro de comprimento.

Em casos de baixa infecção principalmente em suínos na fase adulta, sinais clínicos dificilmente são observados, no entanto acarreta em perdas econômicas significativas dentro da cadeia produtiva, principalmente em relação ao desempenho reprodutivo dos suínos (PEDERSEN et al., 2002; THOMSEN et al., 2006).

2.3.1 Principais Ordens de interesse e potencial contaminante

2.3.1.1 Ordem Ascaridida

Dentre os parasitos pertencentes a Ordem Ascaridida está o *Ascaris suum*, que parasita suínos, causando considerável prejuízo dentro da cadeia produtiva. Este parasito foi descrito pela primeira vez por Goeze em 1782 ao perceber características morfológicas muito semelhantes ao *Ascaris lumbricoides* que parasita humanos. Devido a esta semelhança, houve a necessidade de conhecer o potencial zoonótico do *A. suum* e este helminto foi amplamente estudado e, por muito tempo, parasitologistas acreditavam que o ciclo evolutivo de ambos era idêntico (LOREILLE et al., 2003).

Murrell et al. (1997) em seus estudos relataram que as larvas de *A. suum* no estágio L3 tem preferência em parasitar a região do ceco e mucosa do cólon em suínos, enquanto o *A. lumbricoides* tem predileção pelo intestino delgado. Esta descoberta questiona não só o fato de que ambos helmintos possuem padrões migratórios e de desenvolvimento semelhantes em seus hospedeiros, mas também se o mesmo parasita evoluiu originando duas espécies diferentes (LOREILLE et al., 2003). Atualmente não existe um método confiável para diferenciar ovos de *A. lumbricoides* e *A. suum*, uma vez que morfológicamente são muito parecidos.

Uma das maneiras de verificar se são da mesma espécie seria recuperar exemplares deste helminto de humanos e de suínos, e ver se ao acasalarem podem produzir descendentes férteis, baseando-se no Conceito de Espécie Biológica (CEB) (DOBZHANSKY, 1937). Na literatura, são descritos numerosos estudos utilizando caracteres morfológicos (SPRENT 1952, ANSEL et al., 1973), imunológicos (KURIMOTO 1974, NADLER 1987), características de cariótipo (HE et al., 1986) e abordagens bioquímicas (PAGGI et al., 1985) para caracterizar os helmintos adultos, porém os resultados ainda são difíceis de interpretar, pois a localização geográfica do parasito exerce forte influência sobre estas características.

A especificidade de hospedeiro é crucial para determinar se ambos *Ascaris* tem um único ciclo de transmissão tendo suínos e humanos como hospedeiros alternativos ou se possuem ciclo de vida simpátrico com *A. lumbricoides* utilizando humanos como hospedeiros e o *A. suum* utilizando suínos (ANDERSEN et al., 1973). Na América do Norte, em condições naturais, humanos foram infectados ocasionalmente por ovos embrionados de *A. suum* ao

ingerirem hortaliças adubadas com dejetos de suínos contaminados e não tratados (ANDERSON, 1995).

Buckley (1931) para testar se acontecia infecção cruzada, ingeriu um pedaço de pão contaminado com 20 larvas de *A. suum* coletadas a partir do pulmão de um suíno infectado e simultaneamente infectou um primata e dois suínos com uma dose bem maior de larvas. Três meses após a ingestão, os suínos apresentavam uma grande quantidade de nematódeos adultos, enquanto Buckley e o primata não mostravam nenhum sinal claro de infecção. Já Takata (1951), Galvin (1968), Crewe et al. (1971) e Lord et al. (1982) repetiram experimentos com infecção cruzada e demonstraram que humanos podem ser infectados com ovos de *A. suum* oriundos de suínos e que ovos de *A. lumbricoides* podem infectar suínos.

Em aldeias na Guatemala, Anderson et al. (1993) constataram que *A. lumbricoides* e *A. suum* possuem isolamento reprodutivo, porém a proximidade existente entre humanos e suínos associada a falta de higiene tornava a infecção cruzada possível tendo ambos como hospedeiros. No ano de 2001 estudos de epidemiologia molecular em *Ascaris* sp. em regiões endêmicas na Guatemala e China indicaram que o nível de infecções cruzadas entre espécies hospedeiras é baixa ou ausente e que o fluxo de genes é limitado entre diferentes genótipos (ANDERSON, 2001). Diante destes resultados duas hipóteses foram levantadas para explicar a discrepância encontrada nos resultados da Guatemala: ou a infecção cruzada é mediada pela localização geográfica ou pela imunidade do hospedeiro entre as populações analisadas (LOREILE et al., 2003).

A fim de identificar diferentes perfis de restrição para os *A. lumbricoides* e *A. suum* Zhu et al. (1999) utilizaram a região nuclear ITS1 (Espaço Interno Transcrito-1) como alvo de análise molecular. As variações genéticas encontradas nessa região nuclear foram atribuídas à posição geográfica que as populações analisadas estavam inseridas, suportando a hipótese de que ambos helmintos pertencem a mesma espécie. Resultados semelhantes foram encontrados por Peng et al. (2002) na China, onde ao analisarem helmintos recuperados a partir de humanos e suínos com o mesmo alvo molecular encontraram cinco genótipos do parasito (G1-G5). Sabendo que o G1 é um genótipo associado a humanos e G3 associado a suínos, genótipos de *Ascaris* sp. foram encontrados em ambos hospedeiros.

Peng et al. (2005) propuseram a utilização de outros marcadores moleculares, como marcadores mitocondriais (citocromo C oxidase subunidade 1 (COX1) e NADH desidrogenase subunidade 1 (NAD1)) para o estudo destes helmintos em seis províncias chinesas. Os autores encontraram dez haplótipos diferentes em humanos (H1-H10) e 11 em suínos (P1-P10) para o gene COX1 de *Ascaris* spp. e para o gene NAD1 11 (H1-H11) e 15

(P1-P15) haplótipos diferentes respectivamente. Mesmo sendo considerado pelos autores como um baixo fluxo gênico os resultados mostraram que há um haplótipo comum entre *A. lumbricoides* e *A. suum* para COX1.

Em 2011, foi sequenciado o genoma mitocondrial completo (mtDNA) de *A. lumbricoides* e *A. suum*, os pesquisadores encontraram apenas 1,9% de diferença (DOLD et al., 2011a). A elevada semelhança de nucleotídeos e aminoácidos no sequenciamento reforçou a hipóteses de que *A. lumbricoides* e *A. suum* pertencem a mesma espécie (LIU et al., 2012).

Leles et al. (2012) analisaram mtDNA em amostras coletadas em áreas rurais e urbanas no Brasil e em comunidades indígenas nos Estados Unidos da América (EUA) de pessoas que tinham contato direto com suínos. Os dados mostraram que *Ascaris* sp. oriundo de amostras de hospedeiros suínos e humanos possuíam haplótipos comuns. Estes autores reforçam a hipótese de que *A. lumbricoides* e *A. suum* pertencem a mesma espécie e que as diferenças genotípicas e fenotípicas são manifestadas a nível de população e região geográfica, mas com a mesma origem.

Miller et al. (2015) ao estudarem 14 casos de ascariíase humana em sete fazendas no Maine, EUA durante os anos de 2010 a 2013 constataram que o único fator comum para a infecção em todos os casos era a exposição direta ou indireta à suínos. A infecção foi atribuída ao consumo de produtos orgânicos ingeridos, que cresciam próximo as pocilgas ou eram oriundos de solos adubados com dejetos de suínos, uma vez que estes humanos não tinham histórico de viagens para áreas onde há relatos de incidência da parasitose. Para ter certeza de qual era a espécie de *Ascaris* encontrada nos trabalhadores estes pesquisadores analisaram rRNA isolados dos helmintos encontrados e evidenciaram a proximidade genética reforçando a hipótese de que *A. lumbricoides* e *A. suum* podem de fato ser uma única espécie.

2.3.1.2 Ordem Eucoccidiorida

Os parasitos desta ordem causam a doença denominada coccidiose. Utiliza-se este termo, quando pretende-se referir a enfermidades causadas por parasitos da família Eimeriidae, que parasitam principalmente aves, bovinos, ovinos, caprinos, suínos, equinos e coelhos. No entanto, também pode ser utilizado para referir várias parasitoses causada por parasitos da subclasse Coccidea como os pertencentes aos gêneros *Eimeria*, *Isospora* e *Cryptosporidium*. Esta enfermidade acomete principalmente animais jovens, a infecção ocorre através da ingestão de alimentos e água contaminados com oocistos esporulados (LIMA,

2004). Temperaturas elevadas e umidade estimulam a esporulação destes oocistos, por isso a coccidiose em suínos pode ocorrer em qualquer estação do ano (GOMES, 2009).

São descritas mais de 13 espécies de *Eimeria* e duas espécies de *Isospora* que acometem suínos, porém somente a *Isospora suis* é um agente causador de perdas econômicas na suinocultura (MORENO et al., 2007). A coccidiose suína causada por este parasito, é uma das doenças entéricas mais frequentes e que mais se destaca na produção suinícola (WORLICZEK et al., 2009). É considerado um parasito comum nas criações de suínos e chega a atingir cerca de 90% da população e até 50% das leitegadas (SAYD & KAWAZOE, 1996).

Segundo Sobestiansky et al. (1999), leitões infectados com *I. suis* apresentam um quadro clínico de diarreia amarelada e fétida, entre cinco e 21 dias de idade, e que não responde a antibioticoterapia. Esta infecção raramente se manifesta em suínos desmamados. A taxa de morbidade é muito variável, podendo chegar a 100% e a taxa de mortalidade geralmente é menor que 5%, mas há significativa redução no desempenho dos leitões (SOBESTIANSKY et al., 1999) sendo indiscutível seu impacto econômico (SAYD e KAWAZOE, 1996). Os disseminadores desta enfermidade são as leitegadas mais velhas que eliminam os oocistos para o meio ambiente e, estes permanecem no piso da maternidade (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Para aquecer as leitegadas recém-nascidas, utiliza-se o escamoteador com temperatura que varia de 32 a 35 °C favorecendo a esporulação rápida dos oocistos num período de 12 a 16 horas, que aliada a má higienização das instalações favorece a viabilidade dos oocistos no ambiente (PAIVA, 1996). Devido ao fato de que estes oocistos ficam esporulados e viáveis no ambiente ainda é possível a contaminação acidental dos trabalhadores, utensílios e de espécies animais como roedores, ou aves que, como hospedeiros de transporte, podem eliminar os oocistos (ACEDO et al., 2004).

Em relação ao gênero *Eimeria* sp. as espécies de maior importância na suinocultura são *Eimeria deblickei*, *Eimeria polita*, *Eimeria spinosa*, *Eimeria.porci*, *Eimeria neodeblickei*, *Eimeria scabra*, *Eimeria perminuta* e *Eimeria suis* (NEVES, 2013). O ciclo de vida deste coccídeo ocorre em 3 fases: esporogonia no meio ambiente, esquizogonia ou merogonia (reprodução assexuada) e gametogonia (reprodução sexuada) no hospedeiro (RADOSTITIS et al., 2007). Os oocistos esporulados, quando ingeridos, chegam ao estômago, se rompem e liberam os esporocistos com os esporozoítos graças à ação do CO₂, sais biliares e enzimas (RADOSTITIS et al., 2007; FRONTERA CARRIÓN et al., 2009c). Estes, invadem as células intestinais e iniciam a esquizogonia. Posteriormente, ocorre a gametogonia onde os

microgametas (masculino) são liberados por ruptura da célula hospedeira e cada um deles penetra numa célula epitelial contendo um macrogameta (feminino). Ocorre a fertilização com formação de oocistos não esporulados, estes serão eliminados para ao ambiente junto com as fezes (FRONTERA CARRIÓN et al., 2009c).

A eimeriose acomete principalmente animais jovens. Em animais adultos quando aparece, a carga parasitária é muito baixa o que permite o desenvolvimento de imunidade contra o parasito (RADOSTITIS et al., 2007; FRONTERA CARRIÓN et al., 2009c). Os protozoários do gênero *Eimeria* spp. têm também distribuição mundial, estimando-se que 60 a 90% dos suínos sejam portadores deste parasita (CORDERO DEL CAMPILLO et al., 2002b). O sistema de produção, as condições de manejo e o status higiênico de cada ambiente criatório na suinocultura têm um importante impacto na prevalência desta infecção.

A criptosporidiose, que é uma enfermidade causada pelo coccídeo *Cryptosporidium* spp., que além de infectar seres humanos ainda pode afetar uma variedade de vertebrados incluindo os suínos (ZORANA et al., 2003). Este parasito em infecções experimentais foi confirmado como agente primário de diarreia em leitões lactentes (VITOVEC & KOUDELA, 1992). Porém comumente está associado a outros enteropatógenos apresentando um caráter secundário no curso da diarreia (VITOVEC et al., 2006).

Este agente foi inicialmente descrito infectando suínos na década de 70 nos EUA (KENNEDY et al., 1977) e, posteriormente, através de diversos estudos percebeu-se que possuía distribuição mundial (XIAO, et al., 1994; FREIRE et al., 1995; QUILÉZ et al., 1996; IZUMIYAMA et al., 2001; WIELER et al., 2001; SUARÉZ-LUEGAS et al., 2007). Duas espécies deste agente têm relevante importância no desencadeamento da doença clínica em suínos, o *Cryptosporidium parvum* que é dividido em genótipo bovino, que parasita suínos, bovinos e inclusive humanos, adquirindo caráter zoonóticos, e o genótipo suíno, específico dessa espécie. Uma nova espécie foi definida através de análises biológicas e moleculares, o *Cryptosporidium suis*, que é específico dos suínos (RYAN et al., 2004).

As matrizes representam a principal via de transmissão da infecção para os animais jovens uma vez que a via de contágio é a fecal-oral (ZORANA et al., 2003). Outra forma de infecção é através da água ou contato com bovinos quando o agente for o *C. parvum* genótipo bovino (GUSELLE et al., 2003). Muitas vezes a infecção é silenciosa e assintomática e o principal fator de risco são leitegadas com sistema imune debilitado, principalmente neonatos que não tiveram acesso ao colostro, que uma vez infectados podem apresentar elevada taxa de mortalidade (GUSELLE et al., 2003).

Em áreas endêmicas as fêmeas em lactação fornecem imunidade lactogênica nos primeiros quinze dias de vida dos leitões e após, estes desenvolvem uma resistência própria contra o parasito (TZIPORI et al., 1980). De acordo com Izumiyama et al. (2001), isto explicaria a maior prevalência da enfermidade em leitões recém desmamados quando comparados a leitões lactentes, porém, pouco se sabe sobre a real prevalência deste agente no Brasil. Freire et al. (1995) e Calderaro et al. (2001) relataram que em leitões lactentes com diarreia o *C. parvum* apresentou uma prevalência de 7,35% e 1,2%. Em países como a República Tcheca, essa prevalência manteve-se baixa, 5,7% de um total de 3368 leitões lactentes (VITOVEC et al., 2006).

Por possuírem um ciclo de vida muito semelhante ao de *I. suis*, membros do gênero *Cryptosporidium* spp. se diferenciam de outros coccídeos porque permanecem na superfície das células das vilosidades intestinais e são infectantes no momento da excreção (FAYER & UNGAR, 1986) pois ocorre esporogonia endógena. Por ocasião do rompimento da célula, provoca a morte dos enterócitos, sendo considerado um parasito intracelular e extracitoplasmático (SOBESTIANSKY et al., 1999). Também não apresentam sazonalidade como é observado na isosporose (SANFORD, 1987).

O *Cryptosporidium* spp. podem causar lesões no jejuno, íleo, ceco, cólon, reto e outros tecidos como a vesícula biliar (FLETA et al., 1995). No entanto, tem o epitélio do íleo como principal sítio de localização (VITOVEC et al., 2006).

2.3.1.3 Ordem Diplomonadida

Dentre os protozoários pertencentes a esta ordem temos a *Giardia* sp. que parasita uma ampla gama de mamíferos, incluindo o homem. Em 1681, Anthony van Leeuwenhoek identificou este gênero, no entanto a relevância clínica não foi reconhecida até o final do século XX (LAMANN, 2010). Desde então, *Giardia* sp. é cada vez mais considerado na medicina humana como a causa mais comum de distúrbios gastrointestinais, com uma média de 280 milhões de infecções humanas por ano. *Giardia* sp. é transmitida pela água e alimentos contaminados. A via de infecção é fecal-oral e causa grande impacto socioeconômico especialmente em países em desenvolvimento. Em função disto a giardíase, em 2004 foi incluída na “Iniciativa de Doenças Negligenciadas” da Organização Mundial de Saúde (SAVIOLI et al., 2006).

Na medicina veterinária, o interesse nessa enfermidade é crescente desde a década de 1990, impulsionada por preocupações de saúde pública e, em menor grau, de uma perspectiva veterinária, apesar de causar impactos econômicos no sistema produtivo (LAMANN, 2010). A pesquisa sobre este parasito concentra-se na caracterização molecular de isolados de diferentes hospedeiros avaliando potencial zoonóticos, uma vez que animais domésticos são considerados reservatórios potenciais para a infecção humana (LAMANN, 2010). Em função disso a relevância clínica da infecção por *Giardia* sp. em animais de produção é pouco conhecida.

Semelhante a outros protozoários, várias características parasitárias facilitam a infecção por *Giardia* sp., como a alta excreção de cistos por animais infectados e a baixa dose necessária para a infecção (WADE et al., 2000a). Além disso, os cistos de *Giardia* sp. são infecciosos logo após a excreção. Os cistos também são muito resistentes no ambiente e são capazes de sobreviver durante várias semanas, resultando em um aumento gradual na pressão de infecção ambiental (OLSON et al., 1999; WADE et al., 2000a). Embora os sinais clínicos associados a uma infecção por *Giardia* sp. tenham sido documentados em várias espécies animais, a patogênese não é claramente compreendida (ALOISIO et al., 2006).

Até agora foram descritas três espécies distintas de *Giardia* sp., incluindo *Giardia duodenalis* com uma ampla gama de mamíferos como hospedeiros (LAMANN, 2010). De acordo com este autor, a caracterização molecular revelou que *G. duodenalis* é, na verdade, um complexo de espécies, que compreende 7 conjuntos (de A a G), alguns dos quais têm preferências distintas de hospedeiro (THOMPSON e MONIS, 2004). Ao lado das associações zoonóticas A e B, foram identificadas várias associações específicas para cada hospedeiro, sendo que a associação E foi identificada principalmente em animais de produção, as associações C e D em caninos e a associação F em felinos (LAMANN, 2010). Globalmente, a prevalência de *Giardia* sp. varia consideravelmente. Em bovinos, a prevalência varia de 9 a 73% e em animais de companhia de 45 a 100%, sendo esta variação atribuída principalmente ao manejo e parâmetros geográficos e climatológicos (GEURDEN et al., 2004). Em todas as espécies animais e em humanos os surtos geralmente acometem os mais jovens, provavelmente devido ao lento desenvolvimento da imunidade adaptativa pelo hospedeiro (NYDAM et al., 2001; LAMANN, 2010). Entretanto, os hospedeiros adultos não devem ser excluídos como fontes de infecção, uma vez que um número limitado de cistos é suficiente para a infecção (BERNANDER et al., 2001).

2.3.1.4 Ordem Amoebida

As amebas são parasitos intestinais e são transmitidas de um hospedeiro para outro na forma de cistos. Possuem duas formas, no intestino encontram-se na forma trofozoíta e no ambiente a forma infectante que são os cistos. As amebas de importância em saúde pública são parasitos do gênero *Entamoeba* e a infecção ocorre pela ingestão de água e alimentos contaminados (LAMANN, 2010). Neste gênero, as espécies de maior importância são a *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba coli* que pertencem a família Endamoebidae. Estas possuem o homem como principal hospedeiro, no entanto, outros mamíferos como suínos, cães, gatos, primatas e roedores, podem também ser atingidos (NASCIMENTO et al., 2010). Possuem ciclo biológico idênticos, passando por quatro fases que são: trofozoíto, pré-cisto, cisto e metacisto. Morfologicamente, diferem na fase infectante, onde a *E. histolytica* (patogênica) apresenta quatro núcleos e a *E. coli* (comensal do intestino e não patogênica) possui oito núcleos.

Em humanos, a *E. histolytica* causa a doença conhecida como disenteria amebiana. As infecções podem ser sintomáticas ou assintomáticas, no entanto os portadores saudáveis ou não, funcionam como reservatório, não só para a espécie humana como também para os animais (LEVECKE et al., 2010). As infecções naturais em animais estão descritas em várias partes do mundo, principalmente em cães. Frequentemente são infecções esporádicas e, muitas vezes, adquiridas pelo contato com humanos (NASCIMENTO et al., 2010). Estão ainda descritas infecções experimentais em animais domésticos, como gatos, porquinhos-da-índia, coelhos e suínos.

Muitas espécies de *Entamoeba* spp. são encontradas nas fezes tanto de humanos, suínos, primatas não-humanos cativos (MUNENE et al., 1998; MATSUBAYASHI, 2001) e animais selvagens (KARERE et al., 2002, GILLESPIE et al., 2005) e embora a maioria destas sejam consideradas inofensivas, deve-se ter cuidado quando a *E. histolytica*, aparecer associada. A infecção com este parasito gastrointestinal pode causar disenteria hemorrágica (HAQ et al., 1985; VERWEIJ et al., 2003) e patologias extraintestinais (por exemplo, abscessos hepáticos) e morte (MÁRQUEZ-MONTER et al., 1991; PANG et al., 1993). Em seres humanos a patologia é semelhante, causando em torno de 100.000 mortes em todo mundo a cada ano (STAUFFER & RAYDIN, 2003), tornando este parasito um importante problema de saúde pública.

2.4 USO DO COMPOSTO ORGÂNICO DE DEJETOS LÍQUIDOS DE SUÍNOS

Devido a tecnificação das granjas de suínos ocorre uma grande concentração de animais em pequenas áreas, originando grandes quantidades de dejetos, que necessitam de tratamento e destino. Uma das alternativas de manejo para esses dejetos é a compostagem automatizada que permite a utilização destes dejetos dentro da propriedade, como fertilizantes. De acordo com Scherer (2013), o composto pode ser aplicado ao solo sem necessidade de incorporação, principalmente em áreas próximas aos locais de armazenamento.

Outra vantagem é que a aplicação de índices elevados de matéria orgânica (MO), a longo prazo pode promover alterações nos atributos químicos do solo como por exemplo, aumento nos valores de pH e diminuição dos teores de alumínio (Al) ou da saturação por esse nutriente (CERETTA et al., 2003; LOURENZI et al., 2011; BRUNETTO et al., 2012), fazendo com que a qualidade do solo melhore. Nas camadas mais superficiais do solo a aplicação de MO pode promover o incremento dos teores de nutrientes como fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) (GUARDINI et al., 2012; LOURENZI et al., 2013). Esse incremento de nutrientes proporciona melhoria no ambiente químico do solo para o desenvolvimento das raízes, devido ao aumento da saturação de bases e redução da saturação por Al (LOURENZI et al., 2011; BRUNETTO et al., 2012). A adição de material orgânico ao solo também incrementa os índices de carbono (C) no solo e pode causar mudanças quantitativas e qualitativas na MO do solo (LOURENZI et al., 2011) que irá contribuir para maior produção de matéria seca pelas culturas (LOURENZI et al., 2014). Entretanto, essa MO oriunda dos dejetos pode elevar os teores de metais pesados no solo como cobre (Cu) e zinco (Zn) que fazem parte da dieta dos suínos (GIROTTTO et al., 2010; MATTIAS et al., 2010; BASSO et al., 2012; TIECHER et al., 2013).

A avaliação de atributos químicos, microbiológicos e físicos dos solos com adição de MO através de material compostado já está bem fundamentado na literatura com diversos estudos. O uso de compostagem para o tratamento de dejetos de suínos no Brasil vem sendo uma alternativa empregada principalmente em regiões de produção intensiva, gerando um composto orgânico estabilizado química e fisicamente, que pode ser utilizado como fertilizante orgânico. No entanto, pela quantidade de parasitos presentes nos DLS demonstrado anteriormente, destaca-se a necessidade de maiores estudos com avaliações dos índices de contaminação parasitológica do composto, que ao ser utilizado como fertilizante orgânico pode ocasionar zoonoses.

2.5 CARACTERÍSTICAS E BENEFÍCIOS DA RÚCULA

A rúcula (*Eruca sativa*), é uma planta herbácea, anual, de pequeno porte, pertencente à família *Brassicaceae* da qual estão inclusas mais de três mil espécies. Nativa do mediterrâneo e introduzida no Brasil com a chegada dos imigrantes italianos, a rúcula tem sido cultivada por conter folhas comestíveis de sabor picante característico, muito apreciadas por serem nutritivas e saborosas. Estas folhas, que possuem forma alongada, podem ser encontradas em tons que variam do verde-claro ao verde-escuro, sendo consumidas em várias partes do mundo cruas em saladas, como também refogadas, cozidas e como ingrediente de várias receitas. Consumida principalmente como salada, é também considerada uma planta medicinal com propriedades digestivas (STRINGHETA *et al.* 2006), diuréticas, depurativas e antiasmáticas, aspecto que valoriza esta folhosa e explica o aumento da quantidade comercializada, proporcionando maior rentabilidade aos produtores (FILGUEIRA, 2008). A rúcula é rica em vitamina A e C, fibras, proteínas, minerais como ferro, cálcio, enxofre e potássio (OHTA *et al.*, 2016).

O cultivo desta hortaliça, tem aumentado em muitos países da Europa (REGHIN *et al.*, 2005) e no Brasil o aumento de produção é de aproximadamente 76% principalmente na região sudeste do país (MAIA *et al.*, 2007). O Brasil explora uma área de aproximadamente 946 mil hectares com hortaliças produzindo um volume de produção estimado em 19,4 milhões de toneladas (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2015). Entre as hortaliças cultivadas no Brasil, a rúcula vem ganhando espaço no mercado consumidor desde a década de 90 (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Com o aumento no consumo de rúcula, a qualidade do produto a ser ingerido torna-se de extrema importância, principalmente quando o fertilizante utilizado para o cultivar é de origem orgânica. Em função da grande demanda por produtos de origem orgânica o objetivo desta tese foi tratar dejetos líquidos de suínos através da compostagem automatizada, padronizar a técnica de recuperação de parasitos mais adequada e verificar a viabilidade de transferência dos parasitos remanescentes no composto para a rúcula.

3 CAPITULO II: ARTIGO 1 - ADAPTED BAILENGER METHOD IMPROVES THE RATE OF RECOVERY OF ASCARIS SUUM EGGS FROM LIQUID PIG MANURE COMPOST

Artigo aceito para publicação na revista Ciência Rural

Ciência Rural, Santa Maria, v.47: 04, e20160837, 2017

<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160837>



ISSNe 1678-4596
PARASITOLOGY

**Adapted Bailenger method improves the rate of *Ascaris suum* eggs
recovery from liquid pig manure compost**

**Mariangela Facco de Sá¹ Ricardo Aymay Gonçalves¹ Cristiana Marder¹ Matheus Dellamea Baldissera¹
Camila Belmonte de Oliveira¹ Jessica Caroline Gomes Noll¹ Filipe Silva¹ Silvia Gonzalez Monteiro^{1*}**

Adapted Bailenger method improves the rate of recovery of *Ascaris suum* eggs from liquid pig manure compost

Adaptações no método de Bailenger melhora taxa de recuperação de ovos de *Ascaris suum* em dejetos líquidos de suínos compostado

Mariangela Facco de Sá*, Ricardo Aymay Gonçalves, Cristiana Marder, Matheus Dellamea Baldissera, Camila Belmonte de Oliveira, Jessica Caroline Gomes Noll, Filipe Silva, Silvia Gonzalez Monteiro*

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

*Author for correspondence: mariangelazoot@yahoo.com.br (M.F. de Sá) and sgmonteiro@uol.com.br (S.G. Monteiro)

Adapted Bailenger method improves the rate of recovery of *Ascaris suum* eggs from liquid pig manure compost

3.1 ABSTRACT

Liquid pig manure (LPM) is widely used as a compost fertilizer for vegetable crops destined for human consumption. However, these wastes may contain the eggs of parasites, such as the nematode *Ascaris suum*, that pose serious health risks to humans. We determine the most appropriate technique for recovering *A. suum* eggs from LPM compost. Samples were collected from two waste sources during composting, including 23 samples containing LPM, sawdust, and wood shavings, and 14 samples of LPM alone-both in triplicate. Samples were analyzed using several different recovery methods. Recovery of eggs by the modified Bailenger method with adaptations was significantly more effective and recovered 57% more eggs than by the modified Bailenger method alone. The Willis-Mollay method, modified Faust method, and the simple sedimentation technique only recovered 4.38%, 13.86%, and 26% of eggs, respectively, compared with the modified Bailenger method with adaptations, indicating that the adjustments made to the Bailenger method were key to improving the recovery of *A. suum* eggs from compost and LPM.

Key words: helminth eggs, organic decomposition, residues, parasites

3.2 RESUMO

Dejetos líquidos de suínos (DLS) são amplamente utilizado como adubo para as culturas vegetais destinados ao consumo humano. No entanto, estes resíduos podem conter os ovos de parasitas, tais como o nematóide *Ascaris suum*, que apresentam riscos graves para a saúde dos seres humanos. Neste estudo, determinamos a técnica mais apropriada para a recuperação de ovos de *A. suum* no composto de DLS e no dejetos líquidos. Foram coletadas amostras de dois tratamentos deste resíduos, que consiste de 23 amostras de DLS + serragem + maravalha e 14 amostras de DLS sozinhos, todos em triplicata. Em ambos, dejetos líquidos e dejetos compostado foram analisados usando um método modificado Bailenger (BM), um

método de Faust modificado (FM), o método de Willis-Mollay (WM), sedimentação simples (SS), e pelo método de Bailenger modificado com adaptações (BMA). A recuperação de ovos pelo Método BMA foi significativamente mais eficaz do que pela BM, com 57% mais ovos recuperados usando a técnica de BMA; Além disso, o WM, FM, e o método SS recuperaram 4,38%, 13,86% e 26%, respectivamente, em comparação com o método BMA, indicando que os ajustes feitos com o método BM foram fundamentais para melhorar a recuperação de ovos de *A. suum* ovos em dejetos compostados e DLS puro.

Palavras chaves: Ovos de helmintos, decomposição orgânica, resíduos, parasitas.

3.3 INTRODUCTION

Various technologies have been explored to reduce the environmental impacts of pig manure due to greenhouse gas emissions and microbial contamination. However, few studies have applied such technologies to reduce contamination of manure by parasites (DOS SANTOS et al., 2015). The great demand for food to meet global population growth necessitates improvements to food security while simultaneously minimizing environmental damage (HECK et al., 2013).

Thus, there is a growing need to manage the waste generated by the pork processing industry appropriately and effectively to reduce environmental damage. Automated composting, an aerobic process in which liquid pig manure (LPM) is distributed and mixed with a solid matrix (typically wood shavings and sawdust) that provides aeration and steam precipitation of the compost, is one potential alternative for treating LPM (SERPA et al., 2013). For optimal results, the process requires thermophilic temperatures to be attained via the mixing of substrates with material that has a high carbon:nitrogen (C:N) ratio, thereby increasing aerobic microbial activity (SÁ et al., 2014). Such high temperatures are essential to sanitize composted manure, as they incapacitate any parasites that may be present.

Studies focusing on parasite elimination from LPM remain scarce, limiting the applicability of LPM as a crop fertilizer (PALHARES, 2012). Techniques for parasite recovery from the final compost are still inadequately defined. Therefore, it is necessary to adapt established techniques for the treatment of sewage sludge or LPM through anaerobic reactors (PINTO et al., 2014). Compost based on LPM is rich in urine, water, fur, feed and

other material that provide fertile grounds for pathogen egg, larva, cyst, and oocyst fixation (DOS SANTOS et al., 2011).

The parasitic nematode *Ascaris suum*, which has a life cycle very similar to that of the parasite *Ascaris lumbricoides*, is often present in LPM and represent a risk to human health (LELES et al., 2012). Several successful experimental infections have demonstrated that *A. lumbricoides* can establish in pigs and *A. suum* can establish in humans, with both exhibiting full life cycles in the respective hosts (JUNGERSEN et al., 1996). Existing techniques for egg recovery may underestimate egg loads, given that the final compost usually has low moisture and high organic matter content.

The goal of the present study was to explore the relative effectiveness of methods that are currently used to recover *A. suum* eggs from LPM compost.

3.4 MATERIALS AND METHODS

Automated composting platforms were the experimental unit in the present study. We used substrates consisting of a mixture of wood shavings (30%) and sawdust (70%) with a high carbon:nitrogen (C:N) ratio, an essential component of efficient composting. Swine manure was obtained from pigs in the finishing phase that were raised in conventional production systems and kept under full confinement until slaughter.

Manure was stored in interconnected polyethylene boxes and pumped onto the composting platforms. A total of 1 L of sample material was collected and examined for the presence of parasites, using several different techniques in order to compare them. Compost samples (100 g) were collected at four heights (20 cm, 40 cm, 60 cm, and 80 cm), with three replicates (a total of nine samples), 1 day before fresh manure was added to the windrow. The samples were placed in sterile vials and stored on ice in a Styrofoam box, then transported to the Parasitology Laboratory of the Federal University of Santa Maria for parasite identification. A total of 23 samples of compost (composed of LPM, sawdust, and wood shavings) and 14 samples of LPM alone were collected. *A. suum* eggs found in the compost samples were identified by size and specific morphological characteristics, such as shape, thickness of the outer membrane, inner content, and other structures, in accordance with established criteria for identification of helminth eggs (STOTT, 1998).

We compared the efficiency of four different methods of *A. suum* egg recovery: (i) a modified Faust method (FM) (COELHO et al., 2002), which is based on the principle of

centrifugal flotation at a density (1:30) larger than that used in the modified method (1:18), facilitating the gathering of helminth eggs of different densities; (ii) the Willis-Mollay method (WM) (HOFFMANN, 1987), which is based on the principle of spontaneous flotation in a solution of saturated sodium chloride (NaCl) at a density of 1:18; (iii) simple sedimentation (SS) (HOFFMANN, 1987), which consists of mixing the material to be analyzed with water and then simply allowing gravity to separate denser material from less-dense material (OLIVEIRA & GERMANO, 1992); and (iv) a modified Bailenger method (BM) (AYRES & MARA, 1996), which involves washing of sediments containing helminth eggs in an aceto-acetic buffer at pH 4.5 and ether to separate the material into distinct phases, after which the pellets are suspended in a 30% zinc sulfate solution and the resultant supernatant is analyzed using a McMaster chamber. In addition to these techniques, we also performed a modified Bailenger method with adaptations (MBA; described below).

The first adaptation of the modified Bailenger technique occurred early in the process, immediately after the four aliquots of the compost were homogenized, wherein a 100 g sample was added to 200 mL of sterile deionized water. The material was agitated for 30 min in a horizontal roller agitator to promote additional egg recovery, and the process was repeated in triplicate. Aliquots were strained into a sedimentation cup with a sieve containing gauze that was folded four times, until the cup contained 1,000 mL of distilled water. After 24 h of sedimentation, the supernatant was discarded and the decanted material was washed three times with distilled water at 2 h intervals.

The sediment was then placed into 15 mL Falcon tubes; the used cups were washed with a solution of distilled water and 1% Tween 80 to recover the eggs remaining in the cups. The samples were then centrifuged for 15 min at 2500 rpm to separate the solid fraction, and the supernatant was discarded. Recovered pellets were partitioned into four equal aliquots (volume in weight), to which sterile distilled water was added to reach a total volume of 15 mL. The contents were homogenized by vortexing and then centrifuged again to remove any Tween 80 residue. For the MBA method, aceto-acetic buffer solution (pH 4.9) was added to the Falcon tubes at a 1:1 ratio, using diethyl ether to fill the tube to reach a volume equivalent to twice the amount of sediment.

Tubes were vortexed for 1 min to thoroughly mix the solution. The pH of the solution was adjusted to 4.9 by adding a large volume of sodium acetate to the aceto-acetic buffer solution. Controlling the pH optimizes the hydrophilic–lipophilic balance of parasite eggs relative to the extraction medium, which helps to concentrate helminth eggs (AYRES et al., 1989). After homogenization, the samples were centrifuged at 2500 rpm for 15 min.

Following centrifugation, the samples presented four distinct layers. Fatty materials and heavy fragments, primarily composed of helminth eggs and larvae, as well as protozoa cysts and oocysts, were concentrated at the bottom of the tube. The other layers were composed mainly of buffer solution, grease, and other materials that mixed with the ether and formed a thick, dark-colored buffer layer. The top three layers were discarded and only material from the bottom layer was collected for analysis.

Zinc sulfate with a density of 1:35 was added to the pellets, at a ratio of 5× the pellet volume. The sample was further homogenized by vortexing for an additional 1 min and centrifuged at 3500 rpm for 5 min, which produced superior separation of eggs from the sediment. After centrifugation, an aliquot of the surface liquid layer was collected with a Pasteur pipette, placed in a McMaster chamber, and analyzed in triplicate. Readings were initiated after a 5 min wait to allow all eggs to float to the surface of the counting reticulum and were performed under 10× and 40× objectives of an optical microscope (Zeiss). Only eggs within the grid of the McMaster chamber were counted; to ensure accuracy, the arithmetic average of the scores was calculated. The number of eggs per kilogram of compost was obtained by multiplying the average number of eggs counted in the three McMaster chambers by the volume (mL) of the final pellet, dividing that figure by 0.30 (the volume in mL of the two reticles of a McMaster chamber), and multiplying by 1,000 (AYRES & MARA, 1996).

The results are presented as means and standard errors. The data from the BM and MBA methods were analyzed with a Student's *t*-test, whereas all other data were subjected to ANOVA and post-hoc Dunnett's test, with $p < 0.05$.

3.4 RESULTS

Figure 1 shows the relative effectiveness of the BM and MBA methods for recovering eggs in composted material. Egg recovery was significantly higher using the MBA method than the BM approach [$t(21) = 2.02$; $p < 0.01$], with 57% more eggs recovered.

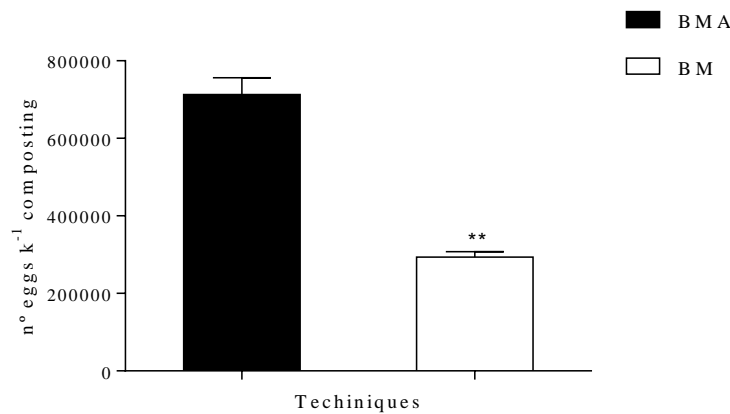


Figure 1 – Relative effectiveness of the modified Bailenger method with adaptation (MBA) and modified Bailenger method (BM) in recovering *Ascaris suum* eggs from liquid pig manure compost. **Significant difference ($p < 0.001$). N = 23 samples of compost material.

Figure 2 compared the MBA method with the other techniques for recovering *A. suum* eggs from compost (Fig. 2A) and from LPM alone (Fig. 2B). The MBA approach was significantly ($p < 0.001$) more effective at recovering eggs from compost than were the WM, FM, and SS methods ($p < 0.01$) (Fig. 2A).

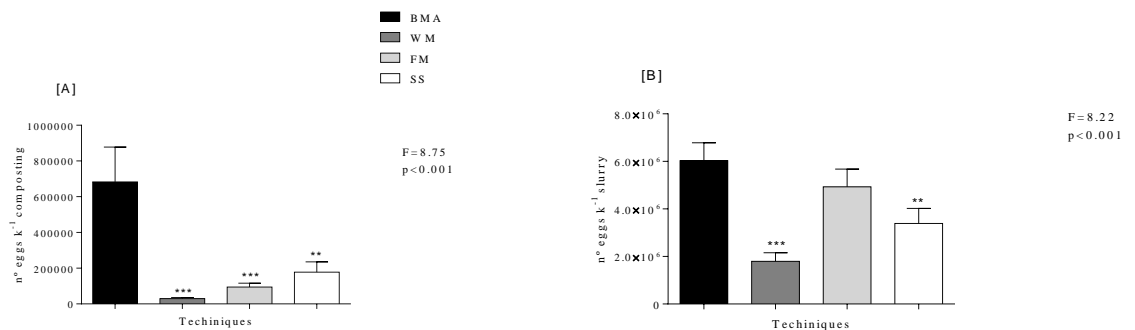


Figure 2 – Relative effectiveness of the modified Bailenger method with adaptations (MBA) and the other methods, Willis-Mollay (WM), Faust modified (FM), and simple sedimentation (SS) in recovering *Ascaris suum* eggs from (A) compost and (B) manure. ** or *** Significant difference ($p < 0.001$). N = 14 samples of liquid waste, N = 23 samples of compost ma

The WM, FM, and SS method recovered only 4.38%, 13.86%, and 26%, respectively, of the number of eggs recovered using the MBA method. The MBA method was also significantly more effective at recovering eggs from LPM alone than were the WM ($p < 0.001$) and the SS methods ($p < 0.01$). The WM and SS method recovered only 30% and 56% of the number of eggs recovered by the MBA method from LPM. However, no significant

differences were detected between the MBA method and the FM method ($p > 0.05$) for egg recovery from LPM.

3.5 DISCUSSION

Several techniques have been developed to recover the eggs of helminths and protozoans from sewage sludge and wastewater generated by swine bioreactors (CRISPIM & BARBOSA, 1994; AYRES & MARA, 1996; JEANDRON et al., 2014; PINTO et al., 2014). Although a number of these techniques have been shown to be effective for extracting eggs from feces and water, few studies have focused on their effectiveness at extracting eggs from waste material consisting of larger particles, which provide larger adhesion areas. Our results demonstrate the superiority of the MBA technique and advance our knowledge of the use of manure as fertilizer.

Research on the agronomic potential, greenhouse gas emissions, and pathogens associated with these types of wastes is quite extensive, with numerous studies published over the past decade alone (e.g., SÁ et al., 2014; BROETTO et al., 2015; CARVALHO et al., 2015; GONZATTO et al., 2016). However, evaluations are needed of the relative effectiveness of methods applied to waste treated by automated composting, which involves substrate material that provides a greater adhesion area for helminth and protozoa eggs. The present study adds to our knowledge of this subject, as we found that modifying the BM technique improved the efficiency of helminth egg recovery by 57% over the traditional BM approach.

The BM is widely used to recover parasite eggs from sewage sludge and to treat manure in anaerobic reactors and biofilters. According to ZERBINI and CHERNICHARO (2000), the BM does not capture the exact percentage of eggs recovered, but it is superior to other techniques used for treated sewage. However, the BM is less effective when the proportions of solids in the waste material are higher, as reported in previous studies, where helminth egg counts were low (SYLVESTRE, 2013).

We determined that significantly more eggs were recovered from the same sample by the MBA method than the BM (Fig. 1), from which it can be inferred that agitation with deionized water and 1% Tween 80 at the beginning of the analysis helped detach eggs that were adhered to the substrate. Moreover, rinsing the substrate with 1% Tween 80, along with centrifugation at the end of the procedure, may also have increased the efficiency of egg

recovery. JEANDRON et al. (2014) achieved similar results, reporting that egg recovery rates increased from 82.7% to 96.5% when the detergent solution 1% Tween 80 was incorporated into samples seeded with helminth eggs.

According to AYRES and MARA (1996), increasing the pH of the buffer solution improves the hydrophilic–lipophilic balance of parasite eggs relative to the extraction medium. We observed this phenomenon in the present study, as substituting deionized water for distilled water and increasing the pH of the aceto-acetic buffer solution to 4.9 resulted in better flotation of eggs than the conventional BM approach, which relies on lower pH. Similarly, RITCHIE (1948) demonstrated that the effect of pH on egg-recovery efficiency varies among parasite species.

The adjustments to the BM also enabled the recovery of more eggs of other parasite species not covered in the present study relative to conventional methods. In a comparison of two solutions with densities greater than 1:20, MAGOTI (2008) did not observe any differences in egg recovery. However, in our study, increasing the density of the zinc sulfate solution to 1:35 improved egg flotation compared with the lower 1:18 density used in the conventional BM. Furthermore, adaptations to the BM enhanced sample clarity at the end of the process and thus improved egg visibility, which facilitated the McMaster chamber egg counts.

3.6 CONCLUSION

It is essential to know the extent of helminth egg contamination in LPM compost prior to using this waste material as a fertilizer for vegetable crops intended for human consumption. The adjustments we made to the BM greatly improved the technique's effectiveness as we measured the degree to which LPM compost was contaminated by *A. suum* eggs.

3.7 REFERENCES

AYRES, R. et al. The enumeration of human intestinal nematode eggs in raw and treated wastewaters. **Tropical Public Health Engineering**, March, Leeds, U.K., 1989.

AYRES, R.M.; MARA, D.D. **Analysis of wastewater for use in agriculture: a laboratory manual of parasitological and bacteriological techniques**. Geneva: World Health Organization, 35p. 1996.

BROETTO, T. et al. "Indicadores geoespaciais para avaliação do impacto ambiental da suinocultura no licenciamento em âmbito municipal." **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília 50.12: 1177-1185, 2015.

COELHO, W.M. et al. Avaliação de metodologias para detecção de ovos de helmintos no lodo e determinação do percentual de recuperação. In: XXVIII Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Cancun, México. **Anais...**, v.CD. p.1-7, 2002.

CRISPIM, W.M.C.; BARBOSA, D.M.C. Avaliação do sistema de lagoas de estabilização de esgotos na remoção de ovos de helmintos – Proposta para recuperação do método da OMS. In: 3rd IAWQ International Specialist Conference and Workshop: **Waste Stabilization Ponds Technology and Applications**. João Pessoa, Brazil, 1994.

DOS SANTOS, L.D. et al. Tecnologias e sistemas de tratamento para os dejetos da suinocultura. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 5, p. 12–18, 2015.

DOS SANTOS, L.U. et al. Detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in raw and effluent wastewater: critical evaluation of methods. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 16, n. 2, p. 115–120, 2011.

GONZATTO, R. et al. "Dicyandiamide as nitrification inhibitor of pig slurry ammonium nitrogen in soil." **Ciência Rural** 46.5, p. 802-808, 2016.

HECK, K. et al. Evaluation of degradation temperature of compounds in a composting process and microbiological quality of the compost. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 1, p. 54–59, 2013.

HOFFMANN, R.P. **Diagnóstico de parasitismo veterinário**. Sulina, 156p. 1987.

JEANDRON, A. et al. A quantitative assessment method for *Ascaris* eggs on hands. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96731, 2014.

JUNGERSEN, G. et al. Experimental transfer of *Ascaris suum* from donor pigs to helminth naïve pigs. **Journal of Parasitology** v. 82, p. 752–756, 1996.

LELES, D., et al. (2012). Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? **Parasites & vectors**, 5(1), 1, 2012.

MAGOTI, L.P. **Padronização de técnica para recuperação de ovos de *Toxocara canis* em solo** – Presidente Prudente: [s.n.], 38p. 2008.

OLIVEIRA, C.A.F.; GERMANO, P.M.L. Study on the occurrence of intestinal parasites on vegetables commercially traded in the metropolitan area of S. Paulo, SP, Brazil. I - Search for helminths. **Ver Saúde Pública**, v. 26, p. 283–289, 1992.

PALHARES, J.C. Impacto ambiental das produções pecuárias. Congresso brasileiro de animais sustentável. **Anais EMBRAPA**: Brasília, 17p. 2012.

PINTO, A.C.A. et al. Employment of anaerobic reactors in real scale and polishing ponds for removal of eggs *Ascaris suum* of swine effluent. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 343–350, 2014.

RITCHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bulletin of the US Army Medical Department**, v. 8, p. 326, 1948.

SÁ, M.F. et al. Population dynamics during composting of fecal automated pig slurry. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 4, 2014.

SERPA F.R., et al. "Compostagem de dejetos de suínos." **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente** 6.1: 47, 2013.

STOTT, R. **Enumeration of intestinal helminth ova in raw and treated wastewaters. A training manual.** Portsmouth: Department of Civil Engineering, University of Portsmouth, 1998.

SYLVESTRE, S.H.Z. Desempenho de sistemas de reatores anaeróbios e aeróbio na remoção de coliformes e ovos de helmintos de águas residuárias de suinocultura. Universidade Federal Paulista- UNESP, xvi-86, 2013.

ZERBINI, A.M; CHERNICHARO, C.A.L. Proposta de consolidação de metodologias para enumeração, identificação e análise de viabilidade de ovos de helmintos em águas residuárias brutas e tratadas: autor, Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbio. Belo Horizonte: ABES-PROSAB, 2000.

4 CAPITULO III: ARTIGO 2 - PARASITES FOUND IN PIG MANURE AFTER AUTOMATED COMPOSTING

Título:

(Artigo submetido a revista Waste Management em 12.2016)

Mariangela Facco de Sá^{a*}, Janaína Brand Dillmann^a, Cristiana Marder^a, Diego Antonio Giacomini^b, Luiza Loebens^c, Ricardo Aymay Gonçalves^a, Celso Aita^b, Silvia Gonzalez Monteiro^{a*}

^aDepartment of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

^bDepartament of Soil Science, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

^cDepartamento f Ecology na Evolution, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

*Author for correspondence: mariangelazoot@yahoo.com.br (M.F. de Sá) and sgmonteiro@uol.com.br (S.G. Monteiro)

4.1 ABSTRACT

There are few developed researches that determine the environmental liabilities in relation to parasites present in the waste after their treatment. Our objectives were to evaluate the efficiency of automated composting process in obtaining a salubrious compost for later use in cultivation of vegetables. During the process of automated composting, three treatments were evaluated: T1 – addition of liquid pig manure (LPM); T2 – addition of LPM and retorted shale (RS) and T3 – addition of LPM + RS+ Dicianodiamide (DCD). The addition of LPM was realized weekly during 14 weeks. Control treatment (LPM) showed increase in egg count between the first and final addition of LPM, while in the maturation period there was a reduction. For the other treatments (LPM + RS and LPM + RS + DCD) there was a gradual reduction in total number of eggs from the beginning to the end addition of LPM, and also in maturation period. The LPM + RS + DCD treatment promoted total reduction in the number of eggs in the maturation period. The automated composting showed to be an efficient process for the treatment of LPM eliminating between 98 and 100% of helminth eggs.

Keywords: Eggs; helminths; treatment; organic matter; composting.

4.2 INTRODUCTION

The increasing technification and expansion of pig farms warns the need to correctly dispose residues resulting from that activity, directing the scientific community to seek differential treatment technologies that are efficient, with low cost and possible to be implanted (Rizzoni et al., 2012).

Among the researchers there is a consensus about the importance of impacts caused by the emission of greenhouse gases, agronomic potential and microbiological contamination generated by swine manure. However, there are few developed researches that determine the environmental liabilities in relation to parasites present in the waste after their treatment (Dos Santos et al., 2015). Among the main treatment systems currently used for liquid pig manure it can be mentioned biodigesters (Kunz et al., 2008), reactors Upflow anaerobic sludge blanket (UASB) (Pinto et al., 2014), compost row with subsequent soil application (Gonzatto et al., 2016), lagoon systems, biofilters, composting (Oliveira and Higarashi, 2006) and automated composting (Sá et al., 2014; Giacomini et al., 2014).

One of the major barrier to adoption of the composting for the handling of liquid pig manure is the great expense of labor to incorporate them to the substrates and to revolve of the tracks. In order to solve this problem, it was introduced in South of Brazil an innovative technology in composting process, an automated embodiment, which represents a large labor savings for pig farmer.

In this process, it occurs the distribution and homogenization of the LPM in a solid matrix (shavings and sawdust), which through revolving provides aeration and vapor precipitation (Serpa et al., 2013). With the technology of handling and treatment of waste through automated composting it is possible to: Convert liquid manure into a solid matrix (Oliveira & Higarashi, 2006); Concentrate nutrients in the compost (Dai Pra, 2006); Obtain a product with acceptable sanity, due the reduction of population of pathogenic microorganisms during the thermophilic phase of composting (Dai Pra et al., 2009; Sá et al., 2014).

Nevertheless, many advantages attributed to the automated composting process, there is still lack of greater support for research, especially for the conditions of Rio Grande do Sul State, where the process presents a clear trend of expansion in short and medium term.

For this, it is indispensable to know the pollutant potential for the environment by composting in relation to pathogenic parasites and sanity efficiency of the method (Moreira et al., 2015).

In 1980 through the Law 6894 of 16/12, organic substances that provide nutrients for plants were included as fertilizers (Brasil, 1980). This law has been amended through Normative Instructions (NI). The most recent, the NI 23 of August 31, 2005, which approved the definitions and norms of specifications and guarantees, tolerances, registration, packaging and labeling of the simple, mixed, compost, organomineral and biofertilizers destined for agriculture (Brasil, 2005) and which is revoked by NI 25 of July 23, 2009 (Brasil, 2009), up until the present date. This NI establishes the products or raw materials used as organic fertilizers.

As the mature LPM compost fits within the "A" class organic fertilizers of this NI and because it has great fertilizing potential (Brugnara et al., 2015), high organic matter content, which, besides supplying the nutritional needs of different crops, provides recovery and maintenance of soil quality, the objective of this paper was to evaluate the efficiency of the automated composting process in obtaining a sanitary compost within the norms required by current legislation.

4.3 MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted at Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), where the composting platform is located. The equipment "Vertical Composting Reverser" has three vertical helixes to rotate the substrate, four small metal wheels, responsible for its horizontal displacement on rails and a system of distribution of waste on the compost line. The effective working width of the equipment is 1.0 meter. The substrate used consisted of a mixture of 30% of shavings (360 kg) and 70% of sawdust (840 kg), totaling 1200 kg each.

Liquid pig manure was obtained from animals in the finishing stage, reared in conventional system, with total confinement up to the time of slaughter. The procedure for composting consisted on the construction of three rows with sawdust and shavings, which were revolved once a week by the equipment, totalizing 22 weeks. During 14 weeks, in each of the rows, the treatments were added weekly before the mechanized revolving.

Before each addition in the row, 1 L of LPM sample was collected and evaluated for the presence of parasites. For the already composted material, 100g were collected at four heights (20, 40, 60 and 80 cm), later these samples were homogenized to compose a single sample, one day before a new addition of waste in the row. The collected samples were put in a sterile bottle stored in polystyrene box with ice and taken to the Laboratório de Parasitologia Veterinária for the identification of parasites. Twenty-three samples of the compost were collected in triplicate during the composting period and 14 samples of LPM were collected.

Treatments evaluated were: T1- Addition of liquid pig manure (LPM); T2- Addition of LPM and retorted shale (10% RS) and T3- Addition of LPM + RS (10%) + Dicianodiamide (0.2% DCD). The ratio of DCD and RS was established in relation to the volume of LPM applied. Each treatment was allocated on a composting platform bed with three replicates of 1 meter each. The amount of LPM applied in each addition was around 0.4 L kg^{-1} of substrate (established according to the flow of the applicator pump). Each line had a slurry collection system, which was quantified and returned to the composting process. In addition to revolving that was carried out at the time of each application of the LPM and additives, in order to aerate the rows and incorporate the materials into the substrate, an additional revolving was performed, always three days after the treatments, to keep the system aerated, facilitating evaporation of water. Addition of LPM was performed weekly, for 14 weeks and after that time only one weekly revolving without application of LPM, RS and DCD was performed for eight weeks further, for compost maturation. The composting temperature was monitored

periodically with thermocouple type K probes, coupled to a data logger, at different battery heights. The monitoring of gravimetric moisture was performed weekly, through the collection of the composted material, drying and weighing the material. The pH of each compost row and the mineral N (NH_4^+ + and $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) contents were analyzed weekly according to methodology described by Tedesco et al. (1995). The evolution of these three attributes values served to indicate the degree of maturation of the organic compost, signing the moment to finish the experiment. For analyzing the sanity efficacy of the compost, all parasite eggs found in the process were evaluated using the Modified Baileger method with adaptations (SÁ et al., 2016 article in press).

4.3.1 Statistical Analysis

Statistical analyzes were performed using Statistica version 10 software, assuming $p < 0.05$ as a criterion of significance. All variables were previously tested for normality and homogeneity variance and logarithmized when necessary. The charts were created in the Sigmaplot 12.0 program. Variance analysis was used to verify: the difference in the total number of parasite eggs among the three treatments; The difference in the total number of eggs between the beginning and end addition of LPM (1st to 14th weeks) and maturation period of the compost (15th to 22nd weeks) for each treatments; The difference between the nitrogen compounds between each of the treatments; The difference in temperature between treatments and these in relation to ambient temperature; The difference in PH between treatments; The difference in percentage of dry matter between treatments and difference in parasites egg abundance of each order for each treatment. Correlation analysis was performed between total number of parasite eggs and temperature variables, dry matter and pH for each of the treatments.

4.4 RESULTS

There was no significant difference in the total number of parasite eggs per kg of compost in the weekly analysis between the three treatments (Fig. 1) The three treatments showed a significant difference in relation to the total number of parasite eggs when compared to initial period, end of addition (1st to 14th weeks) and maturation period (15th to 22nd weeks) (Table 1): LPM ($F = 225.30$; $p < 0.0001$); LPM + RS ($F = 116.30$, $p < 0.0001$); and LPM + RS + DCD ($F = 184.80$; $p < 0.0001$).

Control treatment (LPM) had an increase in number of helminth eggs, cysts and oocysts of protozoa from the beginning to the end of addition of LPM, however in the maturation period there was reduction. For the other treatments (LPM + RS and LPM + RS + DCD) there was a gradual reduction in the total number of helminth eggs, cysts and protozoal oocysts from the first to the final LPM addition, during the maturation period. The LPM + RS + DCD treatment promoted elimination of helminth eggs, cysts and protozoan oocysts during the maturation period of the compost.

Eggs of helminths of order Ascaridida were more abundant in all treatments (Table 2): LPM ($F = 10.38$; $p < 0.0001$); LPM + RS ($F = 12.53$; $p < 0.0001$); And LPM + RS + DCD ($F = 10.43$; $p < 0.0001$).

The LPM + RS treatment showed a lower amount of Amoebida cysts at the end of the experiment in relation to the control treatment (Fig. 2A) ($F = 8.25$; $p < 0.001$). The LPM + RS + DCD treatment showed a lower amount of oocysts of order Eucoccidiorida at the end of the experiment in relation to the control treatment (Fig 2B) ($F = 3.75$, $p < 0.05$). The other orders showed no significant difference between treatments: Ascarididae eggs ($F = 0.04$; $p > 0.05$); Strongylida eggs ($F = 1.38$, $p > 0.05$); and Enoplida eggs ($F = 0.28$, $p > 0.05$).

Nitrogen compounds that showed a significant difference between the treatments formed NH_4^+ (Fig. 3A) ($F = 4.38$, $p < 0.01$) and NO_2^- (Fig. 3B) ($F = 6.69$, $p < 0.005$), being

these compounds being less evidenced in LPM + RS treatment when compared to LPM + RS + DCD ($p < 0.05$, for both). The LPM + RS treatment also presented lower amount of NH_4^+ and NO_2^- in relation to the control (LPM), however this difference was not statistically significant. The compound NO_3^- showed no significant variation between treatments (Fig. 3C) ($F = 2.12$, $p > 0.05$). The percentage of dry matter in the compost was lower for the control treatment (LPM) (Fig. 4A) ($F = 27.88$; $p < 0.0001$) compared to LPM + RS and LPM + RS + DCD ($p < 0.0005$, for both).

Humidity was higher in LPM (Fig. 4B) ($F = 27.88$; $p < 0.0001$) compared to LPM + RS and LPM + RS + DCD ($p < 0.0005$, for both). All treatments had a higher temperature than the ambient temperature (Fig. 4C), however, only in the LPM + RS treatment, this difference was significant ($F = 111.01$; $p < 0.0001$). The LPM showed a higher temperature than LPM + RS treatment ($F = 85.18$; $p < 0.0001$) and LPM + RS showed a higher temperature compared to LPM + RS + DCD treatment ($F = 102.65$; $p < 0.0001$).

A negative correlation between the dry matter and total amount of helminth egg, cysts and protozoan oocysts was observed for LPM + RS + DCD treatment (Fig 5A) ($r = -0.49$; $p < 0.05$), whereas for the other treatments there was no correlation: LPM ($r = -0.15$; $p > 0.05$); and LPM + RS ($r = -0.31$; $p > 0.05$); a correlation between moisture and total amount of parasite eggs was found only for LPM + RS + DCD treatment (Fig 5B) ($R = 0.49$, $p < 0.05$), while for the other treatments there was no correlation: LPM ($r = 0.15$; $p > 0.05$); and LPM + RS ($r = 0.31$, $p > 0.05$). There was also a correlation between temperature and total parasite eggs in all treatments: LPM (Fig. 5C) ($r = 0.48$ $p < 0.05$), LPM + RS (Fig. 5D) ($r = 0.61$, $p < 0.005$) and LPM + RS + DCD (Fig. 5E) ($r = 0.95$, $p < 0.0001$). There was a difference between the pH of the three treatments ($F = 9.29$; $p < 0.0005$), as the pH of the control treatment (LPM) was higher than LPM + RS ($p < 0.0005$) and LPM + RS + DCD ($p < 0.0005$). The pH did not show correlation with total of parasite eggs for LPM treatments ($F = 0.21$; p

>0.05) and LPM + RS ($F = 0.24$; $p > 0.05$). However, pH showed a strong correlation with the total number of helminth eggs, cysts and protozoan oocysts for the LPM + RS + DCD treatment (Fig 5F) ($F = 0.21$; $p < 0.0001$).

4.5 DISCUSSION

Despite the innumerable advantages of using liquid pig manure, the presence of pathogens for man should be taken in account. Thus, the treatment performed prior to its incorporation into soil should be properly planned and monitored (Da Silva et al., 2015). The automated composting performed in this study proved to be efficient for sanitizing the compost with addition of retorted shale and dicyanodiamide (LPM + RS + DCD).

The increase in number of parasite eggs in control treatment (LPM) between the beginning and the end of the additions can be explained by the incorporation of LPM weekly, since occurred a reduction during maturation period. In other treatments, the gradual reduction was probably due the use of additives that inhibit the nitrifying bacteria during the first nitrification phase, thus retaining NH_4^+ and ammonia in the composting mass (Park et al., 2004). In the treatment with addition of DCD, total elimination of eggs, cysts and oocysts of parasites occurred from the nineteenth week of treatment and five weeks after total addition of manure. In other treatments, the decrease was much slower.

The weekly revolves after the final addition of manure to complete maturation of the compost proved to be a fundamental factor for reducing parasites mainly in the LPM + RS + DCD treatment, which at the end was free of these pathogens. It can be seen that the association of RS with DCD was efficient in reducing helminth eggs throughout the experiment. The reduction was gradual for the control (LPM) and LPM + RS treatments, and at the end of the experiment the egg reduction rates were 98% and 99%, respectively.

The results obtained in the LPM and LPM + RS treatments are in agreement with data found by Duarte et al. (2008), indicating that even after the composting process, parasite eggs can remain viable and produce infective larvae. The eggs found at the final of the experiment, from order Ascaridida had three morulae or more, showing that they were viable, the other orders of parasites were not found in the maturation compost. However, in the treatment where RS and DCD were associated to the compost, after maturation, elimination of 100% of helminth eggs and coccidia oocysts occurred.

This fact must be related to the inhibitory effect of RS and DCD on nitrification, which contributes to a higher retention of Nitrogen (N) in ammoniacal form (NH_4^+) (Damasceno, 2010), making the compost toxic to parasites. Doumer et al. (2011), when studying the effect of the RS on the biological characteristics of the microbiota indicative of quality soil, noticed an improvement in microbiological activity of the soil. This improvement was evidenced by the reduction of CO_2 emission without changing the carbon (C) of the microbial biomass and without causing a negative impact on the enzymatic activity of the soil. However, nothing is known about the effect of RS on helminths eggs, cysts, and protozoan oocysts.

McKinley et al. (2005) tested different levels of ammonia for inactivation of *Ascaris suum* eggs and even occurring almost entirely in NH_4^+ composition at relatively low concentrations (47-207 mg L^{-1}) were sufficient to inactivate the eggs, with a correlation of $R^2=0,87$, after a lag phase. Pecson et al. (2007) reported a 99% efficiency rate of inactivation of *A. suum* using initially NH_4^+ de 1000 mg L^{-1} and pH 10 for 12 weeks and a final concentration of 230 mg L^{-1} , a result similar to our study, where the final NH_4^+ concentration was 312 mg Kg^{-1} at a mean temperature of 40°C and pH 7.3.

Nordin et al. (2009), in conducting inactivation experiments of *A. suum* eggs, proposed a threshold concentration for inactivation at 280 mg L^{-1} . McKinley et al. (2012) indicated in

their studies that this threshold concentration may have values lower than 280 mg L⁻¹ when exposure times are longer, as occurs in the automated composting process, where the exposure time is around 180 days. In our study NH₄⁺ concentrations ranged from 130 to 3900 mg Kg⁻¹ of compost throughout the experiment, where the highest concentrations occurred in the association of LPM + RS + DCD, which may explain the fact that no eggs of *A. suum* were found in the matured compost.

The compost row reached thermophilic temperatures from the second addition of LPM. In all the rows, temperatures remained between 40 and 60°C throughout the period in which weekly LPM additions were performed to the twentieth week. Subsequently, due to the revolving and decomposition of organic matter, the temperature gradually fell as the compost matured. According to Li et al. (2011), this increase in temperature when LPM is added occurs due to microbial activity, accelerating decomposition of organic matter. Temperature levels found in this study are lower than those observed by Costa et al. (2009) and Fiori et al. (2008), which reported temperatures varying from 42 to 71 ° C during the composting process. A plausible explanation is due the fact that rows were revolved at the time of addition and three days later, facilitating the evaporation of the water and aerating the composting mass (Valente et al., 2015).

4.5 CONCLUSION

The automated composting showed to be an efficient process for the treatment of liquid pig manure eliminating between 98 and 100% of helminth eggs present. The use of additives such as RS and DCD contributed to the elimination of parasites in general, leaving the compost with sanity suitable for use as fertilizer in vegetables.

4.6 ACKNOWLEDGEMENTS

This paper was carried out with CNPQ financial assistance (benchmark rate) of the first author. The authors thank Prof. Dr. Celso Aita - Department of Soil Sciences, UFSM, for the availability of the material to be analyzed.

Declaration of interest.

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

4.7 REFERENCES

Brasil, 2004. Decreto n. 4954, de 14 de janeiro de 2004. Aprova o regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 15 jan. 2004a. Disponível em:

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/decreto/d4954.htm. Acesso em: 19 Agosto 2016.

Brasil, 2005. Instrução Normativa n. 23, de 31 de agosto de 2005. Definições e 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. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 08 set. 2005. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=20542>> Acesso em: 15 set. 2016.

- Brasil, 2009. Instrução Normativa n. 25, de 23 de julho de 2009. Normas sobre as especificações, as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos fertilizantes orgânicos simples, mistos, compostos, organominerais e biofertilizantes destinados à agricultura. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 28 jul. 2009. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=20542>> Acesso em: 18 out. 2016.
- Brugnara, E. C., Nesi, C. N., & Verona, L. A. F. 2014. Broiler litter and swine manure compost in substrates for yellow passion fruit seedlings. *Científica*, 42(3), 242-251.
- Costa, M. S. S. M.; Costa, L. A.M .; Silva, A. P. C. J.; Decaril, L. D.; Olibone, D. 2009. Composting of slaughterhouse solid waste. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. Campina Grande/PB v.13, n.1, p.100–107.
- Da Silva, G. R., Amaral, I. G., Galvão, J. R., Pinheiro, D. P., Da Silva Júnior, M. L., & Melo, N. C. 2015. Use of sludge tanning in production plants açazeiro in initial phase of development. *Brazilian Journal of Agricultural Sciences/Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 10(4).
- Dai Prá, M. A. 2006. Desenvolvimento de um sistema de compostagem para o tratamento de dejetos de suínos. 2006. 128f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Dai Prá, M. A., Corrêa, E.K. Xavier, E. G. Roll, V. F. B. 2009. Compostagem como alternativa para gestão ambiental na produção de suínos. Porto Alegre: Evangraf, .144p.
- Damasceno, F. 2010. Injection of pig slurry in soil and nitrification inhibitor as strategies to reduce ammonia and nitrous oxide emissions (doctoral dissertation, dissertação (mestrado ciência do solo) -Universidade Federal de Santa Maria, santa maria).

- Dos Santos, L. D., Mayerle, S. F., & Campos, L. M. D. S. 2015. Technologies and treatment systems for pig farming waste. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 9(5), 12-18.
- Doumer, M. E., Giacomini, S. J., Silveira, C. A. P., Weiler, D. A., bastos, L. M., & Freitas, L. D. 2011. Microbial and enzymatic activities in the soil after application of retorted oil shale. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46, 1538-1546.
- Duarte, E. R., Almeida, A. C., Cabra, B. L., Abrão, F. O., OLiveira, L. N., Fonseca, M. D., & Sampaio, R. A. 2008. Analysis of parasitological contamination in organic composts with sewage sludge and agricultural residues. *Ciência Rural*, 38(5), 1279-1285.
- Fiori, M. G. S., Schoenhals, M., & Follador, F. A. C. 2008. Analysis of the time-efficiency evolution of two agro-industrial wastes in The aerobic composting process. *Engenharia ambiental*, 5(3), 178-191.
- Giacomini, D. A., Aita, C., Pujol, S. B., Giacomini, S. J., Doneda, A., Cantú, R. R., . & Silveira, C. A. P. 2014. Mitigation of ammonia emissions by natural zeolites during pig slurry composting. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 49(7), 521-530.
- Gonzatto, R., Stüker, F., Aita, C., Giacomini, S. J., Lüdtke, R. C., Dessbesell, A., . & Pujol, S. B. 2016. Dicyandiamide as nitrification inhibitor of pig slurry ammonium nitrogen in soil. *Ciência Rural*, 46(5), 802-808.
- Kunz, A.; Bortoli, M.; Higarashi, M.M., 2008. Avaliação do manejo de diferentes substratos para compostagem de dejetos líquidos de suínos. *Acta Ambiental Catarinense*. 3 v. 5. n. 1/2, 2008.
- Mckinley, J. W., Parzen, R. E., & Mercado Guzmán, Á., 2012. Ammonia Inactivation of *Ascaris Ova* in Ecological Compost by Using Urine and Ash. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5133–5137. <http://doi.org/10.1128/AEM.00631-12>.

- Moreira, W. A., De Souza, R. P., Silva, M. R., & Sellitto, M. A. 2015. Reaproveitamento de resíduos e dejetos de criação animal em uma instituição federal no norte do Tocantins: estudo de caso. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 19(2), 1271-1283.
- Nordin A, Nyberg K, Vinnerås B., 2009. Inactivation of *Ascaris* eggs in source-separated urine and feces by ammonia at ambient temperatures. *Applied. Environmental. Microbiology*. 75:662– 667.
- Oliveira, P. A. V. de & Higarashi, M. M., 2006. Unidade de compostagem para o tratamento dos dejetos de suínos. Concórdia: *EMBRAPA-CNPSA*, 2006.39p.
- Park, S. M.; Jun, H. B.; Chung, Y. J.; Lee, S. H., 2004. Biological nitrogen removal using biosorbed internal organic carbon from piggery wastewater in a post-denitrification MLE process. *Water Science and Technology*. Vol 49. Nº 5. P.373-386. 2004.
- Pecson B.M., Barrios J.A., Jimenez B.E., Nelson K.L., 2007. The effects of temperature, pH, and ammonia concentration on the inactivation of *Ascaris* eggs in sewage sludge. *Water Research*. 41:2893–2902.
- Pinto, L. P., Cabral, A. C., Schneider, L. T., De Azevedo Frigo, K. D., Frigo, J. P., & Frigo, E. P., 2014. Levantamento de dados sobre os dejetos suínos e suas características. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, 3(3).
- Rizzoni, L.B.; Tobias, A.C.T.; Del Bianchi, M.; Garcia, J. A. D., 2012. Biodigestão anaeróbia no tratamento de dejetos de suínos. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.9, n.18, p.1-20.
- Sá, M. F., Aita, C., Doneda, A., Pujol, S. B., Cantú, R. R., Jacques, I. V. C., ... & Lopes, P. D., 2014. Population dynamics during composting of fecal automated pig slurry. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66(4), 1197-1206.

- Serpa Filho, R; Sehnem, S.; Cericato, A.; Santos Junior, S.; Fischer, A., 2013. Compostagem de dejetos de suínos. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, Maringá, v.6, p.47-78.
- Tedesco, M.J et al., 1995. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p. (Boletim Técnico, 5).
- Valente, B. S., & Xavier, E. G., 2015. Compostagem como ferramenta de gestão ambiental de carcaças de codornas. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 19(2), 649-657.

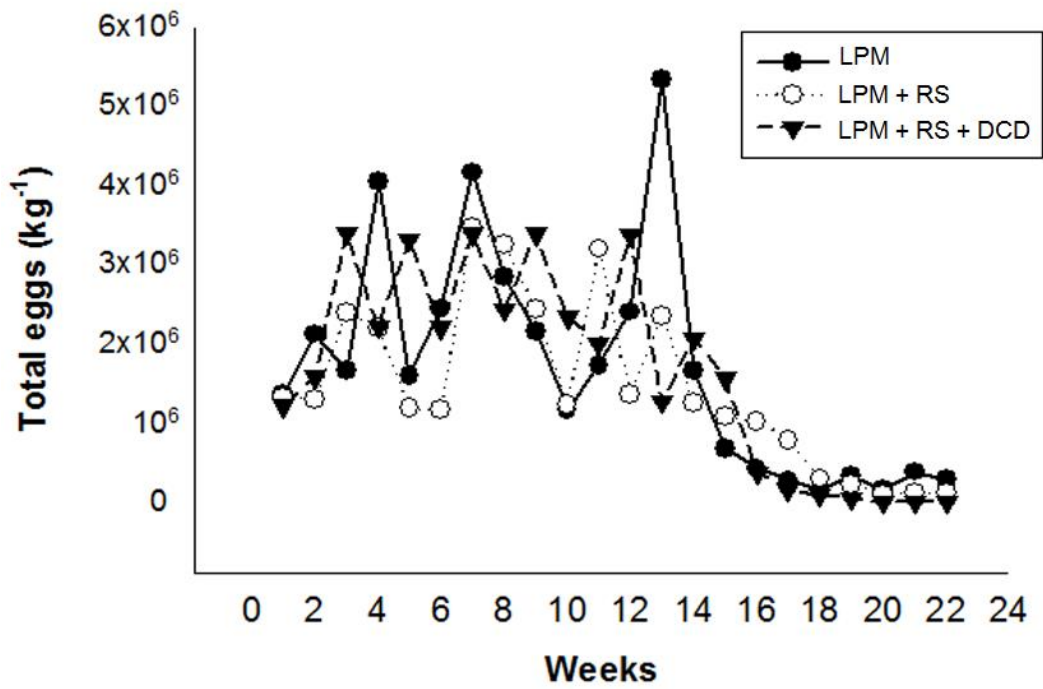


Fig. 1: Total number of parasite eggs found weekly in the three treatments (Liquid Pig manure (LPM), LPM + Retorted Shale (RS); and LPM + RS + Dicianodiamide (DCD)) throughout the experiment, by Kg⁻¹ of compost.

Table 1

Comparison between the total number of parasite eggs (kg^{-1} of compost) throughout the experiment in the three treatments.

	LPM	LPM+RS	LPM+RS+DCD
Addition start (A)	$1,3 \times 10^6 \pm$	$1,3 \times 10^6 \pm$	$1,2 \times 10^6 \pm$
	$1,4 \times 10^4 \text{ B, C}$	$4,7 \times 10^3 \text{ C}$	$5,4 \times 10^4 \text{ B, C}$
Addition end (week 14) (B)	$1,6 \times 10^6 \pm$	$1,2 \times 10^6 \pm$	$2,0 \times 10^6 \pm$
	$1,6 \times 10^4 \text{ A, C}$	$1,6 \times 10^3 \text{ C}$	$6,4 \times 10^3 \text{ A, C}$
After addition end (week 15-22) (C)	$2,9 \times 10^5 \pm$	$1,1 \times 10^5 \pm$	0 A, B
	$2,2 \times 10^3 \text{ A, B}$	$1,1 \times 10^3 \text{ A, B}$	

Post hoc analysis: significant differences ($p < 0.05$) between steps are indicated by letters. Each letter represents a step. Data are expressed as mean \pm standard errors.

Table 2

Comparison between the total number of eggs of each order of parasites (kg^{-1} compost) throughout the experiment in the three treatments.

	Ascaridida	Amoebida	Strongylida	Eucoccidiorida	Enoplida
LPM					
Addition start	$1,3 \times 10^6 \pm$ $1,4 \times 10^3$	0	0	0	0
Addition end (week 14)	$1,3 \times 10^6 \pm$ $5,9 \times 10^3$	$1,4 \times 10^5 \pm$ $3,6 \times 10^3$	$3,8 \times 10^4 \pm$ $8,4 \times 10$	$1,2 \times 10^5 \pm$ $7,3 \times 10^3$	$6,1 \times 10^3 \pm$ 6×10
After addition end (week 15-22)	$7,7 \times 10^3 \pm$ $1,2 \times 10^3$	$2,8 \times 10^5 \pm$ $2,1 \times 10^3$	0	0	0
LPM+RS					
Addition start	$1,2 \times 10^6 \pm$ $1,3 \times 10^2$	0	0	$1,4 \times 10^4 \pm$ $2,4 \times 10^2$	$3,2 \times 10^4 \pm$ $3,8 \times 10^2$
Addition end (week 14)	$1,1 \times 10^6 \pm$ $1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4 \pm$ $5,6 \times 10$	0	$4,4 \times 10^4 \pm$ $1,2 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3 \pm$ $5,3 \times 10$
After addition end (week 15-22)	$1,1 \times 10^5 \pm$ $1,1 \times 10^3$	0	0	0	0
LPM+RS+DCD					
Addition start	$1,2 \times 10^6 \pm$ $5,4 \times 10^3$	0	0	0	0
Addition end (week 14)	$1,1 \times 10^6 \pm$ $7,9 \times 10$	$9,4 \times 10^5 \pm$ $6,3 \times 10^3$	0	0	0
After addition end (week 15-22)	0	0	0	0	0

Data are expressed as mean \pm standard errors.

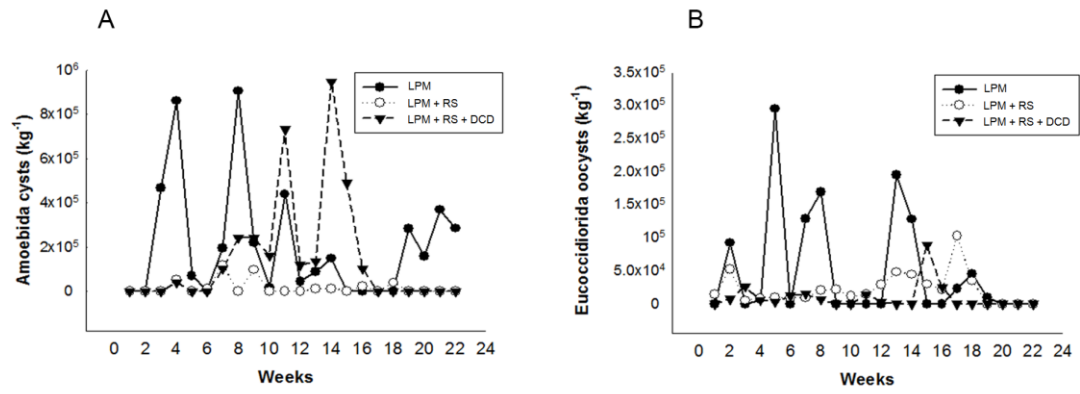


Fig. 2: Total number of protozoan cysts of orders Amoebida (A) and oocysts of Eucoccidiorida (B) found in the three treatments (Liquid Pig Manure (LPM); LPM + Retorted Shale (RS); and LPM + RS + Dicianodiamide (DCD)) throughout the experiment by Kg⁻¹ of compost.

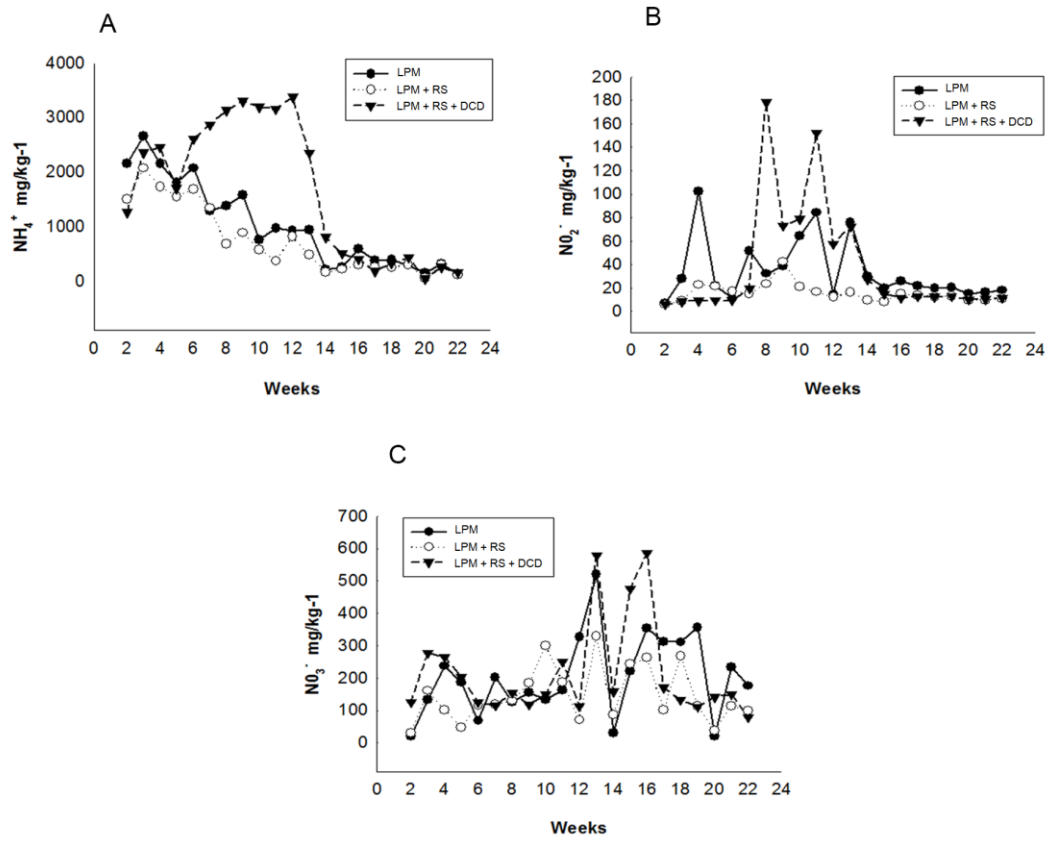


Fig. 3: Variation between nitrogenous compounds (A) Ammonium (NH_4^+), (B) Nitrite (NO_2^-) and (C) Nitrate (NO_3^-) throughout the experiment for each of the treatments, mg per Kg^{-1} compost.

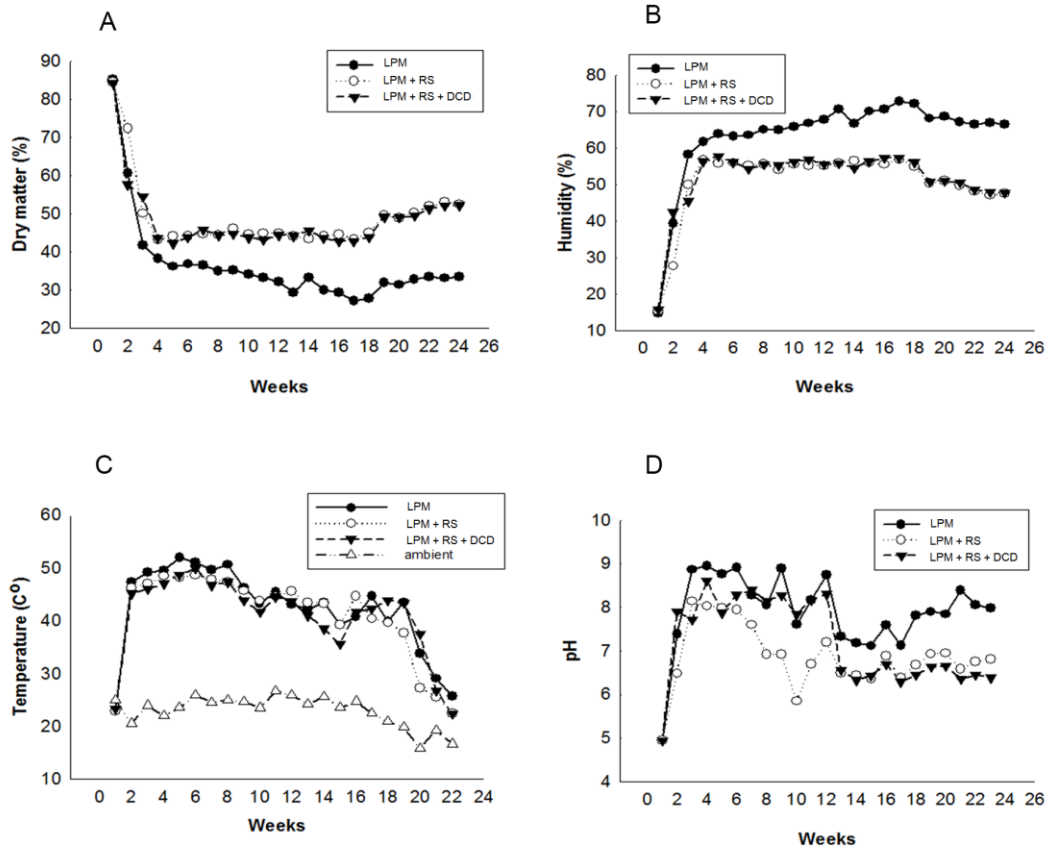


Fig.4: Variation in dry matter (A), humidity (B) temperature (C) and pH (D) of the compound throughout the experiment for each of the treatments.

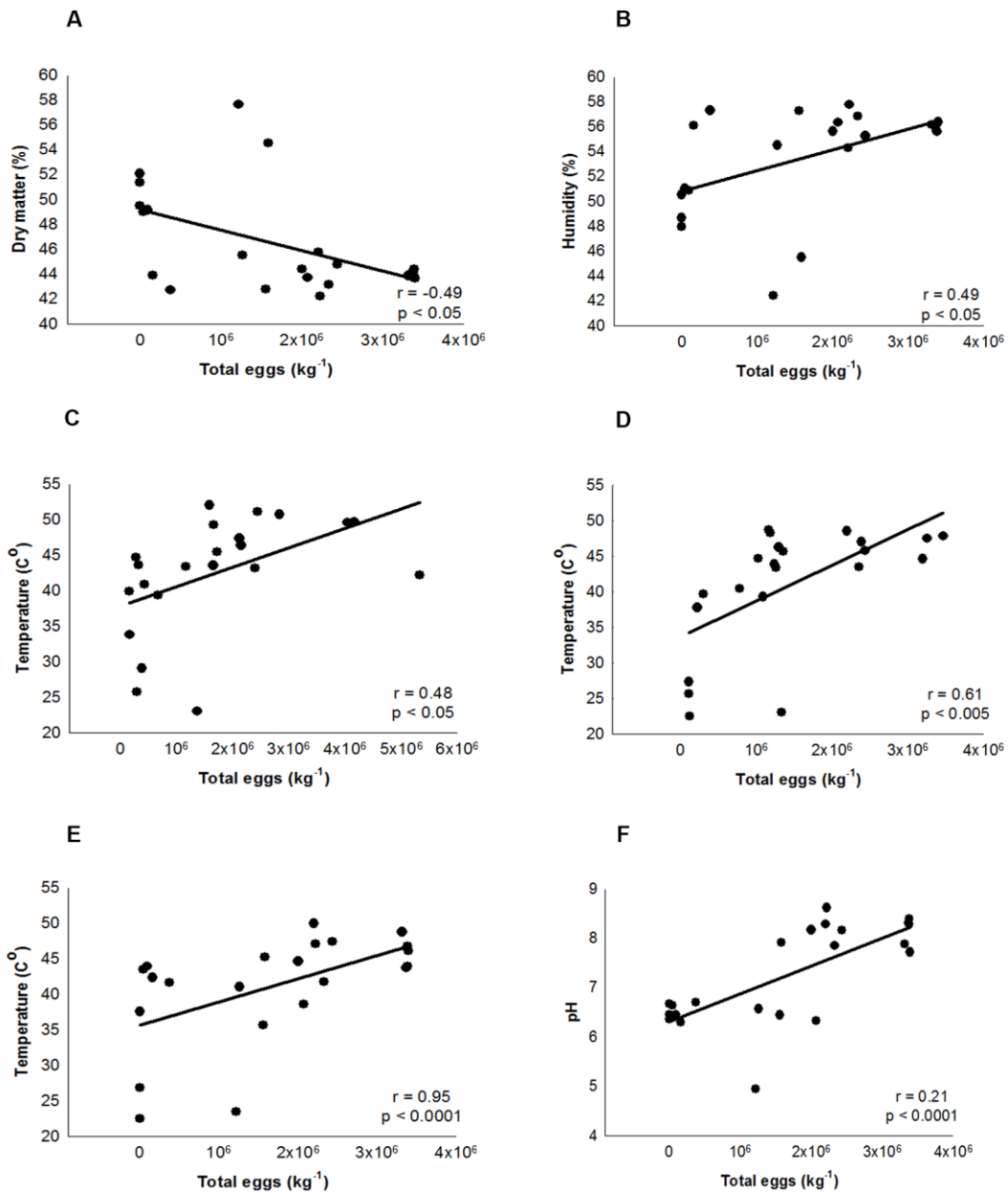


Fig. 5: Relation between: dry matter and Liquid Pig Manure (LPM) + Retorted Shale (RS) + Dicianodiamide (DCD) (A); Humidity and LPM + RS + DCD (B); Temperature and LPM (C), LPM + RS (D) and LPM + RS + DCD (E); pH and LPM + RS + DCD (D) for the total eggs per Kg⁻¹ of compost.

**5 CAPITULO IV: ARTIGO 3 - PARASITOLOGICAL ANALYSIS IN ARUGULA
(ERUCA SATIVA) CULTIVATED WITH ORGANIC COMPOST OF PIG MANURE**

(Artigo submetido a revista Food Control em 01.2017)

Mariangela Facco de Sá^{a*}, Lauren Lazarini Hoffmann^a, Diego Antonio Giacomini^b,
Janaína Dillmann^a, Ricardo Aymay Gonçalves^a, Eduarda Maria Trentin Santi^a, Celso Aita^b,
Silvia Gonzalez Monteiro^{a*}

^aDepartment of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

^bDepartament of Soil Science, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa
Maria, RS, Brazil.

*Author for correspondence: mariangelazoot@yahoo.com.br (M.F. de Sá) and
sgmonteiro@uol.com.br (S.G. Monteiro)

5.1 ABSTRACT

Fertilizers are necessary inputs that burden agricultural production. The compost from automated composting provides horticulturists a fertilizer with important nutritional value. However, as the compost is produced with animal waste, there is a risk of transmitting zoonoses. In order to determine the sanity of an organic compost obtained from the treatment of liquid pig manure (LPM), the present work evaluated the presence of parasites in arugula (*Eruca sativa*) fertilized with the compost containing eggs of *Ascaris*. The experimental design was performed in a randomized block design with four treatments: Control (C) (soil + NPK), T1 (soil + LPM compost (LPMC)), T2 (soil + LPMC with retorted shale (RS)) and T3 (soil + LPMC + RS with Dicianodiamide (DCD)), in plots of 0.75m², with three replicates. Three cuts were made in the arugula. No parasites were found in the arrays treated with the parasitized compost. However, some contaminants were found in the control group, such as eggs and adults of insect mites, eggs, larvae and adults, and some protozoa that compound the soil microbiota. The use of organic compost from LPM treated through the automated composting process, in the production of arugulas, was shown to be a promising alternative for organic horticulture.

Keywords: Organic matter, helminth eggs, parasites, automated compost.

5.2 INTRODUCTION

Fertilization is one of the agricultural practices with the highest costs for the production of vegetables. Organic fertilization is widely used by horticulturists to recover soils due to their intense cultivation. The cost of this recovery is high, elevating the price of vegetables to the final consumer. In search for alternatives that reduce cost of production, allowing the aggregation of values within the property, it is recommended the diversification of crops and the substitution of chemical fertilization by organic fertilization at small properties (Figueira, 2008; Balota et al., 2012).

The final compost from the automated composting, technology used to treat liquid wastes, provides farmers an organic fertilizer with important nutritional value (Santos et al., 2012). Because it is a product with high organic matter (OM) already decomposed, popularly known as humus, it is an important source of nutrients for plants because they have nitrogen, phosphorus, potassium, sulfur and micronutrients, which are released into the soil by microorganisms during the processes of decomposition and mineralization (Tu et al., 2006).

The organic fertilizer, when mixed with the soil, provides better aggregation, facilitating the infiltration of water and aeration of the cropping systems, stimulating the population density and diversity of microorganisms capable of transforming the organic matter into assimilable substances by plants (Santos et al., 2012). The nutrient concentration of an organic fertilizer is five to ten times smaller when compared to the mineral (FARIAS et al., 2013), but the action of OM is much broader, as it acts on soil structure and conditioning, with a better cation exchange capacity, which potentiates the nutrient uptake by the crop, and can be reflected in higher productivity (Mikkelsen, 2000).

In addition to being a sustainable practice, composting is more cost-effective when compared to the costs of production with chemical fertilizers, reducing considerably the final product value (Diniz et al., 2007). In Brazil, the vegetables planted area is of 946 thousand hectares, with an estimated production volume of 19.4 million tons (Embrapa Hortaliças, 2015). Among the crops grown in Brazil, arugula (*Eruca sativa*) is an edible annual plant, with short stature, belonging to the Brassicaceae family, which has been gaining ground in the consumer market since the 1990s (Oliveira et al., 2015).

Mostly eaten as a salad, it is also considered a medicinal plant with digestive, diuretic, depurative and antiasthmatic action, properties that value the culture and explain the increase in the quantity sold, which provide profitability to producers (Figueira, 2008). Arugula is rich in vitamin A and C, fibers, proteins and minerals such as iron, calcium, sulfur and potassium

(Ohta et al., 2016). The cultivation of this vegetable has increased in many countries of Europe (Reghin et al., 2005) and has been outstanding in the world scene for its nutritional and phytotherapeutic properties. In Brazil, this vegetable is very popular in regions of Italian colonization (Maia et al., 2007).

Conventional techniques in the production of vegetables promotes a marked change in cultivated soils (Da Cunha, 2015), which makes information about the use of organic fertilizers a need, based on scientific research, as an alternative to minimize the ecological imbalance caused by intensive chemical fertilization (Costa et al., 2015). The requirements of the Inspection bodies influence producers to seek new technologies that allow greater food production, through systems that comply with the requirements of environmental sustainability, food security and economic viability (Ragazzi, 2012).

The use of organic compost by horticulturists presents great advantages due to reutilization of large amounts of nutrients and organic matter, but on the other hand, presence of pathogenic organisms is one of the main obstacles that limits the use of this fertilizer (Hald & Baggesen, 2012). Bacteria, fungi, viruses, helminth eggs, cysts and protozoan oocysts can be introduced into the soil when using this kind of compost obtained from animal waste (ENVIRONMENT AGENCY, 2003a). The studies available in the scientific literature evaluating the presence of parasites in vegetables are scarce and the ingestion of these pathogens can cause public health problems. Aiming to determine the use viability of the organic compost obtained from the automated treated liquid pig manure, the objective of this paper was evaluate the presence of parasites with origin on the compost in the plantation of arugula.

5.3 MATERIALS AND METHODS

The study was carried out on a virgin soil where it was never performed the addition of any organic fertilizer. The experimental design was performed in a randomized block, consisting of 4 groups: Control (C) (Soil + NPK), T1 (Soil + Compost of Liquid Pig Manure (CLPM)), T2 (soil + CLPM + Retorted Shale (RS)) and T3 (soil + CLPM + RS with Dicianodiamide (DCD)). Each plot had 0.75 m² and three replications were performed. Groups T1 and T2 contained *Ascaris suum* eggs in the amounts shown in Table 1. The amount of compost used in each group varied according to the nutritional value of the same and recommended dose for cultivation of arugula (Tab.1). The amount in kg was calculated

by the formula $QD = A \times B / 100 \times C / 100 \times D$, as required by the culture where: A = amount of compost; B =% Dry Mass (DM); C =% of nutrient; D = efficiency level (rate of compost mineralization). The nutrient recommendation for arugula cultivation is around 165 Kg ha⁻¹ of Nitrogen (N), 150 Kg ha⁻¹ of Phosphorus (P) and 160 Kg ha⁻¹ of Potassium (K). In this experiment, a 20% higher amount was used (Table 1), guaranteeing a safety margin with sufficient levels of nutrients for the plantation. Compost was incorporated into the soil just before sowing the arugula.

Table 1 - Characterization of the compost used in sowing of arugula and quantity of *Ascaris suum* eggs per g of wet compost.

Tratamentos	Dry Mass	Content of N	Content of P	Content of K	Ammonium sulfate	Compost quantity	Egg of <i>Ascaris</i> sp. /g of wet compost.
		%				Kg m ⁻²	
Compost							
LPM (T1)	40	2,69	0,928	2,179	0,028	10,5	7.800
Compost							
LPM + RS (T2)	60	1,1	0,385	1,638	0,028	17	110.200
Compost							
LPM +RS + DCD (T3)	70	1,2	0,367	1,617	0,056	13,4	0,00

Arugula (*Eruca sativa*), broad leaf variety, was sown in a proportion of 5 g per m² in rows spaced 0.15 m. Sowing was carried out on March 16, 2016. Three cuts were performed to analyze the contamination of leaves to existing parasites in the organic compost used. The first cut was performed on April 15, 2016, when the plants were on average 18 cm high. The soil was stirred after cutting between the seeded columns. The second cut occurred 22 days later, when the plants were on average of 22 cm high. Again the soil between the plants was revolved and 30 days after the second cut the third cut was performed. For parasitological analysis, 3 samples of 100g of healthy leaves, suitable for human consumption, were collected in each plot, totaling 36 samples in each cut.

The plants were watered with 10 L m⁻² in each bed, with treated water free of parasites, whenever necessary. Parasitological analysis of the arugula was performed according to Takayanagui et al. (2007). After the collect, the leaves were stored in sterile

plastic bags and taken in a Styrofoam box, to the Laboratório de Parasitologia Veterinária of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). At the first wash, 250 mL of sterile deionized water were added to each package where arugula leaves were stored and then it was shaken manually for 30 seconds. Subsequently, the lavage water was filtered in 8 layers of sterile gauze and collected in a sterile container. For the second wash, the arugula leaves were wiped with a nº 16 brush in a sterile plastic refractory containing another 250 mL of sterile deionized water. The resulting washing water was also gauze filtered. This material was mixed to the previous one, completing the volume to 1000 mL in a settling cup and left for decantation by 24 hours (Guimarães et al., 2003).

After the 24 hour period, second stage of the sample processing was performed. Upon completion of sedimentation, the supernatant was carefully aspirated with the aid of 10 mL pipettes, the final 15 mL (containing the pellet) being transferred to a centrifuge tube. Next, the material was centrifuged at 3000 rpm for five minutes, discarding the supernatant.

After centrifugation, the obtained pellet was transferred in 0.2 ml aliquots onto glass slides with a drop of lugol and covered with cover slip for further examination under an optical microscope. A 50 µl aliquot of the sediment was transferred to a slide, where Ziehl-Neelsen staining was performed for *Cryptosporidium* sp. In the remaining pellet, 1:18 zinc sulfate was added until the volume of the falcon tube (approximately 12 ml) was complete, and the modified Faust method was performed for visualization and confirmation of helminth eggs, cysts and protozoan oocysts. All analyzes were performed in triplicate and the presence or absence of parasites was considered. In each block, an area of 30 cm² was marked for the collect of material used for calculating dry mass (kg⁻¹ m²). The leaves were packed in paper sacks for oven drying with forced air circulation at 65 °C for 72 hours (Silva, 2005).

5.4 RESULTS

The demand for vegetables produced through organic fertilization, free of pesticides, is growing among consumers. However, great care must be taken when using this type of fertilization in products consumed *in nature*, as these may contain pathogens of public health importance.

By using the organic compost processed from liquid pig manure (LPM) for planting the arugula, results obtained in the three cuts showed that all samples had some parasitic form, independent of the compost used, a result similar to those found by Santana et al. (2006).

Eggs of *Ancylostoma* sp. were found in the control treatments, LPM and LPM + RS, as shown in Table 1. No pig parasites were found in the leaves of arugula, even when they were present in the compost used.

During all the cuts, in all groups of this experiment, 100% of the samples were negative for contamination with swine helminth eggs (present in the compost used), *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp..

Table 2- Intensity of parasites found in arugula samples. (-) no parasite found per field read in the microscope (+) of one to five parasites per field read (++) of six to ten parasites per field read (+++) more than ten parasites per field read. The reading was performed throughout all the glass slide.

Treatment	Strongylida			Insects			Tracks			Arachnida			Free life larvae		
	1° cut	2° cut	3° cut	1° cut	2° cut	3° cut	1° cut	2° cut	3° cut	1° cut	2° cut	3° cut	1° cut	2° cut	3° cut
Control	++	++	+	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+	+	+++	+++	+++
LPM	++	+	-	++	++	++	++	++	++	+++	++	+++	++	++	++
LPM + RS	++	-	-	+++	++	++	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++
LPM + RS + DCD	-	-	-	+	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+

5.5 DISCUSSION

Parasitic contamination of arugula described in this study demonstrates conditions similar to those reported in other studies. Antunes et al. (2013), when carrying out studies on vegetables consumed in the south of Rio Grande do Sul, found out that arugula had the highest number of parasites. However, the constancy of enteroparasites has a great variation in several studies already carried out on vegetable samples (Takayanagui et al., 2001, Saraiva et al., 2005, Silvestre et al., 2009, Alves and Gregório et al. (2012) Costas-Neto and Rossesignoli, 2013). In general, ingestion of vegetables *in natura*, may lead to a large number of enteropathogens (Melo et al., 2011), becoming an important pathway for transmission of diseases with a significant impact on public health (Avcioglu et al., 2011).

The results found in this study are also in accordance with data found by Oliveira et al. (2015), which evaluated 200 arugula samples and found 100% positivity for some type of parasite. These authors report that the main route of contamination of these foods comes from the water used in artificial irrigation of vegetable gardens, another form of contagion is the contact of human fecal wastes or animals like rats and insects (Arbos et al., 2010). Baruffaldi et al. (1984) found indices of 20% contamination by ciliate protozoa, helminth eggs, amoeba cysts and Ancylostmidium eggs when evaluating five arugula samples. Takayanagui et al. (2001) found 40% contamination in 10 samples of this same vegetable, and reported the presence of *Toxocara* sp., indicating that vegetables were contaminated with feces from dogs, a result that corroborates and may explain the finding of Ancylostmidium eggs, indicating external contamination.

The degree of contamination is greater in vegetables with multiple leaves, by the great area of contact, because it allows greater fixation of parasitic forms. In addition to the plant structure, the cruciferous vegetables have higher contamination because they are in contact with the soil for a longer period and, therefore, continuously exposed to contamination (Erdogrul and Sener, 2005).

Guimarães et al. (2003), when evaluating 120 arugula samples, also found 100% positivity for some parasitic stage. Vieira et al. (2013) analyzed lettuce, watercress and arugula samples and found that the arugula had a greater predominance of parasites. Fernandes et al. (2014) when analyzing 20 samples of arugula collected in supermarkets

and free farms of Umuarama, PR, found 15% of contamination by eggs of *Toxocara* sp., this parasite represents a great concern in public health, since its larval form causes manifestations of the larva migrans visceralis syndrome, with severe pulmonary, neurological and ocular complications (MacPherson, 2013).

Barbosa et al. (2016) when analyzing 15 samples of different varieties and types of lettuce cultures collected in four supermarket chains of Teresina, PI, found 80% contamination rates with a discrete difference between conventional cultivation (100% in the green leaf lettuce and 60% in Iceberg lettuce variety, positives for parasites and larvae) and 80% of positive hydroponic lettuces for parasite and larvae, and the highest frequency of contamination was of fragments or whole forms of insects (such as moths of the genus *Lepisma* 53,33%), mites (adults and eggs, 26.66%), *Ancylostoma* spp. eggs (6.66%) and *Ascaris* spp. Eggs (6.66%).

Pereira et al. (2015) collected lettuce and arugula samples randomly in four commercial establishments (market and hydroponic gardens) in the city of Ji-Paraná, RO. They collected 12 samples of arugula and 12 of lettuce and found 100% positivity for some parasitic structure such as *Balantidium* sp., *Endolimax nana*, Ancylostomidium eggs and mites. These reports from the literature corroborate with the data found in this study and may explain the contamination with parasite forms found in the control group and that were not present in the compost added.

Vidigal et al. (1995) report that organic matter added to soil as organic fertilizer may have immediate effect on soil and/or residual effect, due to a slower decomposition process. The contamination levels of vegetables are mainly regulated by soil saturation, which with successive applications of swine manure increases the risk of contamination with pathogens and excess Nitrogen (N) in the organic form as verified by Dynia et al. (2006) and Oliveira et al. (2001) in Brazilian soils. The reason for the absence of helminths in this study can be explained by the fact that arugula was cultivated in soil that received organic matter from the pig manure compost for the first time. It can also be explained by the fact that the cruciferous vegetable has developed with enough vigor and so avoided the prolonged contact of leaves with the soil, which can be proven with the dry mass production rates per m².

Resolution n° 12 of 1978 from the National Food Standards Commission recommends the absence of dirtiness, parasites, eggs and larvae of helminths, so that the vegetables are considered acceptable for human consumption. Studies point that pig

manure, since properly stabilized prior to its addition in soil, as an organic fertilizer of excellence and widely tested in the production of grains and fodder (Konzen, 2002).

This study, besides showing the agronomic and economic benefits that the producer can obtain when using swine manure as an agricultural input, also demonstrates the parasitological contamination levels related to its use in the production of vegetables, especially those from organic cultivation, is rather unexpressive.

5.6 CONCLUSION

The organic compost from liquid pig manure did not promote changes in the contamination levels for parasitic forms found in arugula. Also, the compost proved to be efficient for the nutritional requirements of this vegetable. Thus, the uses of organic compost made from liquid pig manure treated through the automated composting process for the production of arugula have been proved to be a promising alternative.

5.7 ACKNOWLEDGEMENTS

This paper was carried out with CNPQ financial assistance (benchmark rate) of the first author.

Declaration of interest.

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

5.8 REFERENCES

Antunes, L., Vieira, J. N., Pereira, C. P., De Bastos, C. G. G., Nagel, A. S., & Villela, M. M. (2013). Parasitos em hortaliças comercializadas no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 12(1), 45-49.

- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2004. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Gerência-Geral de Tecnologia em Serviços e Saúde. Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, p384.
- Arbos, K. A.; Freitas, R. J. S.; STertz, S. C.; Carvalho, L. A. (2010) Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: sanitários e nutricionais. *Ciênc Tecnol Aliment*, v. 30, suppl. 1, p. 215-220, 2010.
- Avcioglu, H., Soykan, E., & Tarakci, U. (2011). Control of helminth contamination of raw vegetables by washing. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(2), 189-191.
- Balota, E. L., Machineski, O., & Matos, M. A. (2012). Soil microbial biomass under different tillage and levels of applied pig slurry. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 16(5), 487-495.
- Baruffaldi, R. et al. (1984) Tratamento químico de hortaliças poluídas. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 225-34,1984.
- BRASIL. 1978. Resolução Normativa nº 12/78. Aprova Normas Técnicas Especiais do Estado de São Paulo, relativa a alimentos e bebidas. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília.
- Costa, E. A., Figueiredo, E. A. T., Chaves, C., Almeida, P. C., Vasconcelos, N. M., Magalhães, I. M. C., ... & Paixão, L. M. N. (2013). Evaluation of microbiological lettuces (*Lacuta sativa* L.) conventional and organic and efficiency of two cases...*Alimentos e Nutrição Araraquara*, 23(3), 392.
- Costa, A. C., Oliveira, P. P., Carreço, R. L. B., do Santos Souza, M. P., Merson, A. A., & Lima, W. L. (2015). Evaluation of substrate for growing *Eruca sativa* L. (arugula). *Cadernos de Agroecologia*, 9(4).
- Da Cunha, D. A. (2015). Avaliação de impactos e adaptação às mudanças climáticas: modelos e análise do setor agrícola. *Revista de Economia e Agronegócio-REA*, 10(2).
- Dynia, J.F.; Souza, M.D. & Boeira, R.C. (2006). Nitrate leaching in a Typic Haplustox planted with mayze after successive applications of sewage sludge. *Pesq. Agropec. Bras.*, 41:855- 862, 2006
- Diniz Filho, E. T., De Oliveira, A. M., Nunes, C. G. F., De Lira, J. F. B., & De Mesquita, L. X. (2007). A prática da compostagem no manejo sustentável de solos. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 2(2).
- ENVIRONMENT AGENCY. Part 1- No overview of the treatment and use in agriculture of sewage sludge in relation to its impact on the environment and public health. *Methods for the Examination of Waters and Associated Materials*, UK, 2003a. 30p.

- Erdogru, O.; Sener, H. (2005). The contamination of various fruit and vegetable with *Enterobius vermicularis*, *Ascaris* eggs, *Entamoeba histolyca* cysts and *Giardia* cysts. *Food Control*, v. 16, n. 6, p. 557-560, 2005.
- Farias, A. P. D., Albuquerque, A. W. D., Moura Filho, G., & Reis, L. S. (2013). Productivity of *Heliconia psittarum* x *Heliconia pathocircinada* cv. Golden Torch under different sources of organic fertilizer. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 17(7), 713-720.
- Fernandes, K. C., De Almeida, R., Messa, V., & Da Silva, A. V. (2014). Enteroparasite contamination in vegetables from supermarkets markets and street markets in umuarama - pr. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 17(2), 115-119.
- Filgueira, F. A. R. Brassicáceas couves e plantas relacionadas. In: _____. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, MG: UFV, 2008. cap. 16, p. 279-299.
- Gregório, D.S; Moraes, G.F.A.; Nassif, J.M.; Alves, M.R.M.; Carmo, N.E.; Jarrouge, M.G.; Bouças, R.I.; Santos, A.C.C.; Bouças, T.R.J. (2012). Study of contamination by parasites in vegetables of the eastern region of são paulo. *Science in Health.*, 3(2): 96-103.
- Hald, T., & Baggesen, D. L. (2012). EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Panel; Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). European Food Safety Authority.
- MacPherson, C. N. The epidemiology and public importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v. 43, n. 12-13, p. 999-1008, 2013.
- Maia, A. F. C. de A.; Medeiros, D. C. de; Filho, J. L. Adubação orgânica em diferentes substratos na produção de mudas de rúcula. *Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil)*, v. 2, n. 2, p. 89-95, 2007.
- Melo A.C.F.L, Furtado, L.F.V, FERRO T.C, BEZERRA K.C, COSTA D.C.A, Costa LA, Silva LRS. Contaminação parasitária de alfaces e sua relação com enteroparasitoses em manipuladores de alimentos. *Rev Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas* 5: 47-52, 2011.
- Mikkelsen, R. (2000). Beneficial use of swine by-products: Opportunities for the future. *Soil Science Society of America*.
- Ohta, K., Takeshita, T., Funabashi, M., & Oda, S. (2016). Naturally grown rucola, *Eruca sativa*, contains more α -linolenic acid than conventionally grown rucola. *Plant Biotechnology*, (0).

- Oliveira, F.C.; Mattiazzo, M.E.; Marciano, C.R. & Moraes, S.O. (2001). Lixiviação de nitrato em um Latossolo Amarelo distrófico tratado com lodo de esgoto e cultivado com cana-de-açúcar. *Sci. Agric.*, 58:171-180, 2001.
- Oliveira, K. J. B., Da Silva Soares, A. P., Neto, F. B., & Linhares, P. C. A. (2015). Produção agroeconômica da rúcula fertilizada com diferentes quantidades de calotropis procera. DOI: 10.5216/teri. v5i2. 38791. *Revista Terceiro Incluído*, 5(2), 373-384.
- Pereira, B. G. M., Gois, R., Romão, N. F., Montanari, A., De Souza Silva, F. P., Cristofari, S. C., & De Oliveira, U. A. (2015). Avaliação parasitológica de hortaliças hidropônicas comercializadas no município de Ji-Paraná, RO. *Resumos Expandidos Apresentados no XIX Salão de Iniciação Científica*.
- Ragazzi, M. F. (2012). Estudo comparativo da qualidade parasitológica e toxicológica entre hortaliças cultivadas com água de reuso e hortaliças comercializadas em Ribeirão Preto-SP (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Reghin, M. Y.; Otto, R. F.; Olinik, J. R.; Jacoby, C. S. F. Effect of within row spacing and number of seedlings per hole on autumn and winter season. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, v. 29, n. 5, p. 953-959, 2005.
- Santos, V. B., Araújo, A. S., Leite, L. F., Nunes, L. A., & Melo, W. J. (2012). Soil microbial biomass and organic matter fractions during transition from conventional to organic farming systems. *Geoderma*, 170, 227-231.
- Takayanagui, O.M. et.al. Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasília, v.34, n.37-41, 2001.
- Takayanagui, O. M., Capuano, D. M., Oliveira, C. A., Bergamini, A. M., Okino, M. H., Castro E Silva, A. A., ... & Takayanagui, A. M. (2007). Evaluation of the contamination of lettuce crops after the establishment of the monitoring system in Ribeirão Preto, SP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(2), 239-241.
- Tu, C., Louws, F. J., Creamer, N. G., Mueller, J. P., Brownie, C., Fager, K., ... & Hu, S. (2006). Responses of soil microbial biomass and N availability to transition strategies from conventional to organic farming systems. *Agriculture, ecosystems & environment*, 113(1), 206-215.
- Vieira, J.N; Pereira, C.P.; Bastos, C.G.G.; Nagel, A.S.; Antunes, L.; Villela, M.M. (2013). Parasites in marketed vegetables in the southern of the Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. v.12, n.1, 2013.
- Yang, R., Jacobson, C., Gardner, G., Carmichael, I., Campbell, A.J.D., Ryan, U. (2013). Development of a quantitative PCR (qPCR) for *Giardia* and analysis of the prevalence, cyst shedding and genotypes of *Giardia* present in sheep across four states in Australia, *Experimental Parasitology*, 2013.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A compostagem automatizada de dejetos líquidos de suínos (DLS), recentemente inserida na região sul do Brasil, surge como uma alternativa econômica e ambientalmente viável para o tratamento desses resíduos orgânicos. O processo gera como produto final um composto orgânico que pode ser utilizado na ciclagem de nutrientes e como fonte de carbono ao solo. Embora este composto tenha potencial para ser utilizado em horticultura como fertilizante, conforme relatado na literatura consultada para a elaboração dessa tese, o conhecimento em relação a transmissão de zoonoses deste material orgânico ainda é bastante limitado. O desenvolvimento desta tese focou-se em três pontos críticos para o eficaz tratamento dos DLS.

Em um primeiro momento o objetivo foi verificar a técnica mais adequada para recuperação dos ovos de helmintos, cisto e oocistos de parasitos durante a compostagem dos DLS e suas modificações para um resultado confiável. Conforme descrito no artigo 1 onde a técnica de Bailenger com algumas adaptações mostrou maior recuperação de ovos, uma vez que o composto final possui baixo índice de umidade e alto teor de matéria orgânica, o que poderia dificultar e subestimar a recuperação desses parasitos.

A partir da técnica adaptada as amostras coletadas semanalmente foram analisadas a fim de verificar se o processo de compostagem apresentou eficácia na eliminação dos parasitos contidos nos DLS. Os resultados são descritos no artigo 2 onde verificou-se que a associação do aditivo Xisto Retornado (XR) e da molécula orgânica Dicianodiamida (DCD) durante o processo de compostagem apresentou significativa redução no número de ovos de helmintos, quando comparado com os demais tratamentos.

Visando determinar se o composto orgânico obtido a partir do tratamento dos DLS, poderia causar impactos na saúde humana, avaliou-se a presença de parasitos em rúcula (*Eruca sativa*) adubado com o composto de DLS. Todos os compostos orgânicos oriundos do tratamento dos DLS foram testados em cultivares de rúcula e após analisar as folhas de rúcula não foram encontrados parasitos de suínos mesmo quando estes ainda estavam presentes no composto no momento da semeadura do cultivar.

No entanto, deve-se levar em consideração que foram realizadas somente análises relativas a presença e ausência de parasitos nas folhas de rúcula. Para maior segurança em saúde pública outras análises bioquímicas, como absorção de metais

pesados e análises microbiológicas devem ser realizadas, as quais este trabalho não contemplou. No Brasil a DCD é disponibilizada na forma do produto Agrotain plus, não sendo comercializada isoladamente, o que encarece a utilização pelos produtores.

7 CONCLUSÕES

- As adaptações realizadas no método de Bailenger modificado foram fundamentais para uma melhor recuperação de ovos de helmintos, cistos e oocistos de protozoários no dejetos líquido de suínos compostado.

- A compostagem automatizada mostrou ser um processo eficiente para o tratamento de dejetos líquidos de suínos eliminando entre 98 e 100% dos ovos de helmintos presentes nos DLS. O uso dos aditivos XR e DCD contribuíram para a eliminação de parasitos em geral, deixando o composto com sanidade adequada para utilização como fertilizante em hortaliças.

- O composto orgânico oriundo de dejetos líquidos de suínos não promoveu alteração no índice de contaminação para as formas parasitárias encontradas na rúcula. O composto mostrou-se eficiente em suprir as necessidades nutricionais requeridas por essa hortaliça.

- A utilização de composto orgânico oriundo de dejetos líquidos suínos tratados através do processo de compostagem automatizado para a produção de rúculas mostrou-se uma alternativa promissora.

8 REFERÊNCIAS

- ABPA- Associação Brasileira de Proteína animal- Relatório anual, 2015. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf> Acesso em 12.12.2016.
- ACEDO, C. S. et al. **Coccidiosis Porcina**. França, Disponível em: <<http://www.exopol.com/default.html>> Acesso em: 04 dez. 2004.
- AITA, C., et al., Redução na velocidade da nitrificação no solo após aplicação de cama de aviário com dicianodiamida **Ciência Rural**, vol. 43, núm. 8, agosto, pp. 1387-1392, 2013.
- AITA, C., et al. Injection of Dicyandiamide-Treated Pig Slurry Reduced Ammonia Volatilization without Enhancing Soil Nitrous Oxide Emissions from No-Till Corn in Southern Brazil. **Journal of Environmental Quality**, v. 43, p. 789-800, 2014.
- ALOISIO, F., et al. Severe weight loss in lambs infected with *Giardia duodenalis* assemblage B. **Veterinary Parasitology** 142, 154-158. 2006.
- Al-QODAH, Z. **Adsorption of Dyes Using Shale Oil Ash**. Water Resources, v. 34, n. 17, pp. 4295-4303, 2000.
- ANDERSEN, S., JORGENSEN, R. J., NANSEN, P., & NIELSEN, K. Experimental *Ascaris suum* infection in piglets. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology**, 81(6), 650-656, 1973.
- ANDERSON, T.J.C. *Ascaris* infections in humans from North America: molecular evidence for cross-infection. **Parasitology** 110 215-219, 1995.
- ANDERSON, T.J.C. The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. **Trends Parasitol**, 17:183-188, 2001.
- ANDERSON, T.J.C.; ROMERO-ABAL, M.; JAENIKE, J. Genetic structure and epidemiology of *Ascaris* populations: patterns of host affiliation in Guatemala. **Parasitology**, 107:319-334, 1993.
- ANDREOLI, C.V.; TAMANINI, C.R.; HOLSBACH, B.; PEGORINI, E.S.; NEVES, P.S. “Uso de lodo de Esgoto na Produção de Substrato Vegetal”. In: Andreoli, C. V (ed). **Alternativas de Uso de resíduos do Saneamento** – Projeto PROSAB, Rio de Janeiro, ABES, 2006.
- ANGNES, G., et al. Correlation denitrifying catabolic genes with N₂O an N₂ emissions from swine slurry composting. **Bioresource Technol.**, 140:368-375, 2013.
- ANSEL, M., THIBAUT, M. Value of the specific distinction between *Ascaris lumbricoides* Linné 1758 and *Ascaris suum* Goeze 1782. **Int J Parasitol** 3: 317-319, 1973.

ASING, J., SAGGAR, S., SINGH, J., & BOLAN, N. S. Assessment of nitrogen losses from urea and an organic manure with and without nitrification inhibitor, dicyandiamide, applied to lettuce under glasshouse conditions. **Soil Research**, 46(7), 535-541, 2008.

BARNEZE, A. S., MAZZETTO, A. M., ZANI, C. F., MISSELBROOK, T., & CERRI, C. C. Nitrous oxide emissions from soil due to urine deposition by grazing cattle in Brazil. **Atmospheric Environment**, 92, 394-397, 2014.

BARROS, F.M., et al. Mineralização de nitrogênio em dejetos de suínos. Enc. Biosf. **Centro Científico Conhecer**, v.7, p.1, 2011.

BASSO, C.J.; CERETTA, C.A.; FLORES, E.M. de M.; GIROTTO, E. Teores totais de metais pesados no solo após aplicação de dejetos líquidos de suínos. **Ciência Rural**, v.42, p.653-659, 2012. DOI: 10.1590/S0103-84782012000400012.

BAUTISTA, J.M.; KIM, H.; AHN, D.-H.; ZHANG, R.; OH, Y.-S. Changes in physicochemical properties and gaseous emissions of composting swine manure amended with alum and zeolite. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v.28, p.189-194, 2011.

BAY, T. et al. **Caracterização de amostra de solo condicionada com xisto retornado**. 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Florianópolis, 2011.

BERNANDER, R., PALM, J.E., SVARD, S.G. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cell Microbiology** 3, 55-62, 2001.

BRUNETTO, G., et al. Changes in soil acidity and organic carbon in a sandy Typic Hapludalf after medium-term pig slurry and deep-litter application. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.36, p.1620-1628, 2012. DOI: 10.1590/S0100-06832012000500026.

BUCKLEY, J.J.C. An observation on human resistance to infection with *Ascaris* from the pig. **J Helminthol** 9: 45-46, 1931.

CALDERARO, F.F. et al. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**. v.68, n.1, p. 29-34, jan./jun. 2001.

CERETTA, C.A.; DURIGON, R.; BASSO, C.J.; BARCELLOS, L.A.R.; VIEIRA, F.C.B. Características químicas de solo sob aplicação de esterco líquido de suínos em pastagem natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.729-735, 2003. DOI: 10.1590/S0100-204X2003000600009.

CHAVES, L. H. G.; VASCONCELOS, A. C. F. Alterações de atributos químicos do solo e do crescimento de plantas de milho pela aplicação de xisto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 1, p. 84-88, 2006.

CHEFRANOVA IU, A. [Ovocidal effect of anhydrous ammonia on ascarid eggs in a laboratory experiment]. **Med Parazitol (Mosk)**, 46(6), 688-692, 1977.

CHEFRANOVA IU, A., PETRANOVSKAIA, M. R., & KHODAKOVA, V. I. Disinfecting effect of ammonia on the eggs of helminths (*Trichocephalus muris* and *Diphyllobothrium latum*) and enterobacteria. **Med Parazitol (Mosk)**, 47(1), 99-101, 1978.

CHIUMENTI, A.; BORSO, F. da; RODAR, R.; CHIUMENTI, R., Swine manure composting by means of experimental turning equipment. **Waste Management**, 27: 1774-1782, 2007.

CORDERO DEL CAMPILLO, M. & ARGÜELLO, M. R. H. Estrongiloidosis. In Cordero del Campillo, M., Rojo Vázquez, F. A., Martínez Fernández, A. R., Sánchez Acedo, C., Hernández Rodríguez, S., Navarrete López-Cozar, I., Díez Baños, P., Quiroz Romero, H. & Carvalho Varela, M., **Parasitología Veterinária**. (pp. 467-469), 2002c. Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana de España, S. A. U.

CORDERO DEL CAMPILLO, M. & ARGÜELLO, M. R. H. Tricuriosis. **Parasitología Veterinária**. (pp. 478-480), 2002e. Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana de España, S. A. U.

COTTA, J. A.O.; CARVALHO, N. L.C.; BRUM, T.S.; REZENDE, M.O.O. Compostagem versus vermicompostagem: comparação das técnicas utilizando resíduos vegetais, esterco bovino e serragem. **Eng Sanit Ambient** | v.20 n.1 pg. 65-78 | 2015.

CREWE W, SMITH DH: Human infection with pig *Ascaris* (*A. suum*). **Ann Trop. Med Parasitol**, 65:85, 1971.

DA SILVA, M. A. et al. Intestinal mucosa structure of broiler chickens infected experimentally with *Eimeria tenella* and treated with essential oil of oregano. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1471-1477, 2009.

DAI PRÁ, M. A. **Desenvolvimento de um sistema de compostagem para o tratamento de dejetos de suínos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 128f, 2006.

DAI PRÁ, M. A. et al. Compostagem como alternativa para gestão ambiental na produção de suínos. Porto Alegre: **Evangraf**, 2009.144p.

DAMASCENO, F. **Injeção de dejetos de suínos no solo e inibidor de nitrificação como estratégias para reduzir as emissões de amônia e óxido nítrico**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, RS, 121f, 2010.

DOBZHANSKY, T. *Genetics and the Origin of Species*, **Columbia University Press**, New York, 1937.

DOLD, C., HOLLAND, C.V. *Ascaris* and ascariasis. **Microb. Infect.** 13, 632-637, 2011a.

DOUMER, M. E. et al. Atividade microbiana e enzimática em solo após a aplicação de xisto retortado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 11, p. 1538-1546, nov. 2011.

FAYER, R.; UNGAR, B.L.P. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. **Microbiology Reviews**. v.50, p. 458-483, 1986.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008.

FLETA, J. et al. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extra-intestinal tissue of sheep and pigs. **Veterinary Parasitology**. v.59, n. 3-4, p. 201-205, 1995.

FREIRE, R.L. et al. Ocorrência de *Cryptosporidium spp* em leitões com diarreia em granjas suínolas do Paraná. CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, VII, 1995, Foz do Iguaçu. **Anais**. Foz do Iguaçu: Comissão científica do VII congresso brasileiro dos veterinários especialistas em suínos, 1995, p.93.

FRONTERA CARRIÓN, E. M., PÉREZ MARTÍN, J. E., ALCAIDE, M., REINA ESOJO, D. Coccidiosis. Em Frontera Carrión, E. M. e Serrano Aguilera, F. **J. Patología parasitaria porcina en imágenes**. Servet (Ed.). (pp.3-16), 2009c. Zaragoza, España.

FRYE, W. Nitrification inhibition for nitrogen efficiency and environment protection. In "Proceedings of the IFA International **Workshop** on Enhanced-Efficiency Fertilizers". Frankfurt, Germany, 28–30 June 2005.

GALVIN TJ: Development of human and pig *Ascaris* in the pig and rabbit. *J Parasitol*, 54:1085-1091, 1968.

GEORGI, J.R.; WHITLOCK, J.H. Nematóides: Classificação e Identificação I. In: _____. **Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro: Ed. Interamericana, 1982.p.85-99.

GEURDEN, T., CLAEREBOU, E., VERCRUYSSSE, J., BERKVEN, D. Estimation of diagnostic test characteristics and prevalence of *Giardia duodenalis* in dairy calves in Belgium using a Bayesian approach. **International Journal for Parasitology** 34, 1121-1127, 2004.

GIACOMINI, D. A., et al. Mitigação das emissões de amônia por zeólitas naturais durante a compostagem de dejetos de suínos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 7, p. 521-530, julho. 2014.

GILLESPIE, T. R., E. C. GREINER, AND C. A. CHAPMAN. Gastrointestinal parasites of the colobus monkeys of Uganda. **J. Parasitol.** 91:569–573, 2005.

GIROTTO, E., et al. Acúmulo e formas de cobre e zinco no solo após aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.955-965, 2010. DOI: 10.1590/S0100-06832010000300037

- GOMES, A.I.J.G. **Contribuição para a caracterização do parasitismo gastrointestinal e pulmonar em suínos de raça alentejana no distrito de Évora.** Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa, 2009.
- GONZATTO, R. et al. "Dicyandiamide as nitrification inhibitor of pig slurry ammonium nitrogen in soil." **Ciência Rural** 46.5, p. 802-808, 2016.
- GUARDINI, R. et al. Accumulation of phosphorus fractions in typic Hapludalf soil after long-term application of pig slurry and deep pig litter in a no-tillage system. **Nutrient Cycling Agroecosystems**, v.93, p.215-225, 2012. DOI: 10.1007/s10705-012-9511-3.
- GUSELLE, N.J.; APPELBEE, A.J.; OLSON, M.E. Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. **Veterinary Parasitology**. v.113, p. 7-18, 2003.
- HAHN, L., et al. Persistência de patógenos e do antibiótico salinomicina em pilhas de compostagem de cama de aviário. **Archivos de zootecnia**, 61(234), 279-285, 2012.
- HAQ, A., et al. Experimental infection of rhesus monkeys with *Entamoeba histolytica* mimics human infection. **Lab. Anim. Sci.** 35:481–484, 1985.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário.** Produção da pecuária municipal 2014. Disponível em www.ibge.gov.br, acesso em 10 de março de 2016.
- IZUMIYAMA, S. et al. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infections in weaned piglets and fattening porkers in Kanagawa Prefecture, Japan. **Japanese Journal of Infectious Disease**. v.54, p. 23-26, 2001.
- JACOBSEN, C.S.; BECH, T.B. Soil survival of Salmonella and transfer to fresh water and fresh produce. **Food Res. Internat.**, v.45, p.557-566, 2012.
- JIANG, T., et al. Gaseous emission during the composting of pig feces from Chinese Ganqinfen system. **Chemosphere**, 90, 1545–1551. 2013.
- KARERE, G. M., and E. MUNENE. Some gastro-intestinal tract parasites in wild De Brazza's monkeys (*Cercopithecus neglectus*) in Kenya. **Vet. Parasitol.** 110:153–157, 2002.
- KELLIHER, F.M., et al. The temperature dependence of dicyandiamide (DCD) degradation in soils: A data synthesis. **Soil Biology and Biochemistry**, 40: 1878-1882, 2008.
- KENNEDY, G.A. et al. Criptosporidiosis in three pigs. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.170, p. 348-350, 1977.

KUNZ, A., BORTOLI, M., & HIGARASHI, M. M. Avaliação do manejo de diferentes substratos para compostagem de dejetos líquidos de suínos. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, 5(1/2), 7-19, 2008.

KURIMOTO, H. Morphological, biochemical and immunological studies on *Ascaris lumbricoides* Linnaeus, 1758 and *Ascaris suum* Goeze, 1782. **Jpn J Parasitol** 23: 251-267, 1974.

LAMANN, G.V. Veterinary Parasitology. **Nova Biomedical Press**, 1ª ed. 323p., 2010.

LEÃO, R. E., et al., (2014). A adição de xisto retortado aumenta a retenção do carbono de resíduos vegetais no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 49(10), 818-822, 2014.

LELES, D., et al. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species?. **Parasites & vectors**, 5(1), 1, 2012.

LESSA, A. C. R., et al. (in press). Bovine urine and dung deposited on Brazilian savannah pastures contribute differently to direct and indirect soil nitrous oxide emissions. **Agriculture, Ecosystems and Environmental**, Amsterdam. Aceito 6 jan. 2014.

LEVECKE, B., et al. Molecular identification of *Entamoeba* spp. in captive nonhuman primates. **J Clin Microbiol**. 2010;48:2988–90. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00013-10>

LIMA, J. "Coccidiose Dos Ruminantes Domésticos." **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 13 (Supl 1): 9–13, 2004.

LORD WD, BULLOCK WL: Swine *Ascaris* in humans. **N Engl J Med** 1982, 306:113.

LOREILLE, O. and FRANÇOISE, B. "Evolution of ascariasis in humans and pigs: a multi-disciplinary approach." **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** (2003): 39-46.

LOURENZI, C.R. et al. Nutrients in soil layers under no-tillage after successive pig slurry applications. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.37, p.157-167, 2013. DOI: 10.1590/ S0100-06832013000100016.

LOURENZI, C.R., et al. Soil chemical properties related to acidity under successive pig slurry applications. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.1827-1836, 2011. DOI: 10.1590/ S0100-06832011000500037.

LOURENZI, C.R., et al. Pig slurry and nutrient accumulation and dry matter and grain yield in various crops. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.38, p.949-958, 2014. DOI: 10.1590/S0100-06832014000300027.

LUCHESE, F.C., et al. Prevalência de espécies de *Eimeria* em frangos de criação industrial e alternativa. **Braz J Vet Res Anim Sci**, 44: 81-86, 2007.

- MACHADO, Nádia Regina C. F.; BIGATÃO, Denise Maria M. M. Utilização de Zeólitas Sintetizadas a Partir de Xisto Retortado na Remoção de Arsênio em Águas Contaminadas. **Química Nova**, Maringá, PR, Vol. 30, No. 5, 1108-1114, 2007.
- MAIA, A. F. C. de A.; MEDEIROS, D. C. de; FILHO, J. L. Adubação orgânica em diferentes substratos na produção de mudas de rúcula. **Revista Verde** (Mossoró – RN – Brasil), v. 2, n. 2, p. 89-95, 2007.
- MÁRQUEZ-MONTER, FUENTES-OROZCO, H., R., CORREA-LEMUS, I., AND BECKER, I. Invasive amebiasis in a spider monkey (*Ateles geoffroyi*). Case report and a short review of the literature of amebiasis in nonhuman primates. **Arch. Invest. Med.** (Mex.) **21**:75–78, 1991.
- MATSUBAYASHI. K. High prevalence of infection with *Entamoeba dispar*, but not *E. histolytica*, in captive macaques. **Parasitol. Res.** **87**:14–17, 2001.
- MATTIAS, J.L., et al. Copper, zinc and manganese in soils of two watersheds in Santa Catarina with intensive use of pig slurry. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.1445-1454, 2010. DOI: 10.1590/ S0100-06832010000400040.
- MENDEZ, J. M., JIMENEZ, B., & MAYA, C. Disinfection kinetics of pathogens in physicochemical sludge treated with ammonia. **Water Science and Technology**, 50(9), 67-74, 2004.
- MENEZES, R.A.O. "Caracterização epidemiológica das enteroparasitoses evidenciadas na população atendida na unidade básica de saúde congós no município de macapá-amapá." Macapá-AP. Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde 4 (2013).
- MILLER, L.A., et al. Ascariasis in humans and pigs on small-scale farms, Maine, USA, 2010–2013, 2015. **Emerg Infect Dis.** <http://dx.doi.org/10.3201/eid2102.140048>
- MONTEIRO, S.G. Parasitologia na medicina veterinária. **Editora Roca**, 1ª Edição, pg. 254-255, 2010.
- MORENO, A. M., et al. Endoparasitoses. In: SOBESTIANSKY, J. & BARCELLOS, D. **Doenças dos Suínos**. Cânone Editorial. Goiânia, p. 373-377, 2007.
- MUNENE, E., et al. Helminth and protozoan gastrointestinal tract (GIT) parasites in captive and wild-trapped African nonhuman primates. **Vet. Parasitol.** 78:195–201, 1998.
- MURRELL, K.D., et al. *Ascaris suum*: a revision of its early migratory path and implications for human ascariasis. **J Parasitol** 83: 255- 260, 1997.
- NADLER SA. Biochemical and immunological systematics of some ascaridoid nematodes: genetic divergence between congeners. **J Parasitol** 73: 811-816, 1987.
- NASCIMENTO, C., et al. Importância da *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba coli* no homem e nos animais domésticos. **Ata Parasitológica Portuguesa**. 17(2): 121, 2010.

NEVES, M. D. G. C. **Contribuição para a caracterização do parasitismo em suínos de raça Ibérica e javalis silvestres das Comunidades Autónomas da Extremadura e Castilla y León (Espanha) e dos factores de risco associados** (Doctoral dissertation, Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária), 2013.

NORDIN A, NYBERG K, VINNERÅS B. Inactivation of *Ascaris* eggs in source separated urine and feces by ammonia at ambient temperatures. **Appl. Environ. Microbiol.** 75:662– 667, 2009.

NORMAN, F.F., et al. Neglected Tropical Diseases outside the Tropics. **PLoS Negl Trop Dis** 4 (7): e762, 2010.

NUNES, M. L. A. **“Avaliação de procedimentos operacionais na compostagem de dejetos de suínos.”** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2003. 117 f.

NYDAM, D.V., WADE, S.E., SCHAAF, S.L., MOHAMMED, H.O. Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp cysts shed by dairy calves after natural infection. **American Journal of Veterinary Research** 62, 1612-1615, 2001.

OHTA, K., TAKESHITA, T., FUNABASHI, M., & ODA, S. Naturally grown rucola, *Eruca sativa*, contains more α -linolenic acid than conventionally grown rucola. **Plant Biotechnology**, (0), 2016.

OLIVEIRA, K. J. B., DA SILVA SOARES, A. P., NETO, F. B., & LINHARES, P. C. A. Produção agroeconômica da rúcula fertilizada com diferentes quantidades de calotropis procera. DOI: 10.5216/teri. v5i2. 38791. **Revista Terceiro Incluído**, 5(2), 373-384.

OLIVEIRA, P. A. V. de & HIGARASHI, M. M. Unidade de compostagem para o tratamento dos dejetos de suínos. Concórdia: **EMBRAPA-CNPSA**, 2006.39p.

OLSON, M.E., GOH, J., PHILLIPS, M., GUSELLE, N., MCALLISTER, T.A. *Giardia* cyst and *Cryptosporidium* oocyst survival in water, soil, and cattle feces. **Journal of Environmental Quality** 28, 1991-1996, 1999.

ORRICO, A.C.A.; LUCAS JÚNIOR, J.; ORRICO JÚNIOR, M.A.P. Alterações físicas e microbiológicas durante a compostagem dos dejetos de cabras. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.27, n.3, p.764-772, 2007.

PAGGI, L., et al. Biochemical taxonomy of ascaridoid nematodes. **Parassitologia** 27: 105-112, 1985.

PAILLAT, J. M.; ROBIN, P.; HASSOUNA, M.; LETERME, P. Predicting ammonia and carbon dioxide emissions from carbon and nitrogen biodegradability during animal waste composting. **Atmospheric Environment**, v.29, p.6833-6842, 2005.

- PAIVA, D.P. Isosporose suína. Suinocultura Dinâmica. Concórdia: **EMBRAPA/CNPQA**, 1996, ano 5, n.18 (Periódico técnico-informativo).
- PANG, V. F., C. C. CHANG, AND W. F. CHANG. Concurrent gastric and hepatic amebiasis in a dusky leaf monkey (*Presbytis obscurus*). **J. Zoo Wildl. Med.** **24**:204–207, 1993.
- PEDERSEN, S., et al. Impact of protein energy malnutrition on *Trichuris suis* infection in pigs concomitantly infected with *Ascaris suum*. **Parasitology**, *124*(05), 561–568, 2002.
- PENG W, YUAN K, HU M, ZHOU X, GASSER RB: Mutation scanning-coupled analysis of haplotypic variability in mitochondrial DNA regions reveals low gene flow between human and porcine *Ascaris* in endemic regions of China. **Electrophoresis** 2005, *26*:4317-4326.
- PENG, W., CUI, X., ZHOU, X. Comparison of the structures of natural and reestablished populations of *ascaris* in humans in a rural community of Jiangxi, China. **Parasitology**. *124*, 641–647, 2002.
- PEREIRA, H. S.; VITTI, G. C. Efeito do uso do xisto em características químicas do solo e nutrição do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 317-322, abr./jun. 2004.
- PIMENTEL, P.M. et al. Caracterização e uso de xisto para adsorção de chumbo (II) em solução. **Cerâmica**. v. 52, p.194-199, 2006.
- QUILEZ, J. et al. Comparison of oocyst shedding and the serum immune response to *Cryptosporidium parvum* in cattle and pigs. **Parasitology Research**. v.82, p. 529-534, 1996.
- RADOSTITIS O.M., GAY C.C., HINCHCLIFF K.W. & CONSTABLE P.D. Diseases associated with inorganic and farm chemicals, p.1824-1826, 2007. In: Ibid. (Eds), *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th ed. **Saunders Elsevier**, Edinburgh.
- RAJBANSHI, S.S.; BENCKISER, G.; OTTOW, J.C.G. Effects of concentration, incubation temperatures, and repeated application on degradation kinetics of dicyandiamide (DCD) in model experiments with a silt loam soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.13, p. 61-64, 1992.
- REBOLLIDO, R. et al., (2008) Microbial populations during composting process of organic fraction of municipal solid waste. **Applied Ecology and Environmental Research**, v.6, p.61-67, 2008
- REGHIN, M. Y.; OTTO, R. F.; OLINIK, J. R.; JACOBY, C. S. F. Effect of within row spacing and number of seedlings per hole on autumn and winter season. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 29, n. 5, p. 953-959, 2005.

ROEPSTORFF, A., et al. Intestinal parasites in swine in the Nordic countries: prevalence and geographical distribution. **Veterinary Parasitology**, 76(4), 305-319, 1998.

ROS, M. et al. A full-scale study of treatment of pig slurry by composting: Kinetic changes in chemical and microbial properties. **Waste Management**, v. 26, p. 1108-1118, 2006.

RYAN, U.M. et al. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**. v.90, p. 769-773, 2004.

SÁ, M. F., et al. Population dynamics during composting of fecal automated pig slurry. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 66(4), 1197-1206, 2014.

SANFORD, S.E. Enteric cryptosporidial infection in pigs: 184 cases (1981 – 1985). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.190, n. 6, p. 695 – 698, mar. 1987.

SANTOS, M. M.; MATAI, P. H. L. S. A importância da industrialização do xisto brasileiro frente ao cenário energético mundial. **Revista Escola de Minas**, Ouro Preto, v. 63, n. 4, p. 673- 678, out./dez, 2010.

SAVIOLI, L., SMITH, H., THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends in Parasitology** 22, 203-208, 2006.

SAYD, S.M.O.; KAWAZOE, U. Prevalência de *Isoospora suis* em granjas de suínos do estado de São Paulo. CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, V, 1991, Águas de Lindóia. **Anais**. Águas de Lindóia: Comissão científica do V congresso brasileiro dos veterinários especialistas em suínos, 1991. p. 76.

SEMENOV, A.M.; KUPRIANOV, A.A.; van BRUGGEN, A.H.C. Transfer of Enteric Pathogens to Successive Habitats as Part of Microbial Cycles. **Environ. Microbiol.**, v.60, p.239-249, 2010.

SOBESTIANSKY, J et al. **Clínica e patologia suína**. 2. ed. Goiânia: J. Sobestiansky. 464p. 1999.

SOUZA, R.F., FAQUIN, V., CARVALHO, R., TORRES, P.R.F., POZZA, A.A.A. Soil chemical properties influenced by the substitution of calcium carbonate by calcium silicate. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**. 32, 1563-1572, 2008. (In Portuguese) doi.org/10.1590/S0100- 06832008000400020.

SPRENT JFA Anatomical distinction between human and pig strains of *Ascaris*. **Nature** 170: 627-628, 1952.

STACHIW, Rosalvo. “**Modelagem e Simulação do Processo de Adsorção de Compostos Orgânicos em Xisto, Catalisador Exaurido de Fcc e Carvão Ativado em**

Pó.” Dissertação (Doutorado em Ciências). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

STAUFFER, W., AND I. J. RAVDIN. *Entamoeba histolytica*: an update. **Curr. Opin. Infect. Dis.** 16:479–485, 2003.

STRINGHETA, P. C. *et al.*, Luteína: Propriedades antioxidantes e benefícios a saúde. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 229-238, 2006.

SUÁREZ-LUEGAS, L. *et al.* Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). **Veterinary Parasitology**. v.148, p. 231-235, 2007.

TAKATA I. Experimental infection of man with *Ascaris* of man and the pig. **Kitasato Arch Exp Med** 1951, 23:49-59.

THOMPSON, R.C., MONIS, P.T., Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology** 58, 69-137, 2004.

THOMSEN, L. E. *et al.* The effect of dietary carbohydrates and *Trichuris suis* infection on pig large intestine tissue structure, epithelial cell proliferation and mucin characteristics. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 1-2, p. 112-122, 2006.

TIECHER, T.L. *et al.* Forms and accumulation of copper and zinc in a Sandy Typic Hapludalf soil after long-term application of pig slurry and deep litter. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.37, p.812-824, 2013. DOI: 10.1590/S0100-06832013000300028.

TRAVASSOS, L. Introdução ao estudo da helmintologia. **Revista Brasileira de Biologia**, 1950. 169p.

TZIPORI, S. *et al.* *Escherichia Coli* and Rotavirus infection in four-week-old gnotobiotic piglets fed milk of dry food. **Australian Veterinary Journal**. n.56, p.279-284, 1980.

VALENTE, B.S. *et al.* Fatores que afetam o desenvolvimento da compostagem de resíduos orgânicos. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, p. 59-85, 2009.

VERWEIJ, J. J., *et al.* *Entamoeba histolytica* infections in captive primates. **Parasitol. Res.** 90:100–103, 2003.

VITOVEC, J. *et al.* Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. **Journal of Veterinary Medicine B**. v.53, p. 239-243, 2006.

VITOVEC, J., & KOUDELA, B. Pathogenesis of intestinal cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. **Veterinary parasitology**, 43(1-2), 25-36, 1992.

WADE, S.E., MOHAMMED, H.O., SCHAAF, S.L. Epidemiologic study of *Giardia* sp. infection in dairy cattle in southeastern New York State. **Veterinary Parasitology** 89, 11- 21, 2000a.

WANG, M. L. et al. Influence of grape seed proanthocyanidin extract in broiler chickens: Effect on chicken coccidiosis and antioxidant status. **Poultry Science**, v. 87, n. 11, p. 2273-2280, 2008.

WHARTON, D., 1980. Nematode egg-shells. *Parasitology* 81, 447–463.

WIELER, L.H. et al. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in Southern Germany. **Journal of Veterinary Medicine B**. v. 48, p. 151-159, 2001.

WONG, J.W.C.; SELVAM, A. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms in pig manure through fly ash and lime addition during alkaline stabilization. *J. Haz. Mat.*, v.169, p.882- 889, 2009.

WORLICZEK, H. et al. Porcine Coccidiosis – Investigation the Cellular Immune Response against *Isospora suis*. **Parasitology Research**, v. 105, p.151–155, 2009.

XIAO, L.; HERD, R.P.; BOWMAN, G.L. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections on two Ohio pig farms with different management systems. **Veterinary Parasitology**. v.52, p. 331-336, 1994

ZHU X, CHILTON NB, JACOBS DE, BOES J, GASSER RB: Characterisation of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA Sequences. **Int J Parasitol** 1999, 29:469-478.

ZHU, N. Effect of low initial C/N ratio on aerobic composting of swine manure with rice. **Bioresource Technology**, Oxford, v.98, n.1, p.9-13, 2007.

ZORANA, M. et al. *Cryptosporidium* infection in nursing, weaning and post-weaned piglets and sows in the Belgrade district. **Acta Veterinaria (Beograd)**. v.53, n. 5-6, p. 361 – 366, 2003.