

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

**QUANTIFICAÇÃO E AÇÃO SOBRE A
PRODUÇÃO DE BIOGÁS DAS EXCRETAS DE
FRANGO DE CORTE ALIMENTADOS COM
BACILUS SUBTILLIS E ENZIMAS EXÓGENAS**

NATALIA DE PAULA RAMOS

Orientador: Prof. Dr. Jorge de Lucas Junior
Coorientador: Maria Fernanda Meneguicci Praes
Coorientador: Mariana Carina Frigieri

**Trabalho apresentado a Faculdade de Tecnologia
de Jaboticabal - Fatec, para obtenção do título de
Tecnólogo em Biocombustíveis.**

Ramos, Natalia de Paula

R175c Quantificação e ação sobre a produção de biogás das excretas de frango de corte alimentados com *Bacillus subtilis* e enzimas exógenas / Natalia de Paula Ramos.— Jaboticabal : Fatec, 2012.

47f.

Orientador: Jorge de Lucas Junior

Coorientadora: Maria Fernanda Meneguicci Praes

Coorientadora: Mariana Carina Frigieri

Trabalho (graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, 2012.

1. Biodigestão Anaeróbia. 2. Enzimas Exógenas. 3. *Bacillus subtilis*. I. Lucas Junior, J. II. Título.

CDU 662.767.2

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: QUANTIFICAÇÃO E AÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOGÁS DAS EXCRETAS DE FRANGO DE CORTE ALIMENTADOS COM *BACILUS SUBTILLIS* E ENZIMAS EXÓGENAS.

AUTOR: NATALIA DE PAULA RAMOS

ORIENTADOR(A): PROF. DR. JORGE DE LUCAS JUNIOR

COORIENTADOR(A): MSC. MARIA FERNADA MENEGUCCI PRAES

COORIENTADOR(A): PROF^a. DR^a. MARIANA CARINA FRIGIERI

Trabalho de Graduação aprovado pela Banca Examinadora como parte das exigências para conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis, apresentado à FATEC-JB para a obtenção do título de Tecnólogo.

MSC. MARIA FERNADA MENEGUCCI PRAES

PAULA MARIA PILOTTO BRANCO

FÁBIO CAMIOTTI

Data da apresentação: 21 de Dezembro de 2012.

Presidente da Comissão Examinadora

Dedico este trabalho à meus pais, Pávio e Clara, à meus irmãos que são meus amigos de todas as horas.
À minha vizinha querida Elizena.
À meus avós queridos Aparecida *in memorian* e José *in memorian*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pois Nele tive força e coragem nessa dura caminhada. Aos meus pais, Pávio e Clara, por serem meu porto seguro, me apoiarem e por nunca me deixarem desistir mesmo quando esse era meu desejo. Por me mostrarem o quanto Deus é bondoso em nossa vida e por me trilharem em Seus caminhos. Aos meus irmãos Henrique, Viviane, Filipe e Giovana, especialmente a última que soube me compreender nos momentos difíceis e sempre sendo companheira em todos os momentos.

A família Dominacana Daniely, Gabriela (Larika), Bruna (Chester), Naianna (Stragada), Camila e a nossa mãezona Rô, por todos momentos vividos juntos, pelas conversas, risadas, festas, bebedeiras e dificuldades encontradas até que esta família ficasse perfeita. Sentirei saudades de cada momento.

As amigas de todas as horas Ana Paula, Natasha, Natalia Miassi e Mayara, por estar sempre presente me ajudando. Sempre juntas nos momentos de felicidades, tristezas e loucuras, superando barreiras que surgiram ao longo dessa amizade, a qual simplesmente aconteceu de onde menos se era esperado.

Agradeço ao professor Jorge de Lucas Júnior que aceitou me orientar e proporcionou a oportunidade da realização deste trabalho. Ao pessoal do Laboratório de Biomassa e Biodigestão Anaeróbia, que me ajudaram sempre que possível. A Maria Fernanda que me recebeu de braços abertos e se tornou uma grande amiga, que me coorientou ajudando em cada barreira que foi surgindo ao longo do desenvolvimento desse trabalho, agradeço-lho de modo especial. Ao Airon que mesmo na correria com seu doutorado nos ajudou em vários momentos.

Agradeço também a todos os funcionários da Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, a meus Professores que foram mestres e amigos ajudando para minha formação acadêmica. A Professora Mariana que aceitou coorientar-me em um momento no qual me encontrava sem saída. Especialmente a Janaina e a Simone que sempre me ajudaram nos momentos de dificuldade.

Agradeço a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal – UNESP pelas instalações cedidas para realização do experimento.

A todos que de alguma forma contribuíram neste trabalho e me ajudaram durante toda esta caminhada, meu muito obrigada.

“De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estaremos sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que seremos sempre interrompidos antes de terminar. Fazer da interrupção um novo caminho; fazer da queda, um passo de dança; do medo, uma ponte; da procura, um encontro.”

(Fernando Sabino)

RESUMO

QUANTIFICAÇÃO E AÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOGÁS DAS EXCRETAS DE FRANGO DE CORTE ALIMENTADOS COM *BACILUS SUBTILLIS* E ENZIMAS EXÓGENAS.

Para a realização do experimento com 128 frangos de corte de 43 dias de idade, as aves foram alojadas em gaiolas para a coleta das excretas, onde posteriormente as mesmas foram adicionadas em biodigestores bateladas de bancada. Diferentes tratamentos foram utilizados: um controle negativo (T1, uma dieta sem adição de aditivos), probióticos (T2 dieta com adição de *Bacillus subtilis*), mistura de enzimas exógenas; (T3, dieta com adição de protease, xilanaze e fitase); mistura de ambos os aditivos (T4, mistura de enzimas exógenas e probióticos). Um total de 16 biodigestores bateladas foram abastecidos com os 4 tratamentos em 4 repetições cada. O deslocamento vertical dos detentores de gás foi medido uma vez por semana para a determinação dos volumes de produção de biogás. Para analisar a qualidade da produção de biogás, amostras de gás foram coletados semanalmente em cada digestor e analisados em cromatógrafo a gás GC-2001 Finigan, para determinação dos níveis de metano produzido. Os dados obtidos da análise de variância empregando o procedimento General Linear Model através do software SAS[®]. As medidas foram então comprovadas com base em teste de Tukey (5% significância). Foi observado que para todas as características avaliadas não houve diferença estatísticas entre os tratamentos, no entanto para as características de produção de biogás e metano foram observados diferenças entre os tratamentos, notou-se que os biodigestores que receberam dieta contendo probióticos em consórcio com enzimas exógenas tiveram maior produção e potencial de produção de biogás e melhor qualidade do metano.

Palavra-chave: Biodigestão anaeróbia, Enzimas exógenas, Probióticos.

ABSTRACT

ACTION, MEASUREMENT AND CHARACTERIZATION OVER BIOGAS PRODUCTION FROM EXCRETA OF BROILERS FED WITH EXOGENOUS ENZYMES AND BACILUS SUBTILLIS

An Experiment with 128 broilers with 43 days of age was fulfilled. To allow an easy collection of broilers excreta, to be added later in batch digesters, the birds were housed. Different treatments were used: one negative control (T1, a diet without additives addition), probiotics (T2, diet with Bacillus subitillis added), a mixture of exogenous enzymes (T3, protease, xilanaze and phytase added to the diet), both additives mixed all in one (T4, probiotics and exogenous enzymes mixed with each other). The 4 treatments with 4 repetitions each, were used in a total of 16 batch digesters. For the determination of the volume of biogas produced, it was measured the gasometers vertical displacement, every day during the experiment. Weekly, there were collected gas samples from each gasometer, for quality analysis (determination of methane produced levels) with a gas chromatograph GC-2001 Finigan. SAS software, with General Linear Model procedures, was used to evaluate the data obtained on wentthrouht variance analysis. Measures were substantiated based on Tukey test (5% of significance). For all the evaluated characteristics, it was observed that there was no statistical difference between treatments. However for biogas and methane productions, there were differences observed between treatment characteristics, showing us that the digesters who received diets with exogenous enzymes and probiotic consortium, obtained a higher quality methane, a larger production and a better biogas potential production.

Keywords: *anaerobic digestors, probiotics, exogenous enzymes.*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Digestor tipo batelada de bancada	25
FIGURA 2 - Teste de queima	29
FIGURA 3 - Produção de biogás (m ³) em 142 dias, obtido na biodigestão de excreta de aves alimentadas com dietas contendo probiótico e enzimas exógenas	Erro! Indicador não definido.
FIGURA 4 - Gráfico de distribuição do metano em 142 dias de produção em %	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Quantidade de substratos adicionados aos biodigestores bateladas	25
TABELA 2 - Quantidade de produção de excretas na matéria natural e matéria seca (g/ave/dia) de frangos de corte (43 dias) criados em gaiolas por cinco dias recebendo uma dieta contendo probiótico e enzimas exógenas.....	32
TABELA 3 - Resultados de pH para afluentes e efluentes de excretas de aves que receberam dietas contendo probiótico e enzimas exógenas, tratadas em biodigestores bateladas.....	33
TABELA 4 - Média, valores de F e P e coeficiente de variação para teores de ST nos afluentes e efluentes, e % de ST reduzido de excreta de aves que receberam uma dieta contendo probiótico e enzimas exógenas, tratadas em biodigestores bateladas.....	34
TABELA 5 - Média, valores de F e P e coeficiente de variação para teores de SV nos afluentes e efluentes, e % de SV reduzido de excreta de aves que receberam uma dieta contendo probiótico e enzimas exógenas, tratadas em biodigestores bateladas.....	35
TABELA 6 - Resultados das análises quanto ao parâmetro de coliformes totais e termotolerantes (NMP/100 ml) e eficiência do tratamento de excretas de aves que receberam uma dieta contendo probiótico e enzimas exógenas em biodigestores bateladas.....	36
TABELA 7 - Média, valores de F e P e coeficiente de variação para, volume total de biogás produzido e potencial de produção de biogás para ST e SV adicionados e reduzidos de excretas de frango de aves que receberam uma dieta contendo probiótico e enzimas exógenas	38
TABELA 8 - Média, valores de F e P e coeficiente de variação para, volume total de biogás produzido e composição do biogás produzido de excretas de aves que receberam uma dieta contendo probiótico e enzimas exógenas tratadas em biodigestores bateladas.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

NMP

Números Mais Prováveis

ST

Sólidos Totais

SV

Sólidos Voláteis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	Enzimas.....	15
3.1.1	Protease.....	15
3.1.2	Fitase	16
3.1.3	Xilanase.....	17
3.2	Probióticos	17
3.2.1	<i>Bacillus subtilis</i>	19
3.3	Biodigestão anaeróbia	20
3.3.1	Benefícios da biodigestão	21
3.3.2	Biodigestores	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	Instalações, aves, manejo, preparação do substrato e biodigestores utilizados.....	24
4.2	Delineamento experimental.....	26
4.3	Tratamentos experimentais.....	26
4.4	Características avaliadas.....	26
4.4.1	Determinação da produção de dejetos “in natura” e na matéria seca	26
4.5	Ensaio de biodigestão anaeróbia	27
4.5.1	Determinação dos teores de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV)	27
4.5.2	Determinação dos números mais prováveis (NMP) de coliformes totais e termotolerantes.....	28
4.5.3	Determinação do pH	28
4.5.4	Teste de queima.....	29
4.5.5	Determinação do volume de biogás e cálculo dos potenciais de produção de biogás Teste de queima.....	29

4.5.6 Análise da composição do biogás produzido	30
4.5.7 Análises estatísticas.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Determinação da produção de excreta “in natura” e na matéria seca.....	31
5.2 Ensaio de Biodigestão	31
5.2.1 Análise de pH	32
5.2.2 Determinação dos teores de ST e SV.....	33
5.2.3 Determinação dos NMP de coliformes totais e fecais	36
5.2.4 Determinação do volume de biogás e cálculo dos potenciais de produção de biogás.....	37
5.2.5 Análise da composição do biogás produzido	39
6. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a exploração avícola tem se caracterizado pela produção de frango de corte cada vez mais precoce, devido ao grande aumento na demanda desse tipo de carne. Consequentemente o aumento dos resíduos gerados no setor é imprescindível e não a como ignorar a questão ambiental que passa a deixar de ser uma discussão meramente acadêmica para adquirir contornos políticos, sociais e econômicos.

De acordo com WILLIAMS (1995 apud, SOUZA 2010, p. 8) a quantidade juntamente com a composição de dejetos produzidos por animais ultrapassa, em muitos casos, a capacidade do solo em recebê-los como fertilizante, de modo que passam a serem vistos como contaminantes ou poluentes. Tendo em vista esta preocupação, pesquisadores da área tem se esforçado cada vez mais pela busca de alternativas que tornem a ração mais eficiente, que permitam assim, as excretas causarem menos impactos ambientais e ao mesmo tempo nos permita a obtenção de energia.

A biodigestão anaeróbia mostra-se apropriada para o tratamento das excretas de frango, devido ao fato de ser um sistema de tratamento no qual a matéria orgânica é degradada até a forma de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2) (DEMIRER E CHEN, 2005).

Sendo assim, a digestão anaeróbia surge como alternativa de tratamento para as excretas, pois além de reduzir o potencial poluidor, também representa uma possível fonte de recursos, tendo em vista que o biogás e o biofertilizante produzidos dentro do biodigestor podem ser rentáveis àqueles que se utilizam desse processo.

2 OBJETIVO

Objetivou-se com o desenvolvimento do presente trabalho de pesquisa, quantificar a produção de excretas e seu potencial de produção de biogás, quando tratados em biodigestores bateladas de excretas da aves que receberam uma dieta contendo adição de enzimas (protease, xilanase e fitase) e probiótico (*Bacillus Subtilis*).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Enzimas

As enzimas são compostos protéicos que atuam em substratos específicos, estas reações dependem de alguns fatores que como temperatura, umidade e pH. As reações bioquímicas que ocorrem nos organismos vivos são catalisadas por alguma enzima (CAIRES *et al.*, 2008).

Segundo FLORES *et al.* (1994 apud CAIRES *et al.* 2008) estes aditivos alimentares vem sendo utilizados para melhorar a eficiência de produção dos animais devido o aumento na digestibilidade dos produtos de baixa qualidade e também proporciona uma redução na perda de nutrientes nas fezes, sendo possível baixar os níveis nutricionais da dieta com possíveis vantagens econômicas.

SHEPPY (2001) relata que existem quatro razões principais para a utilização de enzimas na nutrição animal, sendo elas a remoção de fatores antinutricionais, aumento na disponibilidade dos nutrientes, aumento na digestibilidade de polissacarídeos não amiláceos (fibras) e suplementação na produção de enzimas endógenas.

3.1.1 Protease

Dada a importância protéica para o desenvolvimento animal e o alto custo da proteína na dieta, o uso de protease em dietas de monogástricos têm recebido cada vez mais atenção de pesquisadores. Apesar de dietas tradicionais de milho e farelo de soja sejam consideradas de alta digestibilidade (KIDD *et al.* 2001; ODETALLAH *et al.* 2003), elas ainda possuem uma série de complexos protéicos que podem não ser facilmente digeríveis por aves jovens que nessa fase da vida são carentes enzimaticamente (UNI *et al.* 1999).

Pode-se citar como principal objetivo para o uso destes compostos enzimáticos a redução de proteína bruta da dieta, sem que haja alteração no desempenho zootécnico da ave (YU *et al.* 2007). Porém o efeito benéfico da adição enzimática torna-se limitado, quando estas são adicionadas acima da exigência de aminoácido das aves. Para confirmar tal afirmação, TOLEDO *et al.* (2007) testaram um complexo enzimático, frente à dietas de

diferentes densidades nutricionais, obtiveram melhora significativa apenas em dietas com níveis nutricionais reduzidos.

Segundo JARONI *et al.* (1999) é de grande importância a presença de proteases em complexos enzimáticos que degradam polissacarídeos não-amiláceos, já que nestes casos as proteínas são importantes ligações principalmente para arabinosilanos. Em contra partida, o uso de um único composto enzimático traz ao nutricionista a possibilidade da combinação de diferentes enzimas que não irão competir pelo mesmo substrato.

3.1.2 Fitase

ROLAND *et al.* (2006) afirmam que a fitase catalisa o fitato disponibilizando fósforo e outros elementos outrora indisponíveis como cálcio, magnésio, zinco, ferro e moléculas orgânicas, como aminoácidos.

Segundo RUTHERFURD *et al.* (2002), a adição de fitase microbiana nas dietas de aves pode facilitar a ação enzimática e a absorção de minerais, e a digestibilidade de aminoácidos é aumentada consequentemente reduzindo assim o custo e os impactos ambientais, devido ao fato de as concentrações de nitrogênio e fósforo nas excretas serem reduzidas.

Este aditivo apresenta aplicações dos mais variados tipos, uma vez que seu substrato está presente invariavelmente em dietas para aves e suínos, e sua inclusão resulta em maior biodisponibilidade de fósforo e na redução da excreção deste mineral no ambiente. A utilização de fitase como aditivo em rações para animais vem sendo acelerado devido à proibição do uso de farinhas protéicas de origem animal, que também são fontes de fósforo. A capacidade desta enzima de liberar o fósforo fítico e reduzir a excreção para o meio ambiente está bem documentada; a fitase é uma forma eficiente e econômica de reduzir os níveis de fósforo dietético e, uma vez que as reservas naturais de fósforo não são renováveis, o seu uso seria benéfico, inclusive, para a preservação de tais contingentes (SELLE E RAVIDRAN, 2007).

3.1.3 Xilanase

A incapacidade que os animais monogástricos têm em digerir a celulose e as hemiceluloses limita o valor econômico e nutricional dos cereais. Regimes com uma incorporação demasiadamente elevada destes alimentos provocam, por exemplo, vários distúrbios alimentares, que se revestem de maior gravidade em animais jovens e que afetam negativamente o seu desenvolvimento.

Xilanases são glicosidases responsáveis principalmente pela hidrólise das ligações β -1,4 presentes na xilana vegetal (componente da hemicelulose). Tendo em vista que as hemiceluloses são constituídas de vários polímeros principalmente, xilana, formados por diferentes resíduos de açúcares, a sua degradação completa necessita da ação cooperativa de um consórcio de enzimas microbianas específicas. A enzima principal na despolimerização da xilana é a endo β -1,4 xilanase (COUGHLAN E HAZLEWOOD, 1993).

Assim BRICE & MORRISON (1991) perceberam um aumento na digestibilidade de dietas quando se adiciona a enzima xilanase. O aumento na digestibilidade de rações animais é um processo que pode ser obtido pela aplicação das xilanases, uma vez que a hemicelulose é uma fibra insolúvel, e a sua ingestão, na forma integral, possui pouco valor nutricional para os animais não-ruminantes (KULKARNI *et al.* 1999).

3.2 Probióticos

Na avicultura o uso de antibióticos é uma prática muito comum na prevenção de certas enfermidades, porém com o passar do tempo o frango de corte pode apresentar resistência ao uso desse medicamento. Devido a este fato surge a necessidade de encontrar uma alternativa para o uso deste aditivo.

Neste contexto surgem os probióticos que são produtos constituídos por micro-organismos vivos, que quando introduzidos no organismo do animal, vão influenciar de forma positiva o hospedeiro através da melhoria do balanço microbiano intestinal (FULLER, 1989).

Segundo FOX (1988) e JIN *et al.* (1997) os probióticos agem por exclusão competitiva, eles aderem a sítios específicos localizados no epitélio intestinal diminuindo assim, a colonização por micro-organismos patogênicos. Este mecanismo de exclusão

competitiva não está totalmente esclarecida, mas através de varias pesquisas pode-se levantar algumas formas de atuação dos probióticos:

- Dentro do intestino, os micro-organismos do probiótico realizam uma rápida metabolização de substratos, que por ficarem indisponíveis aos patógenos, impedem sua proliferação.
- Provocam uma redução no pH intestinal, através da produção de ácido láctico, tornando o meio impróprio para a multiplicação de agentes patogênicos.
- Podem secretar proteínas (bacteriocinas) que possuem ação inibidora ou destrutiva contra uma cepa específica de bactéria.
- As bactérias produtoras de ácido láctico podem estimular a produção de anticorpos e a atividade fagocítica contra patógenos no intestino e em outros tecidos do corpo.
- Tem-se o aumento de atividade enzimática no trato gastrointestinal, devido as bactérias benéficas.
- Tem-se o aumento da área de absorção do intestino delgado.

GIBSON E ROBERFROID (1995) afirmam que um bom probiótico deve sobreviver às condições adversas do trato intestinal para que assim consiga permanecer no ecossistema intestinal; não pode ser tóxico nem patogênico para o homem e para os animais; ser estável durante a estocagem e permanecer viável por longos períodos, nas condições normais de estocagem; promover efeitos comprovadamente benéficos ao hospedeiro.

O ideal para o uso do probiótico é que ele seja utilizado o mais cedo possível nas aves, fazendo assim com que as bactérias presentes neste aditivo colonizem e multipliquem-se no trato intestinal das aves. Iniciando suas atividades benéficas ao hospedeiro antes desse ser contaminado por algum patógeno (ANDREATTI FILHO E SAMPAIO, 2000).

A utilização de aditivos como alguns probióticos baseados em *Lactobacillus* (CHANG E CHEN, 2003) nas dietas de frangos tem resultado em reduções significativas de amônia e odor das excretas das aves. Porém, outros pesquisadores não observaram efeitos significativos destes aditivos (ULLMAN *et al.*, 2004).

3.2.1 *Bacillus subtilis*

Os organismos da espécie *Bacillus subtilis* são gram-positivos, saprófitos e não são patogênicos, por tolerarem condições ambientais atípicas podem ser encontradas tanto no solo como na água.

MARUTA (1993) observou que com a administração do probiótico *Bacillus subtilis* em granjas de frangos de corte, houve hipertrafia muscular, diminuição da quantidade de gordura abdominal, principalmente nos machos, redução no cheiro característico da carne de frango e no odor das excretas. Sobre as bactérias nocivas ao trato gastrointestinal, o autor verificou que a adição de *Bacillus subtilis* diminuiu a porcentagem de isolamento da *Salmonella* de 60 para 20%.

Tendo em vista que o *Bacillus subtilis*, não é um patógeno humano e apresenta melhorias ao hospedeiro, é um aditivo que tem sido cada vez mais utilizado na avicultura, como método de tratamento de cama de frango contendo excretas, para diminuir a carga microbiológica, que consiste no princípio da inibição competitiva.

Em um estudo realizado por ROLL *et al.* (2008), matrizes de frango de corte com 58 semanas de idade tiveram a cama trocada por nova para então receber a aplicação de um produto formulado com cepas de *Bacillus subtilis* em dois níveis de dosagem, 2,5 g/m² de cama (subdosagem) e 5,0 g/m² (dosagem recomendada), comparado com a cama controle na qualidade microbiológica de enterobactérias. Evidenciou-se melhor qualidade microbiológica da cama, ao final de quatro semanas de utilização da cama, devido à menor contagem logarítmica de enterobactérias, apresentando redução de 13% comparando a dosagem recomendada com a cama controle (2,89 versus 3,31log₁₀ UFC, respectivamente). As bactérias inoculadas aceleraram o processo de degradação dos dejetos e sua atividade inibiu a sobrevivência e multiplicação de bactérias patogênicas. O efeito de inativação de microorganismos tem sido atribuída ao efeito químico de liberação de enzimas proteolíticas (GUAN *et al.* 2009) e nucleases (VELAYUDHAN *et al.* 2003), que são produzidas pela a atividade microbiológica que se instala em materiais como a cama de frango.

3.3 Biodigestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é um processo biológico que ocorre na ausência de oxigênio livre, sendo que diversas populações de bactérias degradam a matéria orgânica até a forma de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂) (DEMIRER & CHEN, 2005; NOGUEIRA, 1986).

A mistura de gases provenientes deste processo é conhecida como biogás que pode ser utilizado como combustível devido sua alta concentração de CH₄, usualmente na faixa de 55 a 70% (NOGUEIRA, 1986).

A biodigestão anaeróbia ocorre em três fases: A hidrólise enzimática, acidogênese e metanogênese. Alguns autores porém citam uma quarta fase que faria a intermediação entre a acidogênese e a metanogênese, sendo a acetogênese (CAMARERO *et al.*, 1996; SINGH, 1996; STERLING *et al.*, 2001)

Segundo SOUZA (2010) a hidrólise, envolve transformações de compostos complexos em compostos solúveis, como a dos compostos com alto peso molecular (carboidratos, proteínas, lipídios e ácido nucléico) em compostos mais simples (como monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos), mediante a ação de enzimas extracelulares.

Na acidogênese ocorre a transformação dos produtos resultantes da fase anterior em ácido acético, hidrogênio, dióxido de carbono e outros ácidos orgânicos, que se da por outro grupo de micro-organismos (bactérias saprófilas). A maioria das bactérias nessa fase se constitui em espécie anaeróbia estritas além das facultativas.

Na metanogênese, o ácido acético, o hidrogênio e o dióxido de carbono, são transformados em uma mistura de metano e dióxido de carbono pelas *Archeas metanogenicas*. Dentre as *Archeas metanogenicas*, destacam-se as que utilizam o acetato (*Methanosarcina spp* e *Methanotrix spp*) e as que utilizam o formiato e o hidrogênio (*Methanobacterium spp.* e *Methanococcus spp.*). Esta fase é responsável pela limitação da velocidade da cadeia das reações, devido a formação de microbolhas de metano e dióxido de carbono em torno das *Archeas metanogenicas*, isolando-a do contato direto com a mistura em digestão (MIRANDA *et al.*, 2009).

3.3.1 Benefícios da biodigestão

Devido à biodigestão anaeróbia ser um processo biológico (DEMIRER & CHEN, 2005; NOGUEIRA, 1986), pode-se concluir que trará benefícios e vantagens pelos produtos provenientes do mesmo. Representando um importante papel que além de permitir a redução do potencial poluidor, também não há geração de calor e nem volatilização dos gases no processo levando em consideração o pH próximo a neutralidade é mínima, ocorre ainda a recuperação de energia na forma de biogás e a reciclagem do efluente na forma de biofertilizante (FISHER et al., 1979; LUCAS JÚNIOR, 1998).

- **Biogás:** De acordo com RUIZ *et al.* (1992 apud, SOUZA 2010, p. 19) o biogás é constituído basicamente de 60 a 70% de metano (CH_4) e de 30 a 40% de dióxido de carbono (CO_2), além de traços O_2 , N_2 e H_2S , de acordo com a forma que é produzido. O gás liquefeito de petróleo (GLP), a gasolina e o óleo diesel em motores estacionários de combustão interna, sistemas de geração de energia elétrica ou térmica e até a lenha ou óleo combustível em caldeiras podem ser substituídos pelo biogás. Em termos de equivalência energética, 1,63; 1,80; 1,26 e 0,70 m^3 de biogás são equivalentes a 1 L de gasolina, óleo diesel e álcool combustível e 1 KWh de energia elétrica, respectivamente (COMASTRI FILHO, 1981 apud TEIXEIRA, 2003).

- **Biofertilizante:** O material que se encontra na câmara de fermentação, o qual já foi degradado será descartado para que o sistema seja abastecido por nova carga, este efluente possui grande quantidade de nutrientes e é utilizado como fertilizante orgânico, nas lavouras nos sistemas de irrigação. Os odores desagradáveis presente nos dejetos que abastecem o biodigestor não esta presente no biofertilizante, que também é isento de micro-organismos patogênicos. Este produto em contato com o solo favorece a multiplicação de bactérias fixadoras de nitrogênio e devido o pH na faixa de 7,0 a 8,5 o biofertilizante corrige a acidez do solo e contribui para aumentar a produtividade (SGANZERLA, 1983).

3.3.2 Biodigestores

Atualmente são propostos diversos modelos de biodigestores com diferenças tecnológicas, que dependem de acordo com as condições locais, tipo do substrato, experiência do condutor e principalmente a relação custo x benefício (DEGANUTTI, *et al.*, 2002). Porém um biodigestor consiste basicamente por duas partes: um recipiente (tanque) no qual será depositada a matéria orgânica para que ocorra a decomposição e o gasômetro (campanula) onde o biogás será armazenado. BARRERA (1993, p. 11) define bem este conceito: “o biodigestor, como toda grande ideia, é genial por sua simplicidade”.

Segundo COSTA (2005) os modelos de biodigestores utilizados no Brasil são os bateladas quando o resíduo é obtido com periodicidade, e os contínuos, indiano e o chinês para os casos de produção de resíduos diários.

- **Contínuos:** Existem vários modelos de biodigestores de alimentação contínua, a diferença entre eles está no modelo de construção e operação. Estes modelos de biodigestores realizam a carga e a descarga do material orgânico pelo princípio de vasos comunicantes ou através de bombas hidráulicas. A alimentação não é de forma constante, mas em intervalos regulares de tempo. A concentração de sólidos totais deve ser de 8%, para evitar obstrução do tubo de carga e facilitar a circulação da biomassa. Em geral, biodigestores deste modelo são ideais para atender propriedades que produzem dejetos em curtos períodos de tempo, por exemplo, suinocultura (NOGUEIRA, 1986; SGANZERLA, 1983). A carga regular de matéria orgânica no biodigestor faz com que o substrato esteja em várias etapas no processo, com presença simultânea de culturas microbianas distintas, respectivas de cada fase do processo de biodigestão. A adição periódica de carga orgânica assegura uma produção constante de biogás e biofertilizante. Os biodigestores de sistemas contínuos mais difundidos no mundo são: o modelo Indiano e o modelo chinês. Ambos possuem caixa de carga e descarga diferenciando-se apenas pela câmara de fermentação.

- **Batelada:** O biodigestor do tipo batelada recebe em uma única vez a quantidade de resíduos orgânicos a ser tratado. A biomassa permanece nesse reservatório fechado até que o ciclo da digestão anaeróbia esteja completo. O fim da produção de biogás indica que o ciclo está completo e o biodigestor está apto para receber uma nova carga de matéria orgânica. Nesse sistema só haverá produção constante de biogás quando houver

vários biodigestores operando em série. Sendo um dos modelos mais simples de biodigestores. Este sistema é composto de uma única câmara de fermentação, normalmente feita em alvenaria, e por um gasômetro móvel. Este sistema requer baixa operacionalidade e pode ser alimentado tanto com dejetos diluídos em água quanto resíduos vegetais sólidos, sendo usado, principalmente, para matérias orgânicas de decomposição lenta (NOGUEIRA, 1986; SGANZERLA, 1983).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instalações, aves, manejo, preparação do substrato e biodigestores utilizados

Foi realizado um experimento, no Setor de Avicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – campus de Jaboticabal – São Paulo, onde 128 frangos de corte (Cobb[®]) com 43 dias de idade, provenientes de um mesmo lote de matrizes, com idade e linhagem iguais, foram alojadas em um galpão de alvenaria contendo 32 gaiolas. Foram colocadas bandejas de alumínio abaixo das gaiolas para a coleta das excretas das aves, onde posteriormente foram adicionadas em biodigestores bateladas.

Durante o período de criação, todas as aves receberam água e ração *ad libitum*. As rações foram formuladas de acordo com as recomendações de ROSTAGNO (2005). O manejo adotado foi o mesmo para todas as aves.

Após a coleta das excretas por um período de cinco dias, as mesmas foram levadas para o Departamento de Engenharia Rural da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal / UNESP, onde foi realizado o abastecimento de biodigestores bateladas de bancada experimentais. Com estes procedimentos, a aquisição de dados permitiu o conhecimento dos efeitos das enzimas e *Bacillus* sobre o potencial de produção de biogás para aproveitamento em forma de pico de produção (biodigestores batelada). Estes dados são particularmente importantes para o dimensionamento de sistemas de biodigestão na avicultura de corte.

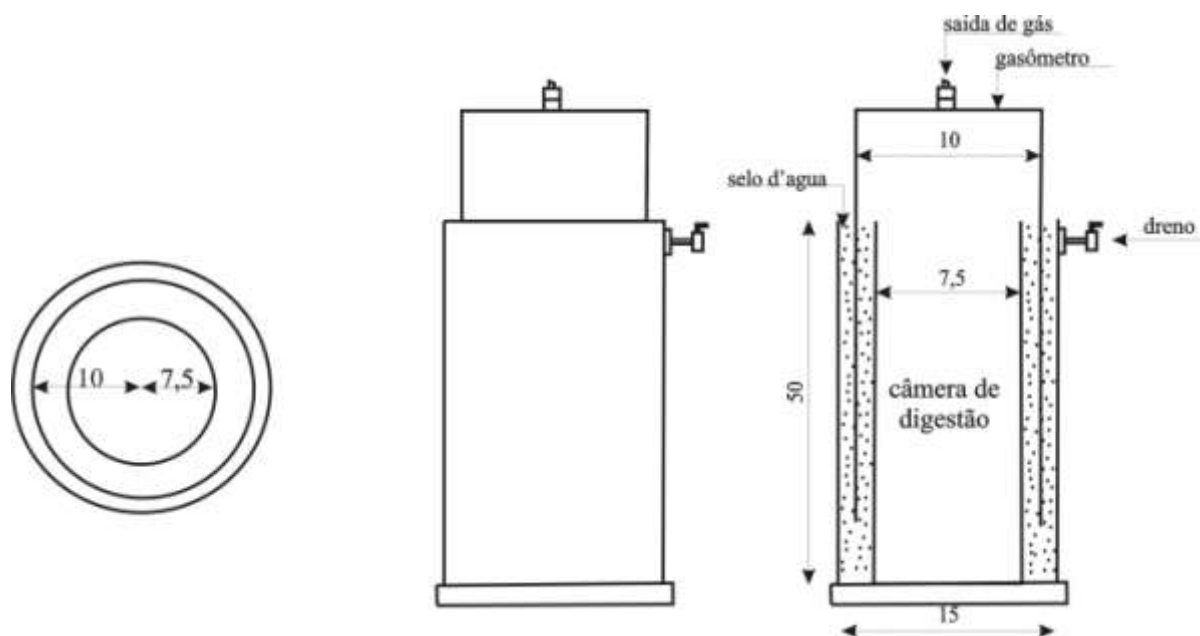
Os substratos utilizados para o abastecimento dos biodigestores foram as excretas advindas de aves criadas em gaiolas alimentadas com enzimas e *Bacillus*, o volume da carga (1,8 kg) foi o mesmo para todos os biodigestores. Em cada abastecimento o substrato foi preparado com teor de sólidos totais próximo a 4,0%, segundo modelo proposto por Lucas Jr., (1994). Na TABELA 1 encontram-se as quantidades de substrato adicionado (excreta e água) ao biodigestor batelada.

TABELA 1 - Quantidade de substratos adicionados aos biodigestores bateladas

Excreta	Água	Total
0,301 kg	1,499 kg	1,800 kg

Os biodigestores de tipo batelada (Figura 1) foram constituídos por três cilindros retos de PVC com diâmetros de 7,5, 10 e 15 cm, acoplados sobre um cap de PVC com capacidade operacional de 2 litros de substrato em fermentação, cada. Os cilindros de 10 e 15 cm encontram-se inseridos um no interior do outro, de tal forma que o espaço existente entre a parede externa do cilindro interior e a parede interna do cilindro exterior comporta um volume de água (“selo de água”), atingindo profundidade de 50 cm. O cilindro de diâmetro intermediário tem uma das extremidades vedadas, conservando-se apenas uma abertura para descarga do biogás, e está emborcado no selo de água, para propiciar condições anaeróbias e armazenar o gás produzido.

FIGURA 1 - Digestor tipo batelada de bancada (ORRICO modificado, 2011)



4.2 Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 4 repetições, de biodigestores bateladas.

4.3 Tratamentos experimentais

Os tratamentos consistiram de excretas de aves que receberam diferentes tipos de dietas. As rações foram formuladas à base de milho e farelo de soja, suplementadas com minerais, vitaminas e aminoácidos, para atenderem às exigências nutricionais das aves de acordo com as recomendações de ROSTAGNO *et al.* (2005). Foi utilizada a matriz nutricional de cada enzima para a devida formulação das dietas. O *Bacillus* adicionado à dieta está presente em um produto comercial que está sendo testado em aves, tendo um nível de inclusão de 0,5 Kg por tonelada de ração.

Os tratamentos que são descritos a seguir:

- ✓ Tratamento 1: Excretas de aves que receberam ração testemunha, a base de milho e farelo de soja sem a adição de *Bacillus* e enzimas exógenas.
- ✓ Tratamento 2: Excretas de aves que receberam ração com adição de *Bacillus* sem adição de enzimas exógenas.
- ✓ Tratamento 3: Excretas de aves que receberam ração com adição de enzimas exógenas (protease, xilanase e fitase) sem a adição do *Bacillus*.
- ✓ Tratamento 4: Excretas de aves que receberam ração com adição de enzimas (protease, xilanase e fitase) exógenas e *Bacillus*.

4.4 Características avaliadas

4.4.1 Determinação da produção de dejetos “in natura” e na matéria seca

Os frangos com 43 dias de idade foram alojados em gaiolas para a possível coleta das fezes “in natura”. Uma vez determinado o número de aves para coleta de dejetos, foram efetuadas as pesagens dos dejetos produzidos e posteriores cálculos da produção de dejetos

(kg/ ave/ dia), dividindo-se a produção de dejetos (kg) pelo número de aves alojadas e pelo número de dias.

Sob as gaiolas foram instaladas bandejas de alumínio, previamente revestidas com plástico para evitar a perda de excretas. As excretas foram colhidas cuidadosamente duas vezes ao dia, pelo período de cinco dias, no início da manhã e no final da tarde e, nesse período, os comedouros foram supridos de ração três vezes ao dia para evitar o desperdício e contaminação das bandejas. Depois de coletadas, as excretas foram acondicionadas em sacos plásticos, identificados por repetição.

As amostras representativas das excretas foram acondicionadas em recipientes de alumínio previamente tarados e pesados para se obter o peso úmido (P_U) do material, levados à estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65°C até atingirem peso constante. Foram resfriados e pesados em balança de precisão de 0,01g, obtendo-se o peso seco (P_S). O teor de sólidos totais (ST) foi determinado segundo metodologia descrita pela APHA (1998).

A produção de ST/ ave/ dia foi calculada com os dados de pesagem dos dejetos (kg), número de aves alojadas e teor de ST encontrado nos dejetos, como se segue:

$$\text{Produção ST/ave/dia} = \left[\frac{\left(\frac{\text{peso dejeito (kg)}}{\text{ave}} \right)}{\text{dia}} \right] \times \text{ST (\%)}$$

4.5 Ensaio de biodigestão anaeróbia

4.5.1 Determinação dos teores de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV)

Os teores de ST e SV das amostras coletadas uma única vez para afluente e efluente durante os ensaios de caracterização e biodigestão anaeróbia foram determinados de acordo com metodologia descrita por APHA (1995).

4.5.2 Determinação dos números mais prováveis (NMP) de coliformes totais e termotolerantes

Para as análises de coliformes totais e termotolerantes no início e final do experimento, foram utilizados as técnicas descritas por SILVA *et al.* (1997). A metodologia de tubos múltiplos consiste em micro-organismos anaeróbios facultativos fermentadores de lactose com produção de ácido e gás dentro de 24 a 48 horas de incubação à temperatura de 32 a 37°C.

As amostras do afluente e efluente foram diluídos em uma solução de água peptonada que é utilizada para aumentar o número de bactérias presentes na amostra do que se quer analisar. Partindo de diluições entre 10^{-1} a 10^{-10} , foi pipetado alíquotas de 1 ml dessa diluição em tubos contendo 9 ml de lauril com tubo de Durham invertido, homogeneizando e incubando os tubos a 35°/48 horas. Passado este tempo foi observada a produção de gás nos tubos de Durham. Foi considerado positivo para a presença de *E. coli* os tubos que apresentaram gás dentro dos tubos de Durham, determinando assim o Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes.

Para a contagem dos coliformes totais pegou-se os tubos de lauril que apresentaram gás e foi transferida uma alçada de cada cultura para tubos contendo bile e EC também com tubos de Durham invertidos. Os tubos contendo bile foram incubados a 35° por 24 a 48 horas e observou-se o crescimento com a produção de gás. Os tubos contendo EC foram incubados em banho maria a 44° por 24 horas e observou-se o crescimento com a produção de gás. Tanto para bile quanto EC foram anotados os tubos com gás confirmativo da presença de coliformes totais e determinado o NMP. Os resultados foram expressos em NMP/100ml de afluente e efluente, e a % de eficiência do tratamento em biodigestores bateladas.

4.5.3 Determinação do pH

O pH é uma medida utilizada para determinar se uma solução esta ácida (pH de 0 a 6,9), neutra (pH = 7) ou alcalina (pH de 7,1 a 14). Para a determinação do pH foi utilizado o pHmetro, que funciona basicamente ao acoplar um eletrodo a um medidor de pH (minivoltímetro) com uma escala que converte a tensão em valores de pH de uma solução.

Foram separadas amostras no início e término do experimento, afluyente e efluente, dos quais com a utilização do pHmetro obtive-se o valor exato do pH de cada solução.

4.5.4 Teste de queima

Através de uma mangueira conecta-se o bico de saída do gás a um bico de Bunsen, o biogás é liberado e acende-se o bico com um fósforo, se o fogo apagar, significa que ainda há dióxido de carbono no interior do biodigestor, porém se o fogo acender e permanecer constante significa que o teor de metano está alto e o biodigestor esta produzindo biogás. Como podemos observar na Figura 2 o teor de metano no interior do biodigestor estava maior que o teor de dióxido de carbono.

FIGURA 2 - Teste de queima (RAMOS, 2012)



4.5.5 Determinação do volume de biogás e cálculo dos potenciais de produção de biogás Teste de queima

Para a determinação dos volumes de biogás produzidos, foi medido deslocamento vertical dos gasômetros semanalmente e os valores foram multiplicados pela área da seção transversal interna dos gasômetros, ou seja, $0,00785 \text{ m}^2$. Após cada leitura os gasômetros

foram zerados utilizando-se o registro de descarga do biogás. A correção do volume de biogás para as condições de 1 atm e 20°C foi efetuada com base no trabalho de CAETANO (1985).

Os potenciais de produção de biogás foram calculados utilizando-se os dados de produção diária e as quantidades de substrato, de ST e SV adicionados nos biodigestores, além das quantidades de SV reduzidos durante o processo de biodigestão anaeróbia. Os valores foram expressos em m³ de biogás por kg de substrato, de dejetos ou de ST e SV.

4.5.6 Análise da composição do biogás produzido

As análises da composição do biogás produzido em biodigestores abastecidos com excretas de frango foram realizadas semanalmente para determinação dos teores de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂), em cromatógrafo de fase gasosa Finigan GC-2001, equipado com as colunas Porapak Q e Peneira Molecular, e detector de condutividade térmica.

4.5.7 Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo programa SAS[®] (SAS Institute, 2002). As médias foram comparadas pelo teste de Tuckey a um nível de significância de 5 %.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da produção de excreta “in natura” e na matéria seca

Para as excretas coletadas de aves com 42 dias recebendo diferentes tipos de dietas, pode-se observar que não ocorreu diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre os tratamentos para produção de excretas na matéria natural e seca, e % de matéria seca (Tabela 2). Segundo GARCIA *et al.* (2008), a adição de enzimas às dietas diminui significativamente a quantidade de água na excreta, porém, neste trabalho, os aditivos não promoveram esse efeito quando comparado ao tratamento controle. Mostrou-se que nenhum dos aditivos utilizados proporcionou redução na quantidade de excreta enviada ao ambiente.

Confirmando os resultados do presente trabalho quando se compara a dejetos de poedeiras MORENG E EVANS (1990) citaram médias entre 70 a 80% de água nos dejetos das aves, ou seja, cerca de 20 a 30% de ST. Esses dados corroboram com os de GELMINI (1987), os quais destacaram uma média de 75% de água, 25% de ST nos dejetos de aves poedeiras, assim como os dados de EL BOUSHY (1994) de 25 a 28% de ST nos dejetos de aves. LEESON *et al.* (2000) apresentam valores médios de 30% de ST para dejetos de aves poedeiras e 70% de ST para dejetos de aves poedeiras acumulados por um ano.

TABELA 2 - Quantidade de produção de excretas na matéria natural e matéria seca (g/ave/dia) de frangos de corte (43 dias) criados em gaiolas por cinco dias recebendo uma dieta contendo probiótico e enzimas exógenas

Tratamento	Características		
	Excreta		
	% matéria seca	Quantidade (g/ave/dia)	
Materia natural		Materia seca	
T1	25,13	110	27
T2	23,78	109	26
T3	24,42	100	24
T4	23,88	100	23
Valores de F	0,70	0,35	0,39
Valores de P	0,565	0,79	0,76
CV ¹	6,83	24,25	25,23

¹coeficiente de variação; Médias com letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes; T1= dieta controle sem aditivos; T2= T1 + 500 ppm do produto contendo *Bacillus subtilis*; T3= T1 + 20 ppm da enzima fitase, 200 ppm de protease and xilanase); T4= T1+T2+T3.

5.2 Ensaio de Biodigestão

5.2.1 Análise de pH

A análise de pH é de extrema importância para os tratamentos de afluentes, onde os mesmos atingem a redução do pH, levando-o perto do neutro. Verificou-se durante o processo de biodigestão uma diminuição do pH dos efluentes líquidos, que variaram de 9,25 nos afluentes a 7,45 nos efluentes líquidos coletados na saída do biodigestor (Tabela 3). Tais valores estão dentro da faixa considerada ideal de pH para a decomposição adequada dos dejetos de animais, especialmente durante a biodigestão anaeróbia é de 6,0 a 8,0, tendo como ponto ideal pH 7,0 (QUADROS *et al.*, 2010).

Essa redução de pH se deve ao processo de decomposição anaeróbia da matéria orgânica, que devido às reações de hidrólise levam a uma grande produção de ácidos, o que promove uma diminuição do pH.

Alguns autores (RIGO, 2004; SCHOENHALS, 2006; GANNOUN *et al.*, 2009; OGEJO & LI, 2010) fazendo o tratamento de efluentes de abatedouros avícolas observaram que, ao realizarem a biodigestão anaeróbia, obtiveram valores médios que oscilaram entre 6,7 a 7,9.

TABELA 3 - Resultados de pH para afluentes e efluentes de excretas de aves que receberam dietas contendo probiótico e enzimas exógenas, tratadas em biodigestores bateladas

Tratamentos	Características	
	pH Afluente	pH Efluente
T1	9,25	7,59
T2	9,09	7,45
T3	8,015	7,60
T4	8,91	7,51

T1= dieta controle sem aditivos; T2= T1 + 500 ppm do produto contendo *Bacillus subtilis*; T3= T1 + 20 ppm da enzima fitase, 200 ppm de protease and xilanase); T4= T1+T2+T3.

5.2.2 Determinação dos teores de ST e SV

Foram observadas acentuadas reduções nos tratamentos, onde ocorreu maior redução de ST (66,85%) e SV(77,85%) no tratamento controle, diferindo estatisticamente somente do tratamento onde as aves receberam uma dieta contendo probiótico em consórcio com enzimas (54,90 e 66,58% de ST e SV) . Esta diferença pode ser explicada pela quantidade de ST e SV que compuseram as excretas de frango, nos afluentes. Onde se obteve uma alta deposição de ST e SV nos afluentes desses tratamentos sem ocorrer diferenças significativas nos efluentes (TABELA 4 e 5).

TABELA 4 - Média, valores de F e P e coeficiente de variação para teores de ST nos afluentes e efluentes, e % de ST reduzido de excreta de aves que receberam uma dieta contendo probiótico e enzimas exógenas, tratadas em biodigestores bateladas

Tratamentos	Características				
	ST				
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Reduzido
	%		Kg		%
T1	3,63 A	1,29	0,065 A	0,022	66,85 A
T2	2,91 B	1,17	0,052 B	0,020	62,12 AB
T3	3,23 AB	1,27	0,058AB	0,022	62,33 AB
T4	2,85 B	1,35	0,051 B	0,023	54,90 B
Valores de F	7,03	1,15	7,03	1,20	5,16
Valores de P	0,0055	0,37	0,0055	0,35	0,016
CV¹	8,53	11,17	8,53	11,50	7,07

¹coeficiente de variação; Médias com letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes; T1= dieta controle sem aditivos; T2= T1 + 500 ppm do produto contendo *Bacillus subtilis*); T3= T1 + 20 ppm da enzima fitase, 200 ppm de protease and xilanase); T4= T1+T2+T3.

TABELA 5 - Média, valores de F e P e coeficiente de variação para teores de SV nos afluentes e efluentes, e % de SV reduzido de excreta de aves que receberam uma dieta contendo probiótico e enzimas exógenas, tratadas em biodigestores bateladas

Tratamento	Características				
	SV				
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Reduzido
	%		Kg		%
T1	3,00 A	0,71	0,054 A	0,012	77,85 A
T2	2,41 B	0,64	0,043 B	0,011	75,13 AB
T3	2,72 AB	0,72	0,049 AB	0,013	74,74 AB
T4	2,37 B	0,79	0,043 B	0,014	68,58 B
Valores de F	7,01	1,14	7,01	1,08	3,67
Valores de P	0,0056	0,37	0,0056	0,39	0,044
CV¹	8,52	16,13	8,52	16,33	5,51

¹coeficiente de variação; Médias com letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes; T1= dieta controle sem aditivos; T2= T1 + 500 ppm do produto contendo *Bacillus subtilis*); T3= T1 + 20 ppm da enzima fitase, 200 ppm de protease and xilanase); T4= T1+T2+T3.

SANTOS *et al.* (1999) verificaram redução de sólidos totais média de 47,83% e redução de sólidos voláteis média de 46,91%, quando trabalharam com biodigestão anaeróbia de dejetos de galinhas poedeiras criadas sob diferentes temperaturas, dados inferiores de redução de SV aos dos encontrados no presente trabalho. Em biodigestores abastecidos com dejetos de aves de postura, estudados por PRIMIANO (2002), foram encontradas médias de redução de sólidos voláteis de 53,0% quando não utilizou inóculo e de 77,0% utilizando inóculo.

A redução de ST e SV no tratamento em biodigestores se dá durante o processo de biodigestão anaeróbia devido à conversão da matéria orgânica presente em biogás. Esse processo é de extrema importância para redução da carga poluidora da matéria orgânica, além de produzir o biogás utilizado na produção de energia limpa, onde abaixo, serão demonstrados o potencial de produção de biogás de cada tratamento.

5.2.3 Determinação dos NMP de coliformes totais e fecais

Durante a etapa do tratamento em biodigestores bateladas (142 dias de TRH) observou-se redução dos NMP de coliformes totais e termotolerantes, alcançando grande redução de tais grupo de bactérias ao final do experimento (Tabela 6).

TABELA 6 - Resultados das análises quanto ao parâmetro de coliformes totais e termotolerantes (NMP/100 ml) e eficiência do tratamento de excretas de aves que receberam uma dieta contendo probiótico e enzimas exógenas em biodigestores bateladas

Características						
Tratamentos	Coliformes Totais		Eficiência	Coliformes termotolerantes		Eficiência
	Afluente	Efluente		Afluente	Efluente	
	T1	14x10 ³		0	100	
T2	7,8x10 ³	0	100	7,8x10 ³	0	100
T3	4,5x10 ¹	0	100	4,5x10 ¹	0	100
T4	14x10 ³	0	100	14x10 ³	0	100

T1= dieta controle sem aditivos; T2= T1 + 500 ppm do produto contendo *Bacillus subtilis*; T3= T1 + 20 ppm da enzima fitase, 200 ppm de protease and xilanase); T4= T1+T2+T3.

Os NMP de coliformes totais e termotolerantes, nos materiais orgânicos, no início do processo de biodigestão anaeróbia para todos os tratamentos, alcançaram valores que representam um alto risco de poluição se dispostos no meio ambiente sem tratamento. Após o tratamento a relação entre afluente e efluente foi uma redução de 100% de NMP dos coliformes totais e termotolerantes dos efluentes, eliminando todo o poder poluente desses substratos.

AUGUSTO (2007) avaliou o comportamento do NMP de coliformes na biodigestão anaeróbia de dejetos frescos e armazenados de galinhas poedeiras e observou que também ocorreu a eliminação total de coliformes, a partir da 12^o e 13^o semana de tratamento. O que não foi verificado por ORRICO JÚNIOR *et al.* (2010) em ensaio de biodigestão anaeróbia de

cama de frango, que encontraram $3,6 \cdot 10^5$ NMP de coliformes totais no abastecimento dos biodigestores e $1,1 \cdot 10^3$ NMP. 100mL^{-1} no desabastecimento. Reduções de 99,7%, porém que não eliminaram o poder poluente do efluente.

5.2.4 Determinação do volume de biogás e cálculo dos potenciais de produção de biogás

Analisando os dados de produção de biogás total durante 142 dias, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$), porém quando se avaliou o potencial de produção de biogás, notou-se diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos para todas as características avaliadas de ST e SV. Mostrando que as excretas de aves que receberam uma dieta contendo probiótico em consórcio com enzimas exógenas tratadas em biodigestores bateladas, obtiveram um maior potencial de produção de biogás por kg de ST e SV adicionados e reduzidos, no entanto para ST e SV adicionados este só diferiu do tratamento controle. Para ST e SV reduzidos o mesmo diferiu dos tratamentos contendo somente adição de enzima e controle (Tabela 7).

TABELA 7 - Média, valores de F e P e coeficiente de variação para volume total de biogás produzido e potencial de produção de biogás para ST e SV adicionados e reduzidos de excretas de frango de aves que receberam uma dieta contendo probiótico e enzimas exógenas

Tratamento	POTENCIAL				
	Volume total (m ³)	ST		SV	
Características		Adicionados	Reduzidos	Adicionados	Reduzidos
	(m ³)	(m ³ /kg)	(m ³ /kg)	(m ³ /kg)	(m ³ /kg)
T1	0,022	0,33 B	0,50 C	0,40 B	0,51 C
T2	0,024	0,45 A	0,72 AB	0,54 A	0,72 AB
T3	0,023	0,40 AB	0,64 BC	0,47 AB	0,63 B
T4	0,023	0,45 A	0,82 A	0,54 A	0,78 A
Valores de F	0,42	6,74	15,83	6,76	19,42
Valores de P	0,74	0,0065	0,0002	0,0064	<0,0001
CV ¹	10,44	10,35	10,22	10,37	7,94

¹coeficiente de variação; Médias com letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes; T1= dieta controle sem aditivos; T2= T1 + 500 ppm do produto contendo *Bacillus subtilis*); T3= T1 + 20 ppm da enzima fitase, 200 ppm de protease and xilanase); T4= T1+T2+T3.

A adição de aditivos na dieta de aves proporciona uma alta produção de biogás, podendo estar relacionada a benefícios no processo de biodigestão, o que provoca um ambiente artificialmente induzido para que isso aconteça. Seria com uma etapa de pré-tratamento, fazendo hidrólise das substâncias presentes nas excretas, permitindo uma melhor atuação da população microbiana em uma etapa posterior de tratamento biológico.

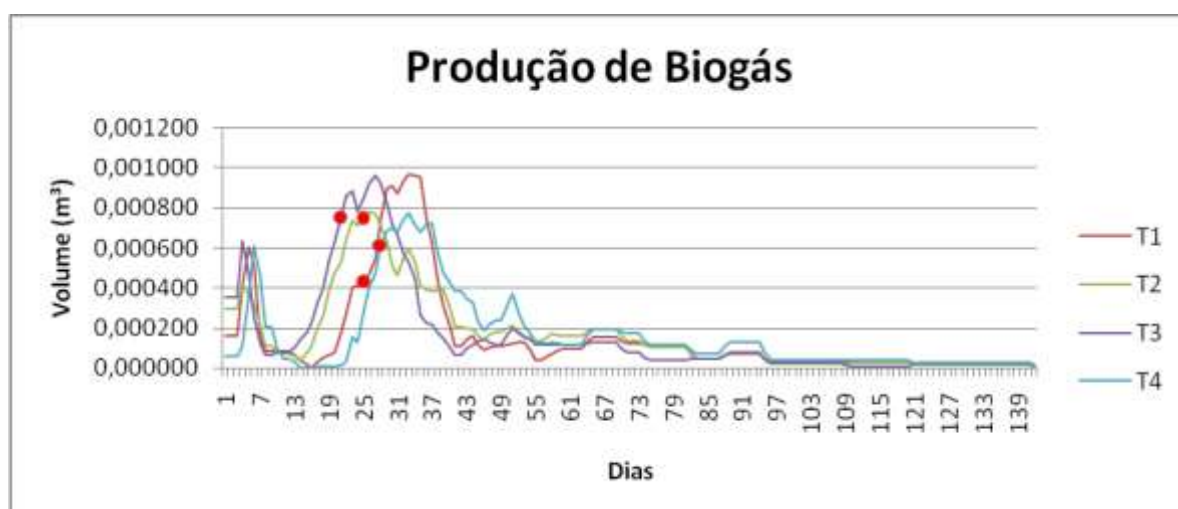
CAETANO (1991) ao trabalhar com dejetos de poedeiras verificou um potencial energético de 0,28 m³/kg de ST adicionados, 0,42m³/kg de SV adicionados e 0,52 m³/kg de SV reduzidos quando se fez o tratamento em biodigestores bateladas. STEIL (2001) encontrou potenciais de produção de biogás em m³ por kg de ST adicionados, obtidos a partir de resíduos de aves de postura sem a utilização de inóculo, de 0,3828 m³/kg de ST. Ainda no mesmo trabalho o autor verificou-se o potencial de produção de biogás de 0,5495 m³/kg de SV adicionado, 0,0243 m³/kg de substrato e 0,9087 m³/ kg de SV reduzidos.

O potencial de produção de biogás encontrado por PRIMIANO (2002), quando abasteceu biodigestores com dejetos de poedeiras, com e sem inóculo, foi de, respectivamente, 0,019 m³ e 0,024 m³/kg substrato, 0,315 m³ e 0,377 m³/kg ST adicionado, 0,460m³ e 0,560m³/kg SV adicionado, 0,590m³ e 1,060m³/kg SV reduzido e 0,12m³ e 0,10m³/kg de dejetos.

Na Figura 3 estão apresentados os dados para a produção de biogás em 142 dias nos diferentes tratamentos, para biodigestores bateladas contendo excreta de frangos de corte. Ao analisar o gráfico pode-se observar que a maior produção de biogás ocorreu no tratamento controle, seguido pelo tratamento contendo somente enzimas e posteriormente o tratamento contendo somente probiótico e enzimas + probiótico.

Neste gráfico pode-se avaliar o pico de produção das diferentes excretas de aves que receberam diferentes dietas. Para o tratamento controle o pico de produção ocorreu no 33º dia (0,00097 m³), no tratamento contendo somente probiótico o pico ocorreu no 26º (0,000779 m³), no tratamento contendo somente enzimas foi no 27º dia (0,000964 m³) e no tratamento contendo probiótico + enzima ocorreu no 33º dia (0,000776 m³).

FIGURA 3 - Produção de biogás (m³) em 142 dias, obtido na biodigestão de excreta de aves alimentadas com dietas contendo probiótico e enzimas exógenas



5.2.5 Análise da composição do biogás produzido

Na análise de composição de gases foram feitas as médias de quantidade de metano produzida a partir do momento do teste de queima do biogás. Foi observado que não houve

diferença estatística entre os tratamentos para produção de metano, mostrando que os tratamentos que continham adição de aditivos (probióticos, enzimas exógenas e enzimas exógenas + probiótico) tiveram a produção de metano (m^3 e %) estatisticamente igual quando comparada as excretas de aves que receberam a dieta controle (Tabela 8). As excretas das aves produziram quantidade excelente de metano em relação aos outros gases produzidos (T1-80,04; T2-80,79; T3-81,30; T4-79,29), esses dados são de extrema importância quando se pensa em captação de gases para produção de energia.

TABELA 8 - Média, valores de F e P e coeficiente de variação para, volume total de biogás produzido e composição do biogás produzido de excretas de aves que receberam uma dieta contendo probiótico e enzimas exógenas tratadas em biodigestores bateladas

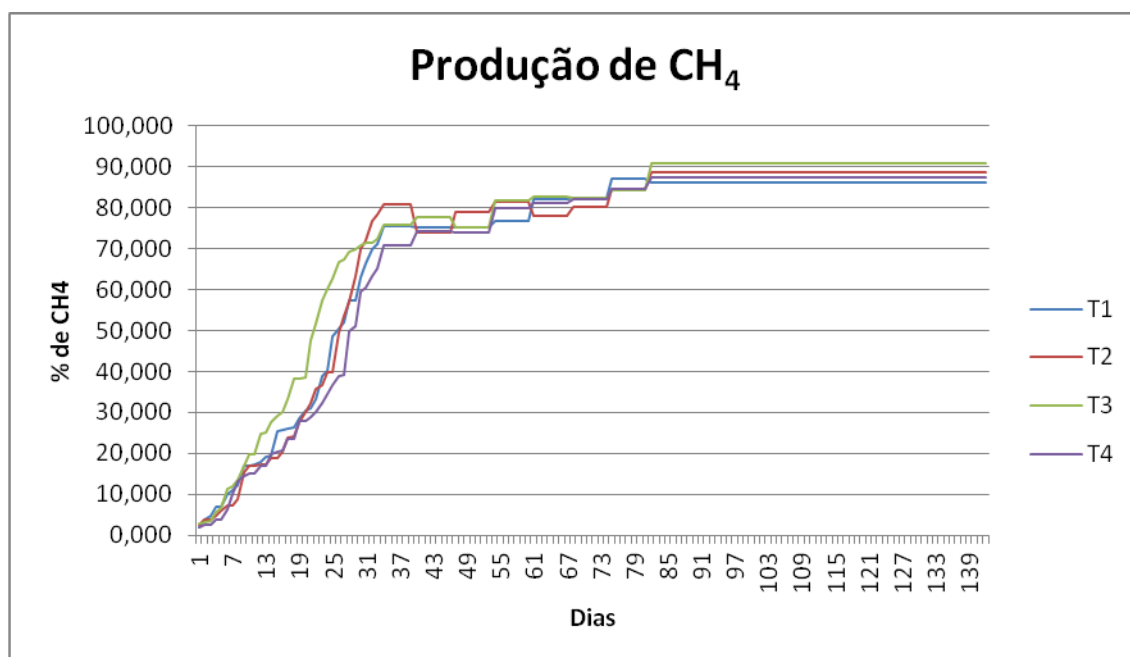
Tratamentos	Características			
	Volume (m^3)		Proporção (%)	
	Biogás	CH ₄	Metano	Outros gases
T1	0,022	0,017	80,04	19,96
T2	0,024	0,019	80,79	19,21
T3	0,023	0,020	81,30	18,70
T4	0,023	0,018	79,24	20,76
F Values	0,42	0,68	1,34	1,34
P values	0,74	0,58	0,30	0,31
CV¹	10,44	9,98	1,94	7,93

¹coeficiente de variação; Médias com letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes; T1= dieta controle sem aditivos; T2= T1 + 500 ppm do produto contendo *Bacillus subtilis*; T3= T1 + 20 ppm da enzima fitase, 200 ppm de protease and xilanase); T4= T1+T2+T3

SILVA (1998), descreve que a composição do biogás varia de 60 a 70% de metano. Vários autores verificaram valores neste intervalo: MIRANDA (2005) observou biogás com 65,73% de metano em biodigestores de bancada operados a 35°C e tempo de retenção hidráulica de 30 dias; ORRICO JUNIOR (2008) obteve 66,55% de metano em biogás gerado em biodigestores de bancada operados com tempo de retenção hidráulica de 29 dias.

Na Figura 4 está demonstrada a produção de metano (m^3) durante todo o período experimental (142 dias), desde o primeiro dia de coleta dos gases (antes e após a queima do biogás). Os tratamentos não apresentaram grandes variações no teor de metano presente no biogás, porém o tratamento contendo apenas enzimas exógenas teve uma produção um pouco maior de metano.

FIGURA 4 - Gráfico de distribuição do metano em 142 dias de produção em %



6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no ensaio de biodigestão anaeróbia permitem concluir que a adição de enzimas exógenas e *Bacillus subtilis* na dieta de frango de corte, influenciam positivamente as excretas, melhorando assim a produção e composição do biogás produzidos a partir do mesmo.

REFERÊNCIAS

- ANDREATTI FILHO, R.L.; SAMPAIO, H.M. **Probióticos e Prebióticos**. Avic. Ind., São Paulo, v. 90, n. 1078, p.1632, 2000.
- APHA 1995. Standard methods. 19 Edition. American Public Health Association, Washington, D.C.
- AUGUSTO, K. V. Z. **Caracterização quantitativa e qualitativa dos resíduos da produção de ovos: compostagem e biodigestão anaeróbia**. 2007. 131f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- BARRERA, Paulo. **Biodigestores: energia, fertilidade e saneamento para azona rural**. São Paulo: Ícone, 1993, p. 11
- BRICE, R. E. & MORRISON, I. M. 1991. Effect of the addition of D-xylose on xylanase activity and digestibility of fiber in an artificial rumen. *App. Biochem. and Biotechnol.*, 30.
- CAETANO, L. Metodologia para estimativa da produção contínua de biogás em biodigestores modelo indiano. 1991. 112f. Tese (Doutorado em Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1991.
- CAETANO, L. **Proposição de um sistema modificado para quantificação de biogás**. 1985. 75f. Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1985.
- CAMARERO, L.; DIAZ, J. M; ROMERO, F. Final treatments for anaerobically digested piggery slurry effluents. **Biomass and bioenergy**. Oxford, v 11, n.6, p. 483-489, 1996
- CHANG, H T & CHEN J L 2003. **Eco-innovative examples** for 40 TRIZ inventive principles. *The TRIZ J*, Aug 8.
- COSTA, M. S. S. M. **Caracterização de dejetos de novilhos superprecoces: reciclagem energética e de nutrientes**. 2005. 126 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Área de Concentração em Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.
- DEGANUTTI, R.; *et al.* **Biodigestores rurais: modelo indiano, chinês e batelada**. In: 40 encontro de energia meio rural. São Paulo, 2002. Faculdade de Arquitetura, Artes e Comunicação. UNESP. São Paulo, 2002.
- DEMIRER, G.N.; CHEN, S. **Two-phase anaerobic digestion of unscreened dairy manure**. *Process Biochemistry*, Irlanda, v.40, n.4, p.3.542-3.549, 2005.
- EL BOUSHY, A. R. Y.; van der POEL, A. F. B. **Poultry feed from waste: processing and use**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 438.

FISCHER, J.R.; IANNOTTI, E.L.; PORTER, J.H.; GARCIA, A. Producing methane gas from swine manure in a pilot-size digester. *Transactions of the ASAE*, St. Joseph, v.22, n.2, p.370-4, 1979.

FLORES, M.P.; CAST, A.J.; MCNAB, J.M. **Effect of enzyme supplementation to improve the nutritive and value of triticale in poultry diets**. *Animal Feeds Science and Tecnology*, Amsterdam, v.39, n.3, p. 237-243, 1994.

FOX, S.M. Probiotics: **Intestinal inoculants for production animals**. *Veterinary Medicine*, v. 83, n. 8, p.: 806-829, 1988.

FULLER, R. **Probiotics in man and animals**. A review. *J. Appl. Bacteriol.*, v.66, p. 365-378, 1989.

GANNOUN, H.; BOUALLAGUI, H.; OKBI, A.; SAYADI, S.; HAMDI, M. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of biologically pretreated abattoir wastewaters in an upflow anaerobic filter 2009. *Jornal of Hazardous Materials*, 170:263-271.

GARCIA, M.; LÁZARO, R.; LATORRE, M. A.; GRACIA, M. I.; MATEOS, G. G. Influence of enzyme supplementation and heat processing of Barley on digestive traits and productive performance of broilers. *Poultry Science*, Champaing, v. 87, p. 940-948, 2008.

GIBSON, GR; ROBERFROID, MB. **Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics**. *Journal of Nutrition* 1995.

GUAN, J.; CHAN, M.; GRENIER, C. et al. Survival of avian influenza and Newcastle diseases viruses in compost and at ambient temperatures based on virus isolation and real-time reverse transcriptase PCR. *Avian Dis.*, v. 53, p. 26 – 33, 2009.

JARONI, D.; SCHEIDELER, S.E; BECK, M.M; WYATT, C. The Effect of Dietary Wheat Middlings and Enzyme Supplementation II: Apparent Nutrient Digestibility, Digestive Tract Size, Gut Viscosity, and Gut Morphology in Two Strains of Leghorn Hens. ***Poultry Science***, Savoy, IL, v.78, p. 1664-1674, 1999.

JIN, L.Z.; HO, T.W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. **Probiotics in poultry: modes of action**. *World.s Poultry Science Journal*, v. 53, p. 351 . 368, 1997.

KIDD S. M.T.G.W. MORGAN, C.J. PRICE, P.A. WELCH, AND E.A.FONTANA. 2001. **Enzyme supplementation to corn and soybean meal diets for broilers**. *J. Appl. Poult. Res.* 10:65-70.

KULKARNI, S. R.; FRAILI, D. A.; SARI, R.; MORIARTY-SCHIEVEN, G. H.; SHEPHERS, D. S.; UDOMPRASERT, P.; READHEAD, A. C. S.; BLOOM, J. S.; FEROCI, M.; and COSTA, E. Discovery of a Radio Flare from GRB 990123. *ApJ*, 522, L97–L100, (1999)

LESSON, S.; SUMMERS, J. D.; DIAS, G. J. *Nutricion aviar comercial*. Santa Fé de Bogotá: Gonzalo J. Diaz Gonzalez, 2000. 359p.

LUCAS JÚNIOR, J. Aproveitamento energético de resíduos da suinocultura. In: ENERGIA, Automação e Instrumentação. Lavras: UFLA/SBEA, 1998. p.81-7.

LUCAS JR, J. **Algumas Considerações sobre o uso do estrume de suínos como substrato para três sistemas de biodigestores anaeróbios.** 1994. 137f. Tese (Livre-Docência Construções Rurais) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1994.

MARUTA, K. **Probióticos e seus benefícios.** In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1993, Santos. Anais... Santos: APINCO, 1993, p. 203-219.

MIRANDA, A. P. Influência da temperatura e do tempo de retenção hidráulica em biodigestores alimentados com dejetos de bovinos e suínos. 2005. 113 f. Tese (Mestrado em Zootecnia/Produção Animal)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

MIRANDA, A.P.; LUCAS JUNIOR, J. & THOMAZ, M.C. **Redução de sólidos e produção de biogás em biodigestor abastecidos com dejetos de suínos alimentados com dietas formuladas com milho ou sorgo.** In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS DE ANIMAIS, GERAÇÃO DE ENERGIA A PARTIR DE RESÍDUOS ANIMAIS, 1., 2009, Florianópolis-SC. Artigo.... Florianópolis: Sigerá, 2009, p.258-263.

MORENG, R. E.; EVANS, J. S. Ciência e produção de aves: aquecimento, criação, alojamento, equipamentos e produção de aves. São Paulo: Roca, 1990. p. 143-178.

NOGUEIRA, L. H. **Biodigestão: A Alternativa Energética.** Editora Nobel, São Paulo, 1986.

ODETALLAH N.H., Wang J.J., Garlich J.D. & Shih J.C. 2003.**Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks.***Poultry*. Sci. 82:664-670.

Ogejo, J, A & Li, L. Enhancing biomethane production from flush dairy manure with turkey processing wastewater 2010. *Applied Energy*, 87:3171-3177.

ORRICO JUNIOR, M. A. P. **Biodigestão anaeróbia e compostagem de dejetos de suínos, com e sem separação de sólidos.** 2008. 93 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

ORRICO JUNIOR, M.A.P.; ORRICO, A.C.A; LUCAS JUNIOR, J. Biodigestão anaeróbia dos resíduos da produção avícola: cama de frango e carcaças. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.30, n.3, p.546-554, 2010.

PRIMIANO, I. P. Biodigestão anaeróbia de dejetos da avicultura de postura: uso de inóculo em biodigestores batelada. 2002. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2002.

QUADROS, D.G.; OLIVER, A.P.M.; REGIS, U.; VALLADARES, R.; SOUZA, P.H.F; FERREIRA, E.J. Biodigestão anaeróbia de dejetos de carpinos e ovinos em reator contínuo de

PVC flexível. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.3, p.326-332, 2010.

Rigo, E. Aplicação de Lipaselipases como auxiliar no pré-tratamento de efluentes de frigoríficos de suínos e bovinos 2004. Dissertação de Mestrado. Universidade Regional integrada do alto Uruguai e das missões, Erechim. 84p.

ROLAND D.A. *et al.* 2006. **Comparison of Nathuphos and Phyzyme** as Phytase Sources for Commercial Layers Fed Corn-Soy Diet. Poultry Science Assoc.

ROLL, V. F. B.; LOPES, L. L.; GONÇALVES, F. M. *et al.* Condição microbiológica de cama tratada com Impact P ® em matrizes de frangos de corte. *Ciência Rural*, v.38, n.9, p.2650-2653, 2008.

ROSTAGNO, H.S. *et al.* **TABELAs brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 189, 2005.

RUTHERFURD S.M., CHUNG T.K. & MOUGHAN P.J. 2002. **The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in the broiler chicken**. *Brit. Poultry Sci.* 44:598-606.

SANTOS, T. M. B.; BASAGLIA, R.; SAKOMURA, N.; FURLAN, R. L.; LUCAS JR., J. Manure and biogas production from laying hens submitted to different ambient temperatures. In: AGENERGY'99 CONFERENCE, 1999, Athens. Proceedings... Athens: Agricultural University of Athens, 1999. v.1, p. 275-281.

SAS. **INSTITUTE SAS ® user' guide: statistics**. Cary, NC, 2002.

Schoenhals, M. Avaliação da eficiência do processo de flotação aplicado ao tratamento primário de efluentes de abatedouro avícola 2006. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 87p.

SELLE, P.H. & RAVIDRAN, V. 2007. **Microbial phytase in poultry nutrition: Review**. *An. Feed Sci. Technol.*

SGANZERLA, E. **Biodigestor, uma solução**. Porto Alegre: Agropecuária, 1983.

SHEPPY, C., **The current feed enzyme market and likely trends**. *Enzyme In: Farm Animal Nutrition*, CABI, New York, p. 1-10, 2001.

SINGH, S.: SINGH, S. K. Effect of cupric nitrat on acceleration of biogas production. **Energy Conversion and Management**, oxford, v.37, n.4, p. 417-419 1996

SOUZA, C.G. Biodigestão anaeróbia de dejetos suínos com e sem aditivo contendo *Bacillus subtilis*. **UNESP Jaboticabal 2010**.

STEIL, L. **Avaliação do uso de inoculos na biodigestão anaeróbia de resíduos de aves de postura, frango de corte e suínos**. 2001. 127f. Tese (Mestrado em Biotecnologia – Area de

Concentração em Biotecnologia) - Instituto de Química do Campus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001

STERLING, D. A.; O'CONNOR, J.A.; **Bonadies J. Geriatric falls: injury severity is high and disproportionate to mechanism.** Journal of Trauma-Injury, Infection and Critical Care 2001

TEIXEIRA, V. H. **Biogás.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. 93 p. (Textos Acadêmicos).

TOLEDO, G.S.P.; COSTA, P.T.C.; SILVA, J.H.; CECCANTINI, M.; JUNIOR, C.P. 2007. **Broilers Fed Diets Varying in Energy and Protein Supplemented with a pool of Enzymes.** *Ciência Rural*. V. 37. 2:518-523.

ULLMAN, J.L.; MUKHTAR, S.; LAVEY, R.E.; CAREY, J.B. A review of literature concerning odors, ammonia, and dust from broiler production facilities: 4. Remedial management practices. *Journal of Applied Poultry Research* v.13, p.521-531, 2004.

UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch development of small intestinal function in the Poultry. **Poultry Science**, Savoy, IL, v.38, p.215-222, 1999

VELAYUDHAN, B. T.; LOPES, V. C.; NOLL, S. L. et al. Avian pneumovirus and its survival in poultry litter. *Avian Dis.*, v.47, p. 764 – 768, 2003.

WILLIAMS, P. E. V. Animal production and european pollution problems. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 53, n. 22, p. 135-144, 1995.

YU, B.; WU, S.T.; LIU, C.C; GAUTHIER, R.; CHIOU, P.W.S. Effects of enzyme inclusion in a maize-soybean diet on broiler performance. **Animal Feed Science and Technology**, New York, v. 134, p. 283-294, 2007