

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**DINÂMICA DA POPULAÇÃO DE COLIFORMES
APÓS A APLICAÇÃO DE DEJETOS DE SUÍNOS NO
SOLO E DURANTE A SUA COMPOSTAGEM
AUTOMATIZADA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariangela Facco de Sá

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

**DINÂMICA DA POPULAÇÃO DE COLIFORMES APÓS A
APLICAÇÃO DE DEJETOS DE SUÍNOS NO SOLO E
DURANTE A SUA COMPOSTAGEM AUTOMATIZADA**

Mariangela Facco de Sá

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração Biodinâmica e Manejo do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência do Solo.**

Orientador: Dr. Celso Aita

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

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

Sá, Mariangela Facco de
Dinâmica da população de coliformes após a aplicação de
dejetos de suínos no solo e durante a sua compostagem
automatizada / Mariangela Facco de Sá.-2012.
82 f.; 30cm

Orientador: Celso Aita
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência do Solo, RS, 2012

1. E. coli. 2. Resíduos da suinocultura. 3. Tratamento
de efluentes. I. Aita, Celso II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DINÂMICA DA POPULAÇÃO DE COLIFORMES APÓS A
APLICAÇÃO DE DEJETOS DE SUÍNOS NO SOLO E DURANTE A SUA
COMPOSTAGEM AUTOMATIZADA**

elaborada por:
Mariangela Facco de Sá

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência do Solo

COMISSÃO EXAMINADORA

Celso Aita, Prof. Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Stefen Barbosa Pujol, Dr. (UFSM)

Noeli Julia Schüssler de Vasconcellos, Prof. Dr^a. (UNIFRA)

Santa Maria 31 de agosto de 2012.

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 mestrado.

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 e amigo fiel, pelo carinho 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, pelo amor, carinho, companheirismo a mim dedicados e pela compreensão da minha ausência nos momentos em que precisaram durante essa jornada.

Ao prof. Celso Aita pela orientação, confiança e oportunidade no decorrer deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Ezequiel (Keko), Rogério, Alexandre, Rafael, Janquieli, Alessandra e aos bolsistas (IC) Alexandre (Tocaio), Adônis, Regis, Roberto e Diego. Meu agradecimento especial a Géssica, Indiara, Priscila e Paulinha pela dedicação e ajuda no decorrer desta etapa, vocês foram fundamentais para o êxito deste trabalho.

Agradeço em especial ao Prof. Flávio Heltz, pela importante ajuda durante toda esta etapa. Ao Stefen Pujol, pela amizade, ajuda e conselhos, foram importantes para que eu chegasse até aqui. Ao Mauricio pela ajuda e palavras de incentivo, nem todos os chocolates de Santa Maria seriam suficientes para pagar o tempo que dedicastes a mim.

Aos amigos Laura, Luciano, Kika, Luciana, Nica, Tiago, pelos momentos de descontração (musica chimarrão e algumas cervejinhas).

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

“Pouco conhecimento faz com que as criaturas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto as cheias a baixam para a terra, SUA MÃE”.

Leonardo da Vinci

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Universidade Federal de Santa Maria

DINÂMICA DA POPULAÇÃO DE COLIFORMES APÓS A APLICAÇÃO DE DEJETOS DE SUÍNOS NO SOLO E DURANTE A SUA COMPOSTAGEM AUTOMATIZADA

AUTOR: Mariangela Facco de Sá

ORIENTADOR: Dr. Celso Aita

Data e local da defesa: Santa Maria, 31 agosto de 2012.

Os dejetos líquidos de suínos (DLS) podem apresentar microrganismos fecais e parasitas que contaminam o solo e mananciais d'água. O tratamento eficiente destes dejetos evita o acúmulo de material orgânico e reduz a população de microrganismos, facilitando seu uso agrícola. Com o objetivo de avaliar a dinâmica de coliformes, foram conduzidos dois experimentos. Um experimento constou da aplicação dos DLS em superfície e injetados no solo, avaliando-se, durante 203 dias, a população de bactérias fecais na água de escoamento superficial, pela técnica do número mais provável (NMP), utilizando-se caldo Fluorocult, incubação a 37 °C por 24 h e posterior leitura por luz UV. O trabalho foi feito em blocos ao acaso com três repetições, em um solo Argissolo, na área experimental do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O modo de aplicação dos dejetos líquidos no solo não afetou a dinâmica da população de coliformes fecais, sendo que aos 203 dias após a aplicação dos DLS ainda foram detectados coliformes na água de escoamento. No outro experimento, os DLS foram tratados durante 156 dias em um sistema de compostagem aeróbica automatizada, utilizando como substrato a mistura de serragem e maravalha. Avaliou-se na compostagem o efeito da adição de ácido fosfórico aos dejetos, até pH 6,0 sobre a população de coliformes. O processo de compostagem automatizada foi eficiente na redução da população de coliformes fecais dos dejetos, cujos valores de 0,19 NMP g⁻¹ de composto sem adição de ácido e de 0,03 NMP g⁻¹ de composto com adição de ácido, que não diferem entre si, ficam abaixo dos limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que é de 1,0 x 10³. A redução obtida pela compostagem foi equivalente a 99,99%.

Palavras-chave: *E. coli*. Resíduos da suinocultura. Tratamento de efluentes.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Soil Science
Federal University of Santa Maria

POPULATION DYNAMICS OF COLIFORMS AFTER APPLICATION OF PIG SLURRY IN THE SOIL AND DURING THEIR AUTOMATED COMPOSTING

AUTHOR: Mariangela Facco de Sà

ADVISOR: Dr. Celso Aita

Date and place of the defense: Santa Maria, August 31th 2012.

The pig slurry (DLS) may have fecal microorganisms and parasites that contaminate soil and water sources. The efficient treatment of waste prevents the accumulation of organic material and reduces the population of microorganisms, facilitating its use in agriculture. Aiming to evaluate the dynamics of coliforms, two experiments were conducted. An experiment consisted of applying DLS surface and injected into the soil, evaluating, during 203 days, the population of fecal bacteria in runoff water, the technique most probable number (MPN), using broth Fluorocult, incubation at 37 ° C for 24 h and subsequent reading by UV light. The work was done in a randomized block design with three replications, in an Ultisol soil in the experimental area of the Department of Soils at the Federal University of Santa Maria (UFMSM). The mode of application of liquid manure in the soil did not affect the population dynamics of faecal coliforms, and at 203 days after application of DLS even coliforms were detected in runoff water. In another experiment, the DLS were treated for 156 days in an automated system for aerobic composting, using as substrate a mixture of sawdust and wood shavings. We evaluated the effect of composting adding phosphoric acid to the slurry until pH 6.0 on the coliform population. The automated composting process was effective in reducing the population of manure fecal coliforms, whose values of 0.19 NMP g⁻¹ compound without the addition of acid and 0.03 NMP g⁻¹ compound with acid addition, which do not differ, are below the limits set by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), which is 1.0 x 10³. The compost obtained by reduction was equivalent to 99.99%.

Keywords: E. coli. Swine waste. Effluent treatment.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Local da realização do experimento com quatro blocos (BI a BIV) e três tratamentos (T1= testemunha; T2= DSL injetado; T3= DSL superficial) no departamento de Solos, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. Fonte: Miola (2011). 38
- Figura 2 – Tratamentos (parcelas) com sistema para coleta de água escoada. Fonte: Miola (2011). 39
- Figura 3 – Leiras revestidas com polietileno e com substrato (a) e máquina revolvedora (b). Fonte: DONEDA (2012). 40
- Figura 4 – Tubos com caldo Fluorocult onde os amarelo-claros são negativos para a presença de coliformes totais e fecais e os tubos verde-azulados são positivos para a presença dos coliformes totais (a) e tubos que ao receberem luz ultravioleta apresentam fluorescência são positivos para coliformes fecais e *E. coli* (b). Fonte: Arquivo pessoal. 41
- Figura 5 – Coleta de amostra do composto nas leiras (a) e agitação do composto diluído em água peptonada (b). Fonte: Arquivo pessoal. 43
- Figura 6 – Aplicação dos dejetos nas leiras (a) e máquina revolvedora acoplada nas leiras e fazendo o seu revolvimento (b). Fonte: Arquivo pessoal. 47
- Figura 7 – Concentração de coliformes totais na água escoada superficialmente nos tratamentos com aplicação de dejetos líquidos de suínos (DLS) na superfície (DLS sup.) e com injeção (DLS inj.) no solo, precipitação pluviométrica e irrigação no período experimental. (A) Aplicação de dejetos de suínos para cultivo de aveia preta; (R) Reaplicação dos dejetos para o cultivo do milho. 51
- Figura 8 – Concentração de coliformes fecais na água escoada superficialmente nos tratamentos com aplicação de dejetos líquidos de suínos (DLS) na superfície (DLS sup.) e com injeção (DLS inj.) no solo, precipitação pluviométrica e irrigação no período experimental. (A) Aplicação de dejetos de suínos para cultivo de aveia preta; (R) Reaplicação dos dejetos para o cultivo do milho. 54
- Figura 9 – População de coliformes totais (CT) em dejetos líquidos de suínos (DLS), com e sem adição de ácido fosfórico antes da sua aplicação nas leiras de compostagem e população de CT no composto obtido. As barras de erro representam o erro padrão da média. 56
- Figura 10 – Variação média da temperatura do ambiente e das leiras de compostagem, onde dejetos líquidos de suínos (DLS), com e sem a adição de ácido fosfórico, foram adicionados à mistura de maravalha + serragem como substrato. As setas com linhas cheias indicam a adição dos DLS e revolvimento das leiras e as pontilhadas somente revolvidas durante o processo de compostagem. 58
- Figura 11 – Variação da umidade e pH ao longo do processo de compostagem nos tratamentos com e sem adição de ácido fosfórico. As barras de erro representam o erro padrão da média. 60

Figura 12 – População de coliformes fecais (CF) em dejetos líquidos de suínos (DLS), com e sem adição de ácido fosfórico antes da sua aplicação nas leiras de compostagem e população de CF no composto obtido. As barras de erro representam o erro padrão da média.63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Características dos Dejetos Líquidos de Suínos (DLS) utilizados na compostagem, data, quantidade em litros, matéria seca, nitrogênio total (N total), nitrogênio amoniacal (N amoniacal) e coliformes totais e fecais (NMP mL⁻¹).....45
- Tabela 2 – Eficiência de remoção de coliformes fecais dos dejetos líquidos de suínos em compostagem automatizada com e sem adição de ácido fosfórico64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Organismos patogênicos	16
2.2 Coliformes em dejetos de suínos	17
2.3 Transporte e sobrevivência dos microrganismos fecais no ambiente.....	17
2.3.1 Contaminação do solo	19
2.3.1.1 Mecanismos de transporte de bactérias através do solo	19
2.3.1.2 Fluxo, Infiltração e Escoamento superficial de água no solo	20
2.3.2 Contaminação da água.....	21
2.3.3 Contaminação do ar	22
2.4 Fatores que afetam a sobrevivência de microrganismos fecais.....	22
2.4.1 Temperatura.....	23
2.4.2 pH	24
2.4.3 Umidade	24
2.4.4 Matéria orgânica e nutrientes	25
2.5 Coliformes e Escherichia coli como indicadores de contaminação fecal.....	26
2.5.1 Coliformes totais	27
2.5.2 Coliformes fecais	27
2.5.3 Escherichia coli.....	28
2.6 Métodos utilizados para determinar Coliformes.....	30
2.6.1 Método da fermentação dos tubos múltiplos.....	30
2.6.2 Métodos rápidos de identificação	31
2.6.2.1 Substratos cromogênicos	32
2.6.2.2 Substratos fluorogênicos.....	32
2.7 Alternativas tecnológicas para mitigar o potencial poluidor por microrganismos fecais.....	33
2.7.1 Aplicação de dejetos de suínos em superfície e injetados no solo	34
2.7.2 Compostagem	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Caracterização da Área de Estudo.....	37
3.1.1 Estudo I.....	37
3.1.2 Estudo II	39
3.2 Análises microbiológicas.....	40
3.2.1 Estudo I.....	40
3.2.2 Estudo II	42
3.2.2.1 Caracterização do substrato, DLS utilizado e metodologia de aplicação do DLS	43
3.3 Análises realizadas no estudo II	47
3.3.1 pH	47
3.3.2 Temperatura.....	47
3.3.3 Umidade	48
3.3.4 Matéria seca.....	48
3.3.5 Nitrogênio amoniacal	48
3.3.6 Nitrogênio total.....	48
3.4 Análises estatísticas	49

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Estudo I - Presença de coliformes na água escoada superficialmente após aplicação de dejetos líquidos de suínos em superfície e injetado no solo	50
4.2 Estudo II - Dinâmica da população de coliformes totais e fecais durante o tratamento de dejetos líquidos de suínos (DLS) com compostagem automatizada.....	55
5 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a 4ª posição na produção de carne suína no mundo atrás da China, União Europeia e Estados Unidos (ABIPECS, 2011) e conta com um efetivo de 39 milhões de cabeças de suínos (IBGE, 2010), sendo a maior produção encontrada nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná. Desta forma a suinocultura é citada como uma das grandes responsáveis pelo desenvolvimento econômico do Brasil (OLIVEIRA et al., 2006; FONSECA et al., 2009) e de destacada importância na região sul do País.

O aumento da produção suinícola enfrenta um grande desafio, produzir sem agredir o meio ambiente e exaurir os recursos naturais, devido aos impactos produzidos pelos grandes volumes de dejetos com elevada concentração de matéria orgânica e altos riscos de contaminação do ambiente (DALLA COSTA, 2004; VIVAN et al., 2010).

A necessidade crescente de novas alternativas para reciclagem destes dejetos, que não dependam do uso direto como fertilizante, devem ser mais abrangentes envolvendo todos os segmentos da cadeia produtiva, levando em consideração os conceitos de sustentabilidade ambiental, pois, o processo de concentração da suinocultura se manteve crescente e a estrutura fundiária e proporção de terras aptas à agricultura permaneceram as mesmas, gerando sobrecarga de dejetos por unidade de área nestas propriedades (PERDOMO, 2003). Além disso, a concentração da produção e as inovações tecnológicas introduzidas no setor (genética, nutricional e manejo), juntamente com a desvinculação da interação suinocultura com áreas de lavoura para a disposição de efluentes, têm contribuído para a intensificação do problema (MIELLE, 2006).

Os microrganismos presentes nos dejetos desempenham diversas funções de importância fundamental nas transformações do material orgânico e o tratamento biológico dos dejetos depende essencialmente da atuação desses microrganismos. A prática mais comum de utilização dos dejetos líquidos devido ao sistema de plantio direto é a aplicação em superfície, muitas vezes sem tratamento prévio, o que gera um passivo ambiental. Recentemente trabalhos têm sido realizados para analisar o tempo de sobrevivência das bactérias fecais no solo e na água escoada após aplicação dos dejetos líquidos em superfície e injetados no solo. Quando o dejetos é injetado no solo os microrganismos são menos susceptíveis a destruição por radiação ultravioleta (UV), do que os aplicados em superfície.

Por outro lado a injeção do dejetos propicia a adsorção dos microrganismos pelas partículas de solo (UNC et al., 2004).

Atualmente uma estratégia para o desenvolvimento da suinocultura visando reduzir o impacto ambiental ocasionado pela deposição inadequada dos dejetos no ambiente, é a adoção da reciclagem desses resíduos através da compostagem automatizada antes da sua utilização como fertilizante. Nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina observa-se que a maioria dos suinocultores utiliza sistemas de produção que propiciam elevada geração de dejetos líquidos, ocasionado por vazamentos no sistema hidráulico, desperdício de água nos bebedouros e sistema de limpeza inadequado (WATABE et al., 2003; KUNZ et al., 2009). Tais dejetos são adicionados no solo sem tratamento prévio, transformando-se em importante fonte de poluição ambiental com elevado número de contaminantes presentes, causando uma forte degradação do ar, do solo e dos recursos hídricos (SEGANFREDO, 2007),

O problema se agrava ainda mais devido a sistemas de armazenagem mal dimensionados, infraestrutura de distribuição deficiente e pequenas áreas agrícolas para aplicação dos dejetos. Os dejetos de suínos são reservatórios potenciais de nutrientes e podem ser usados como fertilizantes orgânicos, o que nas unidades criadoras é um componente importante e bastante utilizado (GESSEL et al., 2004, ASSMANN et al., 2009, BARROS et al., 2011). No entanto, uma grande diversidade de bactérias patogênicas como *E. coli*, *Balantidium sp.*, *Salmonella sp.*, etc, protozoários, fungos e helmintos podem ser encontrada nesses dejetos e representam ameaça à saúde pública (GERBA et al., 2005; WONG et al., 2009), uma vez que podem permanecer no ambiente criatório por longos períodos de tempo devido a circulação dentro da fazenda, seja nos equipamentos de alimentação, bebedouros e nos dejetos aplicados ao solo dentro da propriedade para produzir alimentos (BALODA et al., 2001; SEMENOV et al., 2010;), onde o risco de contaminação irá depender em grande parte da capacidade de sobrevivência dos microrganismos no ambiente (JACOBSEN et al., 2012).

Muitos patógenos podem ser encontrados em resíduos orgânicos, porém a identificação e isolamento destes são problemáticos, por isso são utilizados organismos indicadores de contaminação fecal. Os organismos utilizados devem ser de fácil e rápida amostragem, distinguível da microbiota indígena, velocidade de crescimento e morte semelhante ao patógeno e sobrevivência levemente superior, ter como habitat exclusivo o trato gastrointestinal do homem e animais homeotérmicos, ter alta resistência extra enteral e modelar o comportamento de agentes patogênicos durante o tratamento de resíduos. Os indicadores de qualidade da água e alimentos mais comumente usados como indicadores de

qualidade da água e alimentos são bactérias fecais pertencentes ao grupo dos coliformes e apresentam-se em grandes quantidades nos dejetos.

Nas últimas três décadas, o número de infecções associadas ao consumo de produtos orgânicos, principalmente *in natura* tem aumentado (GUAN et al., 2003; WATABE et al., 2003; KIEHL 2005; JACOBSEN et al., 2012), e esse incremento está relacionado à mudanças de hábitos do consumidor que passou a procurar mais alimentos orgânicos frescos, gerando assim métodos agrícolas mais intensivos para que essa produção fosse maximizada (FRANZ et al., 2008).

Porém os efeitos das modalidades de aplicação dos dejetos e da persistência dos patógenos não estão bem documentados e, por isso, são necessárias mais informações sobre a persistência dos patógenos, os riscos de transporte através da água escoada pós-aplicação dos dejetos líquidos no solo e a eficiência do tratamento dos dejetos pelo processo de compostagem. Tais informações são essenciais à tomada de decisão quanto à gestão dos dejetos nas propriedades das regiões envolvidas com a suinocultura, com vistas à redução do impacto ambiental negativo desta atividade. Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar a transferência horizontal (água escoada) de coliformes fecais em função do modo de aplicação de dejetos líquidos de suínos no solo (injetado x superfície) e avaliar a eficiência do tratamento dos dejetos líquidos de suínos via compostagem automatizada na redução da população de coliformes fecais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Organismos patogênicos

Os organismos patogênicos, normalmente presentes nos dejetos de suínos, podem ser divididos em cinco grupos: vírus (enterovirus, parvovirus e rotavirus), bactérias (*Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, etc), protozoários (*Giardia* spp., *Cryptosporidium* sp.), fungos e helmintos, representando grande risco à saúde humana e animal (SCHMIDT et al., 2007).

Os sistemas de tratamento convencionais não são capazes de eliminar 100 % os microrganismos e parasitas, pois o risco de contaminação não depende exclusivamente do valor da concentração de coliformes fecais, uma vez que os organismos patogênicos podem se comportar de forma distinta (ASHBOLT et al. 2001; GRABOW, 2001; DALFIOR, 2005) como por exemplo, *Cryptosporidium* sp., cujas características têm mostrado que os métodos envolvendo a detecção de organismos indicadores não são adequados na determinação do nível de contaminação deste protozoário (FERREIRA et al., 2005).

Muitas são as alternativas para o tratamento dos dejetos de suínos, visando à destruição de microrganismos patogênicos, onde a compostagem tem se mostrado como uma das mais eficientes (VALENTE et al., 2009; VERGNOUX et al., 2009). A intensa atividade microbiológica durante o processo de compostagem permite o desenvolvimento de uma população de microrganismos termófilos o que faz com que a temperatura do meio se mantenha elevada por vários dias, eliminando os microrganismos mesófilos. Nesta fase ocorre a rápida decomposição dos materiais mais recalcitrantes e a destruição de grande parte dos patógenos, garantindo que o composto obtido não coloque em ameaça a saúde pública ou o meio ambiente (BOULTER et al., 2000; KIEHL, 2004).

Porém a sucessão e o envolvimento de comunidades microbiológicas e suas atividades, durante as fases específicas do processo de compostagem, ainda são pouco conhecidas (SAID-PULLICINO et al., 2007; ADAMS et al., 2008). A segurança biológica do uso de dejetos de suínos no solo depende de uma análise aprofundada dos níveis de contaminação, dos processos de desinfecção e dos componentes deste dejetos no solo, especialmente em relação aos ovos de helmintos e oocistos de protozoários que apresentam maior tempo de sobrevivência no solo e são os mais resistentes aos processos de desinfecção.

2.2 Coliformes em dejetos de suínos

Medir a concentração inicial de bactérias entéricas nos dejetos dos animais antes da aplicação no solo é essencial para a avaliação das consequências negativas do manejo e da disposição inadequada desse resíduo, como o lançamento direto em cursos d'água, tendo em vista que um apreciável volume produzido e lançado resulta em consequências danosas (MOORE et al., 1988).

Essas concentrações determinam a quantidade máxima de bactérias fecais disponíveis para poluir as águas superficiais e subterrâneas e a eficácia dos sistemas de tratamento para a remoção destas bactérias. Estudos realizados por Unc et al., (2004) sugerem que a taxa de sobrevivência de bactérias entéricas potencialmente patogênicas sejam maiores nos dejetos líquidos de suínos do que nos dejetos de aves e de bovinos. Os dejetos de suínos são armazenados na forma líquida devido à necessidade constante de higienização das instalações e estas bactérias possuem maior mobilidade na fase líquida quando comparadas a fase sólida.

Desta forma estratégias no manejo de dejetos de suínos, como armazenamento em bioesterqueiras por longo prazo ou compostagem, são fundamentais para diminuir as concentrações de patógenos e diminuir o risco de contaminação antes que sejam aplicados ao solo (JAMIESON et al., 2002).

2.3 Transporte e sobrevivência dos microrganismos fecais no ambiente

A sobrevivência das bactérias fecais fora do trato gastrintestinal dos animais de sangue quente é considerada desfavorável, mas algumas dessas podem sobreviver por períodos de até sessenta dias (NEELY, 2000; ROBINE et al., 2000; COOLS, 2001; FENLON et al., 2002;), uma vez que não dependem de célula hospedeira para a replicação e podem multiplicar-se no ambiente sob condições favoráveis (CEUSTERMANS et al., 2007).

Desta forma, a sobrevivência dos microrganismos no solo, na água e nos dejetos indica uma variabilidade significativa na resistência aos desafios ambientais característicos para cada organismo, pois em geral agentes patogênicos sobrevivem mais tempo, respectivamente, na água, no dejetos e no solo em temperaturas mais baixas (GUAN et al., 2003). *E. coli*, por exemplo, sobreviveu em água a 8 °C por mais de 91 dias mas não era

detectável após 84 dias a uma temperatura de 25°C (WANG et al., 1998). Nas fezes, *E. coli*, pode sobreviver por até 10 semanas, produzir toxinas e multiplicar-se em temperaturas de 22 a 37 °C e quando depositada no solo, *E. coli*, pode sobreviver, reproduzir e mover-se por um período de até dois meses, podendo gerar contaminação do lençol freático por lixiviamento (ELVING, 2009).

Os estudos sobre transporte de bactérias fecais através do solo tem se concentrado em seu potencial de infiltração e na possibilidade de se transferirem para os recursos hídricos subterrâneos e cursos de água superficiais e na avaliação dos métodos de manuseio, que irão influenciar no potencial de contaminação e na alteração da população bacteriana durante o armazenamento, além da sobrevivência das bactérias fecais no ambiente (FENLON, 2000; WONG et al., 2009).

A sobrevivência e transporte dos microrganismos fecais para o meio ambiente dependerá de uma série de fenômenos complexos devido as interações dos processos que regulam essa movimentação no solo (RODRIGUES et al., 2011; JACOBSEN et al., 2012), como a taxa de infiltração de água no solo propiciando o escoamento superficial, alteração nas propriedades físico-químicos do solo existentes antes da aplicação dos dejetos (UNC et al., 2004), modo de aplicação dos dejetos, competição com as bactérias nativas do solo que levam vantagem perto da superfície do solo (LEVANON et al., 1994; ZALESKI et al., 2005), fluxo de água, filtração física e retenção de células bacterianas através das partículas do solo (RODRIGUES, et al., 2011)estirpe bacteriana e estado fisiológico das células (JACOBSEN, et al., 2012).

O nível de nutrientes no solo também deve ser considerado por ser um fator que influencia na taxa de sobrevivência, pois a aplicação de compostos ricos em nitrogênio combinados com amônia, N₂O e toxidade dos ácidos graxos podem eliminar patógenos presentes no solo (TENUTA et al., 2002; RUIVO et al., 2006). Assim, a amônia presente no dejetos líquido pode ser tóxica a população microbiana quando em níveis elevados e simultaneamente algumas proteínas são degradadas por amonificação, o que leva a um aumento do pH e do nível de amônia podendo ameaçar a sobrevivência de muitos microrganismos patogênicos (CEMPÍRKOVÁ et al., 2007)

A relação Carbono: Nitrogênio (C:N) dos dejetos líquidos de suínos (DLS) é em média 1:11. Desta forma, o C pode ser um fator limitante para o crescimento bacteriano, porque apesar de grande parte do C estar prontamente disponível para que a decomposição no dejetos de suínos ocorra, há uma grande demanda bioquímica de oxigênio (DBO) que varia

entre 70000 e 200000 mg L⁻¹ (ASE, 1998) e isso gera dúvidas se realmente é o C ou o acúmulo de componentes tóxicos que limita o crescimento bacteriano (POTTER et al., 2001).

2.3.1 Contaminação do solo

A persistência dos coliformes no solo depende do tipo e da densidade dos microrganismos nos dejetos das condições físico-químicas do solo, das condições atmosféricas, das interações biológicas e dos métodos de aplicação dos dejetos (GOSS et al., 2002; CARGNIM et al., 2006). Já a sobrevivência dos coliformes fecais no solo está intimamente ligada a vários fatores como: pH, potencial de retenção ou teor de água no solo (quanto maior, mais chances de sobrevivência), população nativa do solo, temperatura do solo, onde temperaturas mais baixas favorecem a sobrevivência das bactérias fecais, aumento de nutrientes prontamente disponíveis no dejetos introduzido. Assim, em condições favoráveis de pH, temperatura e nutrientes, a sobrevivência das bactérias fecais podem se estender por vários meses após a aplicação do dejetos no solo.

No solo, o transporte das células bacterianas ocorre geralmente de forma passiva e é determinada pela presença de fluxos rápidos de água, embora a motilidade celular possa desempenhar um significado importante na circulação em suspensão em distâncias curtas, o que influencia na direção de transporte de bactérias (superficial ou subterrâneo), a partir da aplicação do dejetos (UNC et al., 2004).

2.3.1.1 Mecanismos de transporte de bactérias através do solo

O transporte de bactérias no solo obedece às leis gerais pertinentes ao fluxo de macroporos do solo e a interação entre partículas e superfícies de carga variável (RODRIGUES et al., 2011). A aplicação de DLS pode causar mudanças significativas nas propriedades físico-químicas do solo e sua interação com as células bacterianas devido ao aumento da filtração proporcionada pelo alto teor de matéria orgânica presente no dejetos. Ocorre a modificação da cinética nas interações físico-químicas no solo, alterando a

competição por sítios de retenção entre partículas e compostos solúveis (MELLO et al., 2004; UNC et al., 2004; BASSO et al., 2005; RUIVO et al., 2006).

As bactérias ao serem introduzidas no solo através da aplicação de DLS, podem ligar-se às partículas dos resíduos ou a células planctônicas e estas vão ligar-se as partículas do solo, dependentes do modo de introdução dos dejetos no solo (JACOBSEN et al., 2012).

2.3.1.2 Fluxo, infiltração e escoamento superficial de água no solo.

O fluxo de água através do solo é bastante complexo e vai ser determinada principalmente pela textura, estrutura, propriedades hidráulicas, inclinação e cobertura do solo. A água de irrigação ou da chuva, dependendo da intensidade e quantidade pode infiltrar ou escoar no solo (JACOBSEN et al., 2012).

O transporte de bactérias fecais através do solo é determinado principalmente pela presença de água e caminhos preferenciais no fluxo desta, no solo, e estes caminhos irão determinar a direção do transporte bacteriano, que pode ser tanto para águas subterrâneas ou para água escoada na superfície (VINTEN et al., 2002; UNC et al., 2003; GENTRY et al., 2006; GOSS et al., 2008). A taxa de infiltração de água no solo é determinada pela capacidade de retenção de água, propriedades hidráulicas, tamanho do poro e tipos de cobertura que o solo apresenta. Em solos arenosos os poros são maiores o que favorece vias mais fáceis através da matriz do solo para infiltração de água, enquanto que em solos argilosos os poros são menores, porém são muito mais heterogêneos o que irá favorecer a infiltração de maneira mais rápida quando o solo está próximo da saturação (JARVIS, 2007; JACOBSEN et al., 2012).

Com relação ao fluxo preferencial da água em macroporos, McMurry et al. (1998) e Unc et al. (2003) relatam que esta é determinada pelo comprimento e conectividade do solo e, que independentemente do tipo de solo, transportará rapidamente bactérias desde que receba taxas de água suficientes.

Ao se analisar a retenção de *E. coli* no solo durante a infiltração é necessário considerar a capacidade que o microrganismo possui de formar biofilme. A capacidade de produzir biofilme em *E. coli* e *Salmonella* spp. são semelhantes entretanto, a *Salmonella* spp., possui uma menor capacidade de retenção no solo o que eleva o risco de infiltração no solo, transporte por escoamento ou de contaminação de águas subterrâneas (SALVUCCI, 2009).

O tamanho e a densidade da partícula irão determinar a velocidade de sedimentação na água escoada, pois pequenas partículas, com baixa densidade, sedimentam mais lentamente do que partículas grandes com alta densidade. O escoamento superficial de água ocorre quando a intensidade da precipitação excede a taxa de infiltração ou quando o solo é saturado, e o transporte das células bacterianas pode ser comparado com o transporte das partículas do solo (RODRIGUES et al., 2011; JACOBSEN, et al., 2012).

Além disso, os microrganismos têm densidade em torno de $1,1 \text{ g cm}^{-3}$ e um tamanho de 1 - 2 μm de diâmetro, enquanto uma partícula de solo tem densidade em torno de $2,65 \text{ g cm}^{-3}$ e diferem em tamanho onde a menor partícula é a fração argila, que tem aproximadamente 2 μm , influenciando diretamente na velocidade de sedimentação da água de escoamento (PAUL et al., 1996). Mckergow et al. (2010), ao monitorarem a dinâmica de uma tempestade em uma bacia de captação com 2.180 km^2 , descobriram que 98% das *E. coli* detectadas estavam na superfície da água e que a concentração destas excedia a turbidez da água, uma vez que esta bactéria é mais comumente encontrada em água turvas, e esta menor deposição pode ser explicado devido a baixa densidade e menor tamanho da *E. coli* quando comparada com as partículas do solo.

Muirhead et al. (2006), ao compararem o transporte de *E. coli* e células planctônicas em um solo saturado, descobriram que as células planctônicas foram mais facilmente transportadas através do solo. Guber et al. (2007) verificaram que o dejetos diminuiu a fixação de coliformes fecais nas frações argila e silte, e portanto, verificaram que diminuiu a proporção destes na água de escoamento.

2.3.2 Contaminação da água

A preocupação com a qualidade da água tem aumentado nos últimos anos em função dos surtos com doenças de veiculação hídrica cada vez mais frequentes e pela contaminação da água potável por coliformes como *E. coli* 0157:H7, *Cryptosporidium*, *Giardia* e outros patógenos (SEGANFREDO et al., 2003; MEAYS et al., 2004).

Sem dúvida, a escolha de formas adequadas de manejo dos dejetos de suínos é o maior desafio da suinocultura, em função dos custos e dificuldades de armazenamento, tratamento, transporte, distribuição e utilização na agricultura, uma vez que o excesso de dejetos no solo

causa sérios impactos ambientais negativos, além de provocar a poluição das águas e até do lençol freático (OLIVEIRA et al., 2006).

Além dos macronutrientes essenciais (N e P), os dejetos de suínos, devido à suplementação mineral oferecida aos animais, contêm micronutrientes como zinco, manganês, cobre e ferro, que em doses elevadas são tóxicos aos vegetais e microrganismos. Porém os principais constituintes dos dejetos suínos que afetam as águas superficiais são a matéria orgânica, os nutrientes e as bactérias fecais e os que afetam águas subterrâneas são os nitratos e as bactérias. (NOLASCO et al., 2005; JACOBSEN et al., 2012;).

Por outro lado, a adição de dejetos suínos nos corpos d'água causa um rápido aumento populacional das bactérias, que utilizam o oxigênio dissolvido (OD) da água para seu crescimento, ocasionando uma perda na qualidade ambiental do corpo d'água, que pode causar mortandade de peixes (OLIVEIRA et al., 2006).

2.3.3 Contaminação do Ar

O processo produtivo, como os dejetos, geram resíduos que podem trazer danos ao meio-ambiente, aos próprios animais e ao homem. A contaminação do ar se dá pelos dejetos gasosos como a amônia e o sulfeto de hidrogênio e na forma sólida, a poeira.

A contaminação do ar em nível macro regional integra-se na escala global junto às emissões de CO₂, N₂O e CH₄, colaborando com o aquecimento do ambiente terrestre, enquanto que em nível micro regional provoca desconforto ambiental proveniente de insetos e maus odores. Estes odores, de acordo com o tempo de exposição e ligados a fatores do meio ambiente, podem causar náuseas, irritações, estresse, dores de cabeças e outras implicações à saúde (DIESEL et al., 2002; WATABE et al., 2003, SILVA & MARQUES, 2004; SEGANFREDO, 2007).

2.4 Fatores que afetam a sobrevivência de microrganismos fecais

A sobrevivência de bactérias patogênicas no solo e no produto final da compostagem depende de alguns fatores, tais como: temperatura, pH, umidade, quantidade de nutrientes e

matéria orgânica, predação por protozoários, número inicial de organismos presentes e radiação solar, que são os principais fatores que afetam a sobrevivência dos microrganismos fecais (JAMIESON et al., 2004; MEAYS et al., 2004; COOLS, 2001; JACOBSEN et al., 2012).

2.4.1 Temperatura

Quando ocorre a decomposição da matéria orgânica via compostagem, o calor gerado pelo metabolismo dos microrganismos se acumula e a temperatura alcança valores altos (DAI PRÁ, 2006) e esta combinação de efeitos térmicos aumenta a atividade da microflora e da fauna nativa (RODRIGUES et al. 2011) resultando na redução da população bacteriana contaminante, enquanto que em temperaturas mais baixas a população nativa diminui a atividade e propicia o crescimento dos contaminantes (COOLS, 2001). A faixa de variação ao longo de todo o processo define principalmente, o tipo de microrganismos predominantes e sua eficiência em termos agrícolas e sanitários.

A faixa de temperatura ideal a ser atingida durante o processo de compostagem é que varie entre 23°C e 70°C (MUKHTAR et al., 2004). Entretanto, temperaturas abaixo de 60°C não eliminam microrganismos, ovos de patógenos, larvas e sementes de ervas daninhas.

Durante os primeiros 15 a 20 dias, os valores desejáveis são de 60°C a 70°C, o que é importante e necessário para eliminação dos possíveis problemas (KIEHL, 2005). Na segunda etapa, a massa em compostagem deve atingir faixas de 45°C a 55°C, decrescendo conforme a humificação do material deixando as propriedades químicas do composto estabilizadas, até chegar a faixas iguais à temperatura ambiente, quando o composto será considerado maturo.

No entanto Turner (2002), após experimento avaliando a inativação de organismos patogênicos na compostagem de dejetos de suíno com o uso de palha, relata que a inativação destes microrganismos não é meramente dependente da temperatura, sendo influenciada também por outros fatores, como umidade, pH e natureza das matérias-primas.

2.4.2 pH

Considerando que o pH não é um fator crítico na compostagem, seu valor indica o estágio em que o material se encontra dentro do processo (JIMENEZ & GARCIA, 1989), o que irá afetar diretamente o metabolismo, a permeabilidade da membrana e a absorção dos microrganismos, além da interferência na disponibilidade de nutrientes e solubilização de elementos tóxicos (TRAUTMANN et al., 1997; FERNANDES et al., 2005; KIEHL, 2005;).

Para a maioria das bactérias a faixa ótima de pH é entre 6 e 7,5, no início do processo o pH do composto varia entre 4,0 e 5,0 devido a formação de ácidos orgânicos ou acúmulo de ácidos intermediários formados a partir da grande quantidade de material carbonáceo presente (KIEHL, 1998; YENGAR et al., 2005), indicando também falta de maturação no processo ou ocorrência de anaerobiose no interior da pilha. Após certo período, este se eleva, à medida que os ácidos são metabolizados, tendendo à alcalinidade no final do processo chegando a ficar na faixa de 7,5 a 9,0 (). (SILVA et al., 2003; PEREIRA NETO, 2004).

No entanto Graves et al. (2000), cita como faixa ideal de pH para a atividade microbiana entre 6,5 a 8,0 porque é onde ocorre maior degradação do material orgânico e o autor destaca que um pH abaixo de 5,0 e acima de 9,0 faz com que a compostagem se processe de forma muito lenta, o que pode ocasionar em resíduos ricos em nitrogênio em pH básico (pH > 8,5) a conversão de compostos orgânicos contendo nitrogênio em amônia. Essa conversão possibilita grandes perdas de nitrogênio do material por volatilização.

Em experimento realizado por Costa et al. (2006), foram encontrados valores de pH de 7,9 e 7,63, para a fase inicial e final da compostagem respectivamente, no composto final. Kumar et al. (2007) encontraram no composto final, em experimentos com cama de frango conduzidos em composteira, valores de pH na faixa de 8,20 a 9,34 e atribuíram esse fato à grande formação de sais de amônio.

2.4.3 Umidade

O teor de umidade é um dos principais fatores ambientais como meio de transporte de nutrientes dissolvidos para a atividade metabólica e fisiológica dos microrganismos no solo e,

é também, considerado um importante parâmetro para controle da eficiência no processo de compostagem (COSTA et al., 2006).

Como a compostagem tende a evaporar a água, devido ao calor produzido, o ideal é que o valor de umidade inicial seja de 50 % a 60 % (BARRINGTON et al., 2003). Este valor pode variar em torno de 55 a 65 %, sendo que elevados teores de umidade (>65 %) fazem com que a água ocupe os espaços vazios do meio, impedindo a livre passagem do oxigênio, o que poderá provocar aparecimento de zonas de anaerobiose permitindo ainda, a lixiviação dos nutrientes, a aglutinação e diminuição da estrutura de resistência estrutural da leira (SILVA et al., 2003; REIS, 2012).

Uma alternativa para reduzir o excesso de umidade no material que está sendo compostado é a prática de revolvimentos frequentes que ocasionará perda de água na forma de vapor, porém, deve-se ter cuidado para não ocorrer perda demasiada de umidade. Misturas com umidade abaixo de 40 % podem causar a desidratação no interior da pilha de compostagem, ocasionando lentidão do processo e resultar na redução da atividade biológica, uma vez que os microrganismos aeróbios necessitam de água e ar, e é de relevada importância que estes dois componentes estejam em seus valores ótimos. Demasiada umidade, no entanto, pode ter um efeito negativo sobre a sobrevivência da E. Coli, devido à falta de carbono orgânico utilizável, uma vez que esta bactéria possui uma incapacidade para descer a sua taxa metabólica e se adaptar as condições de baixa disponibilidade de nutrientes (JAMIESON et al., 2002; KIEHL, 2004; ELVING, 2009).

2.4.4 Matéria orgânica e nutrientes

A aplicação de nutrientes e matéria orgânica no solo através de resíduos orgânicos tratados é de grande importância para a reposição de micronutrientes essenciais para o crescimento das plantas e desenvolvimento de microrganismos, (ELVING, 2009), melhora a retenção de água, mantendo a umidade e beneficiando a sobrevivência da microflora do solo, criando condições para o crescimento de raízes, aumentando a tolerância da vegetação em períodos de seca, (ELVING, 2009).

Quanto maior o nível de nutrientes aplicados ao solo através dos dejetos, seja na forma líquida ou material compostado, maior é a atividade da comunidade microbiana indígena do solo, incluindo predadores de bactérias (GARCIA et al., 2010), além disso a concentração de

nutrientes tem relação direta com o crescimento e diversidade da população microbiológica pois fornece material para a síntese protoplasmática e a energia necessária para o crescimento celular, entre outras funções (KIEHL 1998; KIEHL 2004; PAILLAT et al., 2005).

Solos com altos teores de matéria orgânica promovem a sobrevivência e em alguns casos o crescimento de bactérias entéricas, fornece uma fonte de carbono e facilitam a formação e estabilização de agregados e formação de micro-habitat que irão proporcionar às bactérias proteção dos predadores (JAMIESON et al., 2002) e estes fatores tem forte influência na sobrevivência de *E.coli* no solo (COOLS, 2001).

De acordo com Kiehl (2004), os microrganismos absorvem o carbono e o nitrogênio sempre na relação 30:1. O e o equilíbrio desta relação é um fator de importância fundamental na compostagem, já que o principal objetivo deste processo é criar condições para fixar nutrientes que serão posteriormente reciclados, quando da utilização do composto orgânico no solo (KIEHL, 1998; SILVA et al., 2003; SEDIYAMA et al., 2008).

2.5 Coliformes e *Escherichia coli* como indicadores de contaminação fecal

Microrganismos indicadores são usados para avaliar a qualidade do produto final, indicar condições sanitárias adequadas (SANTANA et al., 2006) e são de grupos ou espécies que quando se encontram presentes, fornecem informações sobre a contaminação de origem fecal por serem encontrados no conteúdo intestinal do homem e animais homeotérmicos (FRANCO et al., 2008).

Os indicadores utilizados são bactérias pertencentes ao grupo dos *Enterococcus* e *Enterobacteriaceae*, onde os coliformes fecais e *E. coli* são os mais utilizados porque modelam o comportamento dos agentes patogênicos durante o tratamento de resíduos orgânicos (ELVING, 2009) e toleram altas temperaturas ambientais (MEAYS et al., 2004).

Conforme Cunha, et al. (2006) e Elving et al. (2009), devem ser considerados alguns critérios para que esses microrganismos possam servir como indicadores: (I) devem ter detecção rápida e fácil, (II) não devem estar presentes como contaminante natural, (III) deve ser facilmente distinguível de outros microrganismos componentes da microbiota indígena, (IV) deve estar associado à presença do patógeno, (V) seu volume deve correlacionar-se com a do patógeno e apresentar necessidades e velocidade de crescimento semelhante a dos patógenos, (VI) ter velocidade de morte semelhante e se possível, sobrevivência levemente

superior à do patógeno, (VII) ter como habitat exclusivo o trato gastrointestinal do homem e animais homeotérmicos, (VIII) apresentar alta resistência extra enteral e oferecer um risco mínimo ou indireto à saúde, (IX) apresentar técnicas rápidas, simples e precisas para sua detecção ou contagem.

A presença de coliformes em amostras ambientais indica a qualidade sanitária do solo e da água, no entanto, essa avaliação, apesar de ser capaz de atestar aspectos de sanidade, é inadequada como indicador de qualidade do solo num sentido mais amplo. (ZILLI et al., 2003).

2.5.1 Coliformes totais

O grupo dos coliformes é constituído por bactérias em forma de bacilo, gram-negativas, não formadoras de esporos, facultativas, que fermentam a lactose com produção de ácido e gás, dentro de 24 horas, à temperatura de 37 °C (APHA, 1998) e sua detecção indica a possibilidade da presença de microrganismos patogênicos.

O teste de coliformes totais identifica todas as bactérias coliformes que ocorrem naturalmente no ambiente, sendo que a maioria é considerada inofensiva, no entanto, algumas das bactérias são nocivas e indicam contaminação fecal.

O grupo dos coliformes é dividido em coliformes totais, subgrupo coliformes fecais ou termotolerantes e *E. coli*, sendo utilizados na avaliação de condições higiênico-sanitárias do ambiente (MEAYS et al., 2004).

De acordo com Kiehl (2004) a média das amostras coletadas deve conter menos de 10 NMP g⁻¹ de sólido, não mais que 20 % podem exceder a 1000 NMP g⁻¹ e nenhuma amostra deve exceder a 10⁴ NMP g⁻¹ de sólido.

2.5.2 Coliformes fecais

Coliformes fecais ou termotolerantes é um subgrupo dos coliformes totais, bacilos gram negativos, em forma de bastonetes, aeróbios ou anaeróbios facultativos oxidase-

negativos não formadores de esporos, apresentam a capacidade de continuar fermentando lactose com produção de gás, quando incubadas a temperaturas de 44-45°C (FRANCO, 2003).

Os coliformes fecais abrangem os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo *E. coli* o principal indicador de contaminação fecal, pois é um habitante comum do trato intestinal de homem e animais e ocorrem em número elevado em dejetos, podendo assim ser analisados sem enriquecimento do material e toleram temperaturas de até 44°C (ELVING, 2009).

Coliformes fecais são os indicadores de poluição fecal mais comumente utilizado em ambientes aquáticos (CEBALLOS et al., 1995; ELVING, 2009) e podem ser utilizados no monitoramento da redução do número de patógenos nos sistemas de tratamento de dejetos animais (LARSEN et al., 1994; ELVING, 2009).

A persistência dos coliformes no solo depende de fatores como o tipo e a densidade dos microrganismos nos dejetos, condições físico-químicas do solo, condições atmosféricas, interações biológicas e métodos de aplicação dos dejetos no solo (UNC et al., 2004).

Mubiru et al. (2000) relataram que em solo úmido a 25 °C coliformes fecais sobreviveram por oito semanas, e sob temperaturas variando entre 6,5 e 19,6 °C, puderam ser detectados por até noventa e nove dias. A umidade do solo é fator determinante para a sobrevivência bacteriana, assim precipitações constantes favorecem a sobrevivência destes organismos (GUAN et al., 2003).

2.5.3 *Escherichia coli* (*E. coli*)

A *E. coli* tem sido usada desde 1892 como indicador de contaminação fecal por ser mais conhecida e facilmente distinta de outros membros do grupo de coliformes fecais (JAY, 2005; SILVA et al., 2005) sendo encontrada no intestino humano e de animais de sangue quente chegando ao percentual de 95% das bactérias presentes (FRANCO et al., 2008). O período de sobrevivência de *E. coli* é semelhante ao dos patógenos mais comuns sendo menos resistentes à desinfecção que cistos de protozoários e vírus (MARQUEZI et al., 2010). Apesar de *E. coli* ter sido estudada mais intensamente que os outros microrganismos, o conhecimento sobre o seu metabolismo em seu habitat natural, o intestino de animais de sangue quente, só foi adquirido nos últimos anos (MUNÕZ-ELIAS et al., 2006).

Nas fezes de humanos e de animais a contagem desta bactéria pode chegar a 10^9 bactérias por grama de fezes tornando fácil o seu isolamento e identificação e podem ser feitos por técnicas simples e rápidas (MARQUEZI et al., 2010).

As espécies fecais não *E. coli*, como algumas dos gêneros *Klebsiella*, *Shigella*, são de ocorrência variável e não apresentam características fisiológicas ainda disponíveis que possam ser identificadas em sistemas "*in vitro*" de detecção.

Muitos pesquisadores têm avaliado a sobrevivência de *E. coli* em diferentes ambientes, incluindo água salgada, doce, sedimentos aquáticos, solos e locais de criação com acúmulo de resíduos fecais (ELVING et al., 2009; RECHE et al., 2010). Apesar da *E. coli* não ser considerada persistente, uma vez que a mesma é lançada do trato digestivo através das fezes dos animais, quando misturada ao solo essa bactéria pode permanecer viável por várias semanas (GUAN et al., 2003, MEAYS et al., 2004, UNC et al., 2004).

Mais de 160 sorotipos de *E. coli* já foram identificadas e os diferentes sorotipos são distinguidos pelo seu antígeno "H" (flagelar) e "O" (lipopolissacarídeo, LPS) respectivamente (MANGIA, et al., 2009).

A maioria das linhagens desta bactéria é comensal, porém, algumas são enterotoxigênicas por que produzem a toxina Shiga (Stx), assim chamada por ser praticamente idêntica à produzida por outra bactéria conhecida como *Shigella Disenteria* tipo 1 (GRIFFIN et al., 1991; LEITE et al., 2006; SILVA et al., 2010)

Essa toxina exige receptores específicos na superfície das células, a fim de se unir e entrar na célula. É importante ressaltar que a maioria dos tipos de bactérias *E. coli* não causam doença em seres humanos, na verdade, alguns sorotipos são benéficos, já outros causam infecções gastrointestinais, ou do trato urinário (PRÈRE et al., 2006). A *E. coli* é considerada pela legislação vigente, o mais específico indicador de contaminação fecal recente e de eventual existência de organismos patogênicos (CONAMA 2005; BRASIL, 2006). Portanto, quanto maior os níveis de bactérias fecais no ambiente, maiores são as chances de patógenos estarem presentes em números significativos também (CARNEIRO et al., 2006).

Devido à grande degradação dos recursos hídricos e a crescente utilização do uso agrônomico dos dejetos, utilizar indicadores como a presença de *E. coli* e não de bactérias causadoras de doenças, têm as vantagens de esta bactéria estar universalmente distribuída em elevado número e ser de fácil detecção (TURCO et al., 1999; CANTUSIO NETO, 2001; SILVA et al., 2010). Como consequência, diversos métodos rápidos para a enumeração desta espécie vêm sendo desenvolvidos.

2.6 Métodos utilizados para determinar coliformes

Existem diferentes métodos para quantificar os coliformes totais e fecais nas amostras coletadas, descritos em diversas publicações internacionais e nacionais, considerados como referências (FRANCO et al., 2008). O mais utilizado é o método tradicional de tubos múltiplos, que estima aproximadamente o número de microrganismos presentes na amostra original denominado “Numero Mais Provável” (NMP), porém este método é laborioso e demorado envolvendo uma etapa presuntiva e duas confirmativas levando pelo menos 96 horas para sua realização (LEITE et al., 2006) .

Esta metodologia foi desenvolvida há muitos anos atrás e é empregada como padrão oficial em diversos laboratórios no mundo inteiro, por ser amplamente preconizada pela Vigilância Sanitária e outros órgãos regulamentadores (FRANCO et al., 2008). Recentemente, métodos mais rápidos vêm sendo desenvolvidos como forma alternativa para os métodos convencionais (HUNT et al., 2005) e dependendo do método utilizado, a sensibilidade e especificidade são ainda maiores que a dos convencionais (FRANCO et al., 2008).

Estes métodos são baseados na tecnologia de substratos específicos marcados com indicadores cromogênicos e/ou fluorogênico onde a incorporação desses substratos em um meio seletivo elimina a necessidade de subcultivos e posteriores testes para identificação de certos microrganismos (MANAFI, 2001). No entanto, além de estimar mais rapidamente a qualidade bacteriológica da amostra devem dar resultados reais e ter sensibilidade igual aos métodos convencionais utilizados rotineiramente para a análise do mesmo microrganismo (HUNT et al., 2005)

2.6.1 Método da fermentação dos tubos múltiplos

Neste método o meio de cultura utilizado, é específico para cada microrganismo (SILVA et al., 2005; FRANCO et al., 2008) e é realizado em três etapas. A primeira etapa é a presuntiva, onde uma alíquota da amostra é inoculada em caldo lauril sulfato triptose (LST), que inibe a microbiota acompanhante e, ao mesmo tempo é um meio de enriquecimento seletivo para bactérias do grupo dos coliformes totais e termotolerantes (SILVA et al., 2005).

As bactérias deste grupo causam turvação no meio com formação de gás, detectado através de tubos de Durham invertidos, após 48 horas de incubação a 35 ± 2 °C.

A segunda etapa é a confirmativa para a confirmação de coliformes totais também é realizada a inoculação de alçadas do caldo lauril positivo em caldo Verde Bile Brillante (VBB), que apresenta em sua formulação sais biliares, que inibe o crescimento de microrganismos gram positivos, e a lactose, que é utilizada como substrato para a produção de gás pelos coliformes. A positividade neste teste é indicada pela turvação do meio e a produção de gás no tubo de Durham invertido após 48 horas de incubação a $35 + 2$ °C (HAJDENWURCEL, 1998), também é realizada a inoculação de alçadas do caldo lauril positivo em caldo EC Broth que é seletivo para microrganismos gram positivo devido à presença de sais biliares (FORSYTHE, 2002). Após incubação a $44,5$ °C no período de 24 a 48 horas, ocorre turvação do caldo EC com formação de gás, quando positivos para coliformes fecais (ROMPRÉ et al., 2002) uma vez que eles apresentam a capacidade de fermentar lactose com produção de gás à temperaturas mais elevadas (HAJDENWURCEL, 1998).

A terceira etapa é a confirmativa adicional, os tubos de caldo EC positivos são homogeneizados e uma alçada é semeada em placas de ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para a confirmação de *E. Coli* que formam colônias púrpuras com centro preto e brilho metálico verde, pois este meio de cultura é um meio diferencial utilizado para o isolamento e detecção de *Enterobacteriaceae* ou bacilos coliformes relacionados, com base na fermentação de lactose (KONEMAN et al., 2001)..

Por esta técnica são considerados coliformes aqueles microrganismos que forem capazes de fermentar lactose nos testes presuntivos e confirmativos, com produção de gás a $35 + 2$ °C e a 44 ± 1 °C (BRASIL, 2007).

2.6.2 Métodos rápidos de identificação

A rápida identificação de microrganismos tornou-se necessárias e novas técnicas foram desenvolvidas a partir da década de 70 para facilitar a rapidez de diagnóstico.

As pesquisas levaram ao desenvolvimento dos meios cromogênicos e fluorogênicos, onde as colônias de microrganismos alvo, dependendo da enzima que atua sobre o substrato presente, adquirem cores e/ou fluorescência características capazes de promover seu

reconhecimento (TSORAEVA et al., 2005) e diversos métodos para identificação de microrganismos foram desenvolvidos (MANAFI, 2000).

Segundo Bastholm et al. (2008) e Nikaeen et al. (2009), a bioluminescência baseada em atividade enzimática, que é específica para cada grupo microbiano, pode reduzir potencialmente o tempo de análise de bactérias indicadoras.

2.6.2.1 Substratos cromogênicos

O uso de técnicas com substratos cromogênicos permite determinar simultaneamente coliformes totais e coliformes fecais presentes nas amostras alvo, utilizando apenas um meio de cultura, representando grande vantagem pela rapidez do resultado e a possibilidade de correção de problemas existentes, principalmente em sistemas de abastecimento público (MERCK, 2009).

O substrato cromogênico utilizado nesses métodos é orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) e "Salmon-GAL". Nesse meio de cultura a β -D-galactosidase, enzima específica de bactérias coliformes hidrolisa o composto "Salmon-GAL", que faz parte da mistura cromogênica. O produto da hidrólise é um composto corado de vermelho que faz as colônias de bactérias coliformes aparecerem na cor vermelha (MERCK, 2009).

A β -D-glucuronidase, enzima específica de *E. coli* hidrolisa o composto "X-glucuronide", que faz parte da mistura cromogênica (SILVA et al., 2005), como *E. coli* faz parte do grupo de bactérias coliformes, possui também a β -D-galactosidase, que hidrolisa conjuntamente o composto "Salmon-GAL e o ONPG promovendo a alteração na cor da colônia para roxo devido à mistura dos cromogênios vermelho e azul, para isso acontecer é necessário um período de incubação de 18 a 28 horas a 35°C após inoculação da amostra (OLSTADT et al., 2007).

2.6.2.2 Substratos fluorogênicos

O caldo Fluorocult é um caldo de enriquecimento seletivo para a detecção simultânea de coliformes totais e *E. coli* em amostras líquidas e sólidas (MERCK, 2009). A alta

qualidade nutricional do fosfato incorporado ao caldo garante uma alta velocidade de crescimento dos coliformes presentes, enquanto o lauril sulfato inibe o crescimento em larga escala das bactérias Gram positivas. A adição do substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosídeo (X-GAL), o qual é clivado pelos coliformes, e o substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil-b-D-glicuronídeo (MUG), que é altamente solúvel em água, sensível e específico para *E. coli*, torna possível a detecção simultânea de coliformes totais e *E. coli*.

A presença de coliformes é indicada pela cor azul-verde do caldo, e *E. coli* pela fluorescência azul sob luz UV de comprimento de onda longo. A reação Indol posterior confirma a presença de *E. coli*. Esta reação fica aumentada devido à concentração de triptofano no caldo. A enzima síntese é amplificada pelo 1-isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), e a atividade da -b-D-galactosidase é aumentada (TRONCO, 2010). Este método proporciona um resultado em até 24 h de incubação (MERCK, 2007).

De acordo com Olstadt et al., 2007 nos últimos anos vários métodos para detecção simultânea de coliformes totais e *E. coli* tem sido desenvolvidos e aprovados pelos órgãos responsáveis para a análise de água. Na década de 90 foram aprovados pela United States Environmental Protection Agency (USEPA) os métodos Colilert, Colilert-18 e Colisure. Recentemente, outros sete métodos foram aprovados, o MI Ágar (USEPA Federal Register 1998), m-Coli Blue 24, E*Colite (USEPA Federal Register 1999), Chromocult (US EPA Federal Register 2002) Readycult Coliforms 100, Colitag (USEPA Federal Register 2004) e Coliscan (USEPA Laboratory Certification Manual 2005).

2.7 Alternativas tecnológicas para mitigar o potencial poluidor por microrganismos fecais

Várias técnicas têm sido propostas para reduzir os impactos ambientais provocados pela suinocultura. De um modo geral, o que sempre se procura é reduzir o volume de dejetos produzidos, bem como reduzir a sua carga poluente (VAN VLIET et al., 2007).

Na área de nutrição animal têm sido realizadas muitas pesquisas na obtenção de uma dieta cuja fórmula propicie um consumo ótimo de água (MARCATO, 2005) propiciando benefícios ambientais e econômicos (RODRIGUES et al., 2008), levando a uma menor geração de dejetos, diminuindo o risco ambiental destes para os recursos hídricos superficiais

e subterrâneos, solo e ar e redução do custo para construção de sistemas de aproveitamento e/ou tratamento (MIRANDA et al., 2009).

A ciência zootécnica já validou várias estratégias nutricionais ambientalmente benéficas, comprovando seus impactos positivos na redução da excreção de nitrogênio, fósforo e metais. Entre essas estratégias destacam-se o uso de aminoácidos sintéticos, fitases, minerais orgânicos, restrição alimentar e adição de agentes antimicrobianos (NONES et al., 2002; OETTING, 2002; OLIVEIRA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2008).

2.7.1 Aplicação de dejetos de suínos em superfície e injetados no solo

A inativação ou sobrevivência dos organismos patogênicos presentes no dejetos ao serem aplicados no solo dependem de vários fatores como a origem dos dejetos (GUAN et al., 2003; HUTCHISON et al., 2005), tipo de solo (JAMIESON et al., 2002), tipo de cobertura, radiação solar (FERGUSON et al. 2003), umidade (ZALESKI et al., 2005; MUBIRU et al., 2000), inclinação do terreno (FERGUSON et al., 2003), temperatura (JACOBSEN et al., 2012), população indígena (SEMENOV et al., 2010; WANG et al., 2011).

Apesar de alguns trabalhos indicarem que patógenos suínos não sobrevivem por muito tempo ao serem aplicados no solo (SANTOS, 2004; LIMA et al., 2005, RUFETE et al., 2006; SOUZA et al., 2011), outros indicam sobrevivência relativamente longa no solo e na água (GESSEL et al., 2004; WANG et al., 2011) uma vez que um solo alterado com dejetos não pode ser considerado livre de patógenos e organismos indicadores por pelo menos um ano após o uso do dejetos no solo (CÔTÉ et al., 2005; GUTLER et al., 2005; HUTCHISON et al., 2005; NICHOLSON et al., 2005; ROSTAGNO et al., 2005; BHADURI et al., 2006; ZIEMER et al., 2010;).

Quando a taxa de sobrevivência entre *Salmonella Typhimurium* e *E. coli* 0157:H7, em solos adubados com dejetos de suínos, foi comparada, notou-se que independente da forma como o dejetos foi aplicado ao solo (injetado ou em superfície), não houve diferença na taxa de sobrevivência para *E. coli* 0157:H7 mas *S. Typhimurium* apresentou maior tempo de sobrevivência somente quando o dejetos foi injetado no solo (SEMENOV et al., 2009).

De maneira geral, bactérias e vírus entéricos sobrevivem por mais tempo quando o dejetos é injetado no solo, devido à temperaturas mais baixas, maior proteção dos raios ultra

violetas, maior adsorção com as partículas de solo e maior umidade (FERGUSON et al., 2003).

2.7.2 Compostagem

Milhões de toneladas de fezes de animais são produzidos a cada ano, exigindo métodos mais eficientes de eliminação de resíduos, pois o esterco animal tem sido tradicionalmente aplicado ao solo como uma emenda agrícola (VIVAN et al., 2010; WANG et al., 2011). Um método para a redução dos agentes patogênicos é a reciclagem de resíduos por compostagem, que é uma técnica usada para obter a estabilização ou humificação da matéria orgânica (NUNES, 2009) através da transformação do resíduo orgânico numa matéria estável (composto), resistente à ação fermentativa de microrganismos, em qualquer material sólido com teor de umidade entre 40 e 60 %. O que irá beneficiar a atividade microbiana e elevar a temperatura a níveis desejados (ELVING, 2009).

Este processo pode ainda produzir produtos que não são seguros, se não manejado adequadamente, mas tem a vantagem de ser realizada tanto por tecnologias simples ou mais sofisticadas como as automatizadas, desde que os resíduos sejam adequados e o processo biológico ocorra em boas condições (MACDONALD et al., 2009).

Esta técnica é um método alternativo de manejo dos dejetos oriundos da suinocultura e visa modificar as características químicas, físicas e microbiológicas dos dejetos, dando origem a um produto final de alto valor agrônômico. A compostagem pode representar uma solução efetiva para regiões com problemas de alta concentração da produção de suínos, pois permite transferir os resíduos na forma de composto para outras regiões que demandam este tipo de adubo (PAILLAT et al., 2005; DAI PRÁ et al., 2008).

Entretanto, para que o resultado objetivado seja alcançado, alguns fatores são necessários, durante o processo de compostagem para a formação do fertilizante orgânico, sendo estes principalmente a aeração, umidade, temperatura, granulometria, pH e proporção carbono/nitrogênio (C/N) (PAIVA et al., 2010). Muitos agentes patogênicos são encontrados em resíduos orgânicos e tem potencial de sobrevivência neste material por longos períodos de tempo (WANG et al., 2004; ELVING, 2009;), e se o material a ser compostado não atingir temperaturas ideais entre 50 e 70°C por um período mínimo de quatro dias, pode não ocorrer

a sanitização desejada e estes patógenos serão introduzidos no solo ao ser utilizado esse composto como fertilizante (Mc CARTHY et al., 2011).

Existem três fases distintas no processo de compostagem, incluindo uma fase mesofílica (40-50°C) onde as populações de microrganismos mesófilos aumentam e predominam principalmente os fungos e bactérias. Uma fase termofílica (50-65°C), onde actinomicetos e bactérias termofílicas, incluindo *Bacillus*, *Thermonospora* e *Micropolyspora*, dominam enquanto bactérias mesófilas são inativadas (STROM, 1985; HERRMANN et al., 1997; CARPENTER-BOGGS et al., 1998), e uma fase de arrefecimento/maturação (≤ 30 °C) (HASSEN et al., 2002). No processo de compostagem a mistura dos DLS com o substrato propicia a elevação da temperatura ficando próxima dos 70 °C, o que irá reduzir o número de organismos patogênicos presentes, com o revolvimento aumenta o teor de oxigênio dentro da pilha e ocorre respiração aeróbia, contribuindo para que o processo de sanitização seja eficiente, (TEIXEIRA et al., 2002; SILVA et al., 2003; CEMPIRKOVÁ et al. 2007).

Embora a temperatura seja importante, a redução de agentes patogênicos durante o processo de compostagem pode ser afetada por vários outros fatores. Alguns destes fatores incluem competição com microrganismos nativos, umidade, esgotamento dos nutrientes, pH e tempo de armazenamento (KIM et al., 2009; ELVING, 2009).

Se os critérios de tempo e de temperatura não forem satisfeitos, agentes patogênicos podem ainda estar presentes nos compostos uma vez que a exposição a temperaturas subletais pode permitir a sobrevivência prolongada destes através da adaptação de calor (KIM et al., 2009).

Nos sistemas de compostagem industrial onde o processo é cuidadosamente monitorado, a eliminação de agentes patogênicos é mais facilmente obtida, entretanto em sistemas de compostagem sem interesse comercial onde há menos controle é mais difícil assegurar essa eliminação (GUAN et al., 2003).

A compostagem é uma tecnologia com potencial econômico, por apresentar baixo custo e possibilitar a substituição de fertilizantes minerais via reciclagem, e com valor ambiental, por reduzir a possibilidade de poluição de rios, lagos e mares, além de minimizar a quantidade de resíduos nos aterros sanitários, o que reduz a ocorrência de doenças infecciosas (INACIO et al., 2009). O produto final da compostagem que será utilizado como fertilizante deve ter uma contagem baixa ou nula de organismos patogênicos, pois se houver contaminação do solo ou recursos hídricos por estas bactérias poderão ocorrer surtos que representarão ameaça à saúde pública (LEAL et al., 2006; SOBRINHO et al., 2011)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta Dissertação foi dividida em dois estudos:

- Estudo I: Dejetos líquidos de suínos (DLS) aplicados na superfície e injetados no solo e análise da presença de coliformes totais e fecais na água escoada superficialmente.

- Estudo II: Dinâmica da população de coliformes totais e fecais durante o processo de compostagem dos DLS, com e sem adição de ácido fosfórico, em substratos de maravalha e serragem.

3.1 Caracterização da área de estudo

3.1.1 Estudo I

A área experimental utilizada (Figura 1) está localizada no Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil (29°43' 14" s, 53°42' 29" w), em um Argissolo Vermelho (EMBRAPA, 2006) com textura franco-arenosa.

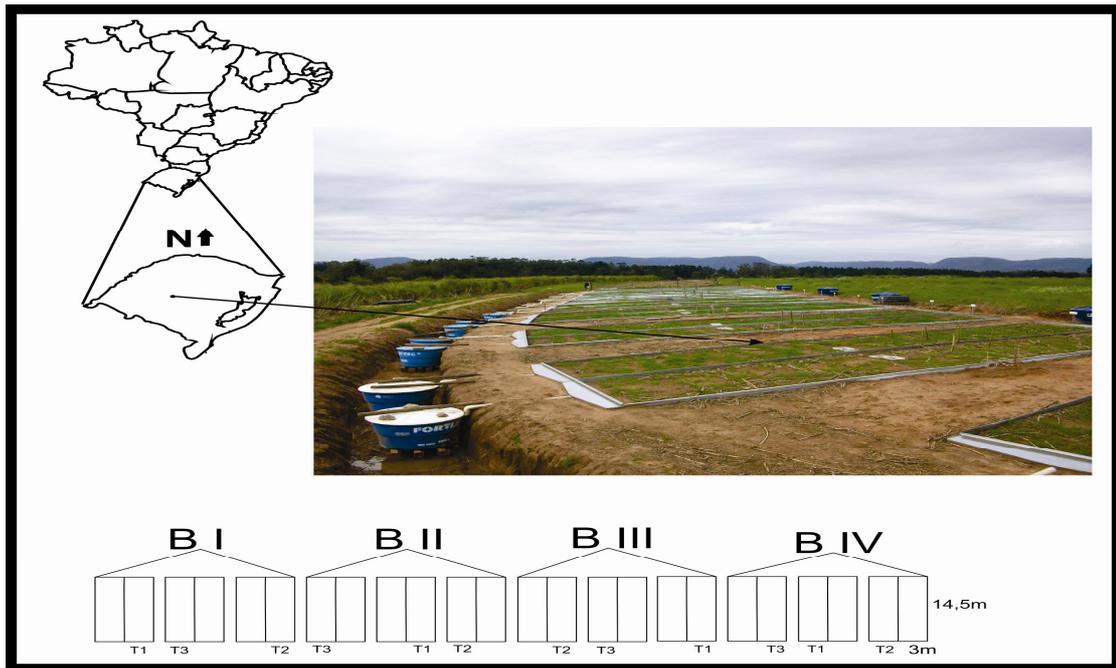


Figura 1 – Local da realização do experimento com quatro blocos (BI a BIV) e três tratamentos (T1= testemunha; T2= DSL injetado; T3= DSL superficial) no departamento de Solos, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. Fonte: Miola (2011).

O estudo I foi conduzido no período de agosto de 2011 a março 2012, sendo que, anteriormente, a área havia sido utilizada para o cultivo de milho sem o uso de dejetos de suínos. Cada bloco era constituído por três tratamentos (parcelas) dispostos ao acaso na área experimental, onde T1: Testemunha (controle) sem aplicação de dejetos, T2: DLS injetados no solo; T3: DLS em superfície. Cada parcela apresentava uma área de $43,5 \text{ m}^2$ ($14,5 \text{ m} \times 3 \text{ m}$), contornadas em todo o seu perímetro por chapas galvanizadas, tendo $0,25 \text{ m}$ de altura e inseridas $0,10 \text{ m}$ no solo. Além disso, todas as parcelas apresentavam uma declividade média de 5% e no final desta declividade foram colocadas calhas coletoras para coletar a água escoada das chuvas, que eram conduzidas até caixas d'água com capacidade de 1000 L (Figura 2).

Tanto a injeção dos dejetos no solo, como a aplicação em superfície foram realizadas manualmente devido à impossibilidade de tráfego de máquinas na área experimental, em função da delimitação das parcelas com as chapas galvanizadas. No início do experimento (agosto de 2011) os tratamentos T2 e T3 foram aplicados na cultura da aveia preta, na dose de $40,3 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$. Posteriormente, em novembro, os mesmos tratamentos foram aplicados nas mesmas parcelas, na cultura do milho na dose de $46 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$.



Figura 2 – Tratamentos (parcelas) com sistema para coleta de água escoada. Fonte: Miola (2011).

Antes de cada aplicação no solo, a concentração de coliformes totais e fecais nos dejetos líquidos de suínos (DLS) foi determinada pelo método do número mais provável (NMP), conforme APHA (2005). Após a aplicação dos tratamentos no solo, a coleta de água nas caixas d'água para a análise de coliformes era feita sempre após a ocorrência de chuvas, cujo volume era suficiente para provocar escoamento superficial.

3.1.2 Estudo II

Foi realizado de dezembro de 2011 a maio de 2012, em escala piloto, para avaliar a eficiência da compostagem de DLS, em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

A casa de vegetação possuía um pé-direito de 3 m, cobertura com telhas translúcidas, muretas laterais de 1,5 m de altura e no espaço compreendido entre as muretas e a cobertura há aberturas que permitem a circulação de ar no interior da mesma. No interior da casa de vegetação foram montadas duas estruturas construídas com taboas de pinus (leiras) com dimensões de 4,0 x 1,0 x 1,0 m, com pintura a base de cal e em sua parte interna foi utilizado

um revestimento com polietileno a fim de evitar a deterioração da madeira durante o processo de compostagem (Figura 3a).

As leiras foram preenchidas com uma mistura de maravalha de eucalipto e serragem de madeiras diversas e duas vezes por semana eram revolvidas. Para o revolvimento das leiras foi construída uma máquina revolvedora com sucatas de ferro, composta de dois helicoides acionados por um motor elétrico trifásico com potência de dois CV. A máquina possuía quatro rodas que proporcionavam o seu deslocamento, de forma manual, sobre as leiras de compostagem (Figura 3b).



(a)



(b)

Figura 3 – Leiras revestidas com polietileno e com substrato (a) e máquina revolvedora (b).
Fonte: DONEDA (2012).

3.2 Análises microbiológicas

3.2.1 Estudo I

Após cada precipitação em que havia escoamento superficial de água uma alíquota de 80 mL da água da escoada foi coletada das caixas d'água, depositada em frascos estéreis, em caixa de isopor com gelo e levadas ao laboratório para análise. Após homogeneização foi retirado um mL da amostra e diluídas em 9 mL de água peptonada tamponada 0,1% estéril, para proceder as diluições de 10^{-1} até 10^{-5} . Após uma alíquota 0,5 mL de cada diluição foi transferida para tubos com 4,5 mL de caldo Fluorocult com série de cinco tubos e duas repetições e incubadas a $36,5^{\circ}\text{C}$ em incubadora por 24h para a primeira leitura e 48h para a

segunda leitura (anexo A). Procedeu-se a leitura do teste com auxílio de lâmpada de luz ultravioleta, de comprimento de onda de 366 nm (fonte de luz UV para microbiologia-MERCK 13203), de acordo com a seguinte interpretação: o aparecimento da cor verde azulada indicava a presença de coliformes totais e a fluorescência azul em UV a de coliformes fecais e *E.coli*. Testes negativos para coliformes ocorriam quando o meio se mantinha com a coloração amarelo claro. Para confirmar a presença de *E.coli* nos tubos fluorescentes, eram adicionadas cinco gotas de reativo de Kovacs (MERCK 9293), sendo que a confirmação ocorria quando a cor do reativo mudava de amarelo para rosa.

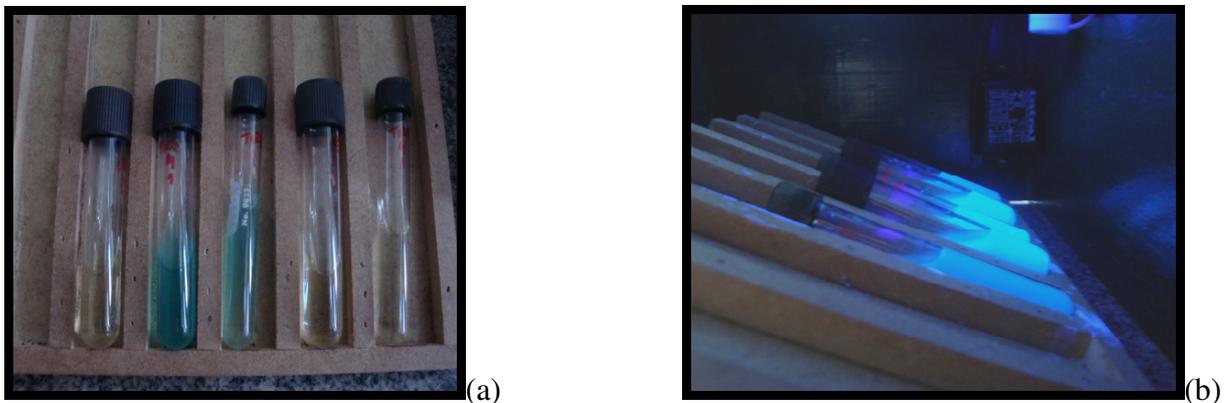


Figura 4 – Tubos com caldo Fluorocult onde os amarelo-claros são negativos para a presença de coliformes totais e fecais e os tubos verde-azulados são positivos para a presença dos coliformes totais (a) e tubos que ao receberem luz ultravioleta apresentam fluorescência são positivos para coliformes fecais e *E. coli* (b). Fonte: Arquivo pessoal.

O NMP foi calculado de acordo com a tabela da APHA (2005), série de cinco tubos (Figura 4a e 4b). A técnica do NMP é um método de quantificação indireta de microrganismos onde não são contadas unidades formadoras de colônias (UFCs), uma vez que a análise é realizada em meio de cultura líquido. O resultado obtido é comparado a tabelas que fornecem um resultado aproximado da quantidade de bactérias na amostra analisada. Estas tabelas são elaboradas a partir de dados estatísticos, com os respectivos limites de confiança inferior e superior de 95% para diversas combinações de número de tubos positivos em cada série de diluição. Muito embora o método dos tubos múltiplos apresente sensibilidade elevada, permitindo a detecção de baixas densidades de bactérias, a precisão deste teste depende do número de tubos utilizados e dos volumes de amostra inoculados.

Este método é amplamente utilizado para quantificar coliformes e é aceito pelos órgãos de fiscalização sanitária.

3.2.2 Estudo II

Antes de cada aplicação de dejetos líquidos de suínos (DLS) nas leiras de compostagem, uma amostra do DLS era coletada em frasco estéril, armazenada em caixa de isopor com gelo e levada ao laboratório de microbiologia dos solos para análise de coliformes totais e fecais pelo método do Número Mais Provável (NMP) com caldo fluorocult.

Também eram coletadas duas amostras do composto, em duas profundidades das leiras, antes da aplicação dos DLS. A primeira amostra era coletada a 20 cm e a segunda a 50 cm de profundidade, sendo ambas as amostras misturadas e homogeneizadas. Essa amostragem era feita no início (L_{1i} ; L_{2i}), no meio (L_{1m} , L_{2m}) e no fim (L_{1f} ; L_{2f}) de cada leira, totalizando três amostras/leira (seis amostras no total em cada profundidade). As seis amostras foram rotuladas e levadas para o laboratório de microbiologia do solo do departamento de solos da UFSM, onde de cada amostra foram pesados 10g que eram colocados em snap-cap e adicionado 90 mL de água peptonada tamponada 0,1% estéril (pH 6,5).

Para cada amostra foram feitas duas repetições, totalizando 12 amostras, que após o procedimento descrito acima foram colocadas em agitador mecânico durante 15 minutos para promover o desprendimento das bactérias das partículas do composto, (figura 5a e 5b) constituindo a diluição 10^{-1} . Para cada snap-cap com diluição de 10^{-1} foi retirado 1 mL e transferido para um tubo de ensaio (totalizando 12 tubos de ensaio) e em cada tubo foi acrescido 9 mL de água peptonada tamponada 0,1% estéril, estabelecendo uma diluição 10^{-2} . Este último procedimento foi repetido para estabelecer uma sequência de diluições até 10^{-5} .



(a)



(b)

Figura 5 – Coleta de amostra do composto nas leiras (a) e agitação do composto diluído em água peptonada (b). Fonte: Arquivo pessoal.

Após a realização das diluições seriais, uma alíquota de 0,5 mL da suspensão diluída a partir da 10^{-1} até 10^{-5} foi transferida para tubos de ensaio contendo 4,5 mL de meio de cultura de caldo Fluorocult estéril. Para todas as diluições foram feitas séries de cinco tubos, os quais foram incubados por 24h (primeira leitura) e 48h (segunda leitura) em incubadora a $36,5 \pm 1$ °C. Foram considerados coliformes totais positivos quando o meio de cultura mudou da cor amarela para verde azulada e coliformes fecais positivas quando o meio de cultura, ao receber a incidência de luz Ultra Violeta, apresentava fluorescência. Tubos negativos mantinham o meio com coloração amarelo clara, conforme ilustrado na figura 3 a e 3 b. Para confirmação de *E. coli*, foi adicionado 5 gotas de reativo de Kovac's. A confirmação ocorria quando o reativo mudava da cor amarela para rosa O Número Mais Provável (NMP) foi calculado de acordo com a tabela da APHA (2005), série de cinco tubos.

3.2.2.1 Caracterização do substrato, DLS utilizado e metodologia de aplicação do DLS na compostagem.

O material orgânico utilizado como substrato foi uma mistura em peso de maravalha de eucalipto e serragem de madeiras diversas, obtidas em uma madeireira da região de Santa Maria, RS. Em cada leira/tratamento foram adicionados 466 kg da mistura de maravalha (233 kg) e serragem (233 kg). A esta mistura foi incorporado DLS obtido no setor de Suinocultura da Universidade Federal de Santa Maria, de animais em regime de terminação e em sistema

de confinamento total, distribuídos conforme a tabela 1, até um total de 3.936 litros durante todo o experimento.

Tabela 1 – Características dos Dejetos Líquidos de Suínos (DLS) utilizados na compostagem, data, quantidade em litros, matéria seca, nitrogênio total (N total), nitrogênio amoniacal (N amoniacal) e coliformes totais e fecais (NMP mL⁻¹).

Data	Quantidade			N amoniacal Kg m ⁻³	N total Kg m ⁻³	Coliformes totais		Coliformes fecais	
	L leira ¹	L dejeito kg ⁻¹ substrato	¹ MS no dejeito - %-			DLS Log ₁₀ NMP mL ⁻¹	DLS + AF Log ₁₀ NMP mL ⁻¹	DLS Log ₁₀ NMP mL ⁻¹	DLS + AF Log ₁₀ NMP mL ⁻¹
06/12/11	685	1,47	1,08	1,43	1,88	6,52	6,52	6,52	6,52
13/12/11	685	1,47	1,92	1,27	1,8	6,10	6,15	6,10	6,00
20/12/11	466	1,00	1,24	1,39	1,57	5,98	5,61	5,98	4,94
28/12/11	300	0,65	1,37	0,91	1,42	4,69	4,81	4,69	4,69
03/01/12	300	0,65	3,07	1,15	2,28	5,85	5,68	5,85	5,65
10/01/12	250	0,54	4,45	1,38	2,47	5,61	5,52	5,18	4,82
17/01/12	250	0,54	2,63	1,03	1,96	5,52	6,15	5,45	5,9
24/01/12	200	0,43	3,15	1,07	2,18	5,69	5,71	5,69	5,71
31/01/12	200	0,43	3,32	1,18	2,35	-	-	-	-
08/02/12	150	0,32	1,60	0,79	1,38	-	-	-	-
15/02/12	150	0,32	3,01	1,08	2,01	5,90	5,56	5,85	5,56
22/02/12	100	0,21	1,21	0,76	1,24	6,04	6,45	5,45	5,61
06/03/12	100	0,21	0,86	0,97	2,38	5,61	6,17	5,61	6,04
21/03/12	100	0,21	2,14	1,05	1,87	6,95	6,04	6,36	5,95
Total	3.936	8,45	-	1,43	2,47	70,46	70,37	68,73	67,39

¹-Valores de matéria seca, N amoniacal e N total se referem à média dos dois tratamentos. NMP- Número Mais Provável, L- litros, AF- ácido fosfórico

Após a segunda aplicação dos DLS ocorreu o aparecimento de chorume na parte inferior das leiras e por isso optou-se por diminuir a quantidade de DLS a serem adicionada (tabela 1).

A coleta do DSL foi realizada nas calhas adjacentes às baias onde ficavam os animais, uma vez por semana, na véspera da aplicação dos dejetos nas leiras de compostagem. Os dejetos ficavam armazenados nas calhas por um período de no máximo uma semana, e após a coleta um dia antes da aplicação eram armazenados em caixas de água nas imediações das leiras de compostagem e possuíam a mesma característica para os dois tratamentos.

A primeira leira/tratamento (composto sem adição de ácido) era composta por maravalha, serragem e DLS e a segunda leira/tratamento (composto com adição de ácido) era composta por maravalha, serragem, DLS e ácido fosfórico com três repetições de cada tratamento. O ácido utilizado possuía concentração de 85% (P_2O_5) e densidade $1,6g\text{ cm}^{-3}$. No dia da aplicação do DLS, e 48 horas após, foi realizado o revolvimento mecânico das leiras durante todo o período de compostagem. Aos 106 dias do início do experimento o composto apresentou sinais de saturação, o que fez com que fosse encerrada a adição de DLS.

A aplicação dos dejetos sobre as leiras (Figura 6a) foi feita uma vez por semana, nas terças-feiras pela parte da manhã da seguinte maneira: aplicava-se metade da quantidade de dejetos estipulada (Tabela 1), sobre as leiras de compostagem, com o auxílio de uma mangueira acoplada a um cano de PVC com quatro saídas e, logo após, acoplava-se a máquina revolvente sobre a leira e percorria-se revolvendo até o final da mesma. Posteriormente, era aplicado o restante dos dejetos e passava-se novamente a máquina em sentido contrário (Figura 6b).

O tratamento composto com adição de ácido recebia adição de ácido fosfórico que era misturado ao DLS, antes da aplicação, nas caixas de água onde estes estavam armazenados. A quantidade de ácido utilizada foi definida a partir de testes preliminares a fim de obter um pH final do dejetos próximo a 6,0. Desta forma foram utilizados $3,5\text{ mL}$ de ácido L^{-1} de dejetos. Dois dias após a aplicação, nas quintas-feiras pela parte da manhã, era realizado o revolvimento das leiras (composto sem adição de ácido e composto com adição de ácido) para a oxigenação da massa de compostagem e para facilitar a perda de umidade.

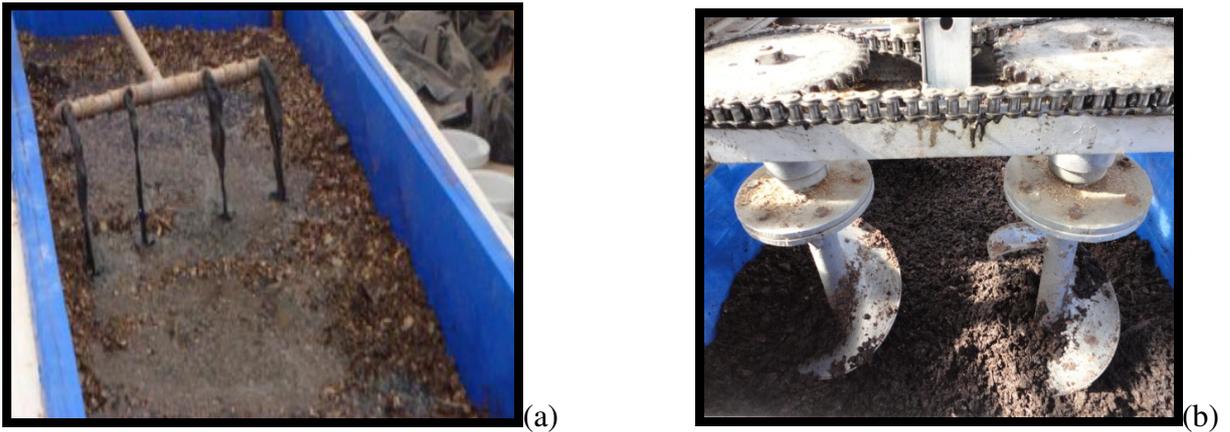


Figura 6 – Aplicação dos dejetos nas leiras (a) e máquina revolvedora acoplada nas leiras e fazendo o seu revolvimento (b). Fonte: Arquivo pessoal.

3.3 Análises realizadas no estudo II

3.3.1 pH

Para a avaliação do pH do composto, uma amostra de 10g do material úmido foi adicionada a 120 mL de água destilada em um snap-cap e a mistura foi agitada durante 30 minutos em agitador horizontal (Figura 5b). Logo após, o pH foi lido no sobrenadante com pHmetro calibrado.

3.3.2 Temperatura

Para medir a temperatura do composto foi utilizada uma sonda termopar do tipo K, acoplada a um termômetro digital. Foram tomados dois pontos de leitura, sendo um a aproximadamente 20 cm de profundidade da superfície da leira e outro a aproximadamente 20 cm do fundo para a superfície da leira, em três repetições para cada tratamento. Nas primeiras semanas de condução do experimento foi realizada a avaliação duas vezes ao dia, sendo uma pela manhã e outra à tarde. Porém, como a variação de temperatura entre os dois períodos do dia não foram expressivas, passou-se a adotar uma leitura diária de temperatura em três repetições para cada tratamento.

3.3.3 Umidade

Para o cálculo da umidade uma alíquota do composto foi pesada, colocada em latas de metal e levada á estufa 65 °C por 24 horas.

3.3.4 Matéria seca

Para a determinação da matéria seca dos dejetos, utiliza-se uma alíquota do mesmo, em béquer e logo após, as amostras foram acondicionadas em estufa a 65 °C até massa constante.

3.3.5 Nitrogênio amoniacal

Para a quantificação de N amoniacal nos dejetos, foi pesado aproximadamente 2 g do mesmo em tubos de destilação e logo após aferiu-se até 20 ml com água destilada. Em sequência, o extrato resultante foi destilado em destilador de arraste de vapor semimicro-Kjeldhal (TEDESCO, et al., 1995).

3.3.6 Nitrogênio total

Para a determinação de N total, 1 g de amostra de dejetos foi pesada e submetida a oxidação úmida, na presença de ácido sulfúrico concentrado e mistura de digestão. Em sequencia o N total do extrato resultante foi destilado da mesma forma como descrito para o N amoniacal.

3.4 Análises estatísticas

Foram utilizados os aplicativos Statistica, SAS (SAS Institute 2003) e Excel para análise dos dados. Os dados obtidos foram logaritmizados e submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelos testes F e Tukey ($P < 0,05$), quando necessário, para determinar a diferença entre os tratamentos em ambos os estudos (I e II).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo I - Presença de coliformes na água escoada superficialmente após aplicação de dejetos líquidos de suínos em superfície e injetado no solo

Coliformes totais ocorrem naturalmente no ambiente, em baixas concentrações, englobando uma ampla gama de bactérias (FORSYTHE, 2002). Isso foi observado desde o início do presente experimento quando foram aplicados dejetos no solo para o cultivo de aveia preta, onde a concentração de coliformes totais foi próxima entre os tratamentos que receberam dejetos e o tratamento testemunha, sem dejetos (Figura 7). Considerando as amostragens realizadas após a reaplicação dos dejetos para o cultivo do milho, 96 dias após a primeira aplicação (11/08/2011), também não se percebeu aumento no número de coliformes totais, em relação ao tratamento testemunha, o que está de acordo com os resultados de Gessel et al. (2004). Tais resultados indicam que somente a avaliação de coliformes fecais poderia auxiliar na interpretação do efeito dos tratamentos sobre a dinâmica populacional de coliformes, visto que esses microrganismos são específicos de animais de sangue quente e ocorrem em números elevados nas fezes, sendo *Escherichia coli*, (*E. coli*) a principal representante do grupo por ser de origem exclusivamente fecal e algumas estirpes, consideradas patogênicas.

O número mais provável (NMP) de coliformes totais na água escoada, não diferiu entre o tratamento com injeção dos dejetos ($3,6 \pm 0,37 \log_{10}$ NMP mL⁻¹) e o tratamento testemunha ($3,5 \pm 0,47 \log_{10}$ NMP mL⁻¹) durante o período do experimento. No entanto, o NMP de coliformes totais encontrados no tratamento com aplicação de dejetos em superfície ($3,8 \pm 0,37 \log_{10}$ NMP mL⁻¹ p<0,05) foi superior ao encontrado no tratamento com injeção e na testemunha. Isso indica que os coliformes totais estarão presentes no ambiente, independentemente da forma utilizada para aplicação dos dejetos, pois possivelmente deve haver coliformes no solo devido à contaminação cruzada e não somente pela adição do dejetos (GESSEL et al., 2004). Com isso pode-se inferir que, quanto a coliformes totais, fazer ou não a aplicação de DLS, seja aplicação injetada ou em superfície, não alterará o seu número no ambiente. Todavia, este trabalho é preliminar e compreende um único estudo, necessitando que trabalhos futuros sejam realizados para confirmar tais resultados.

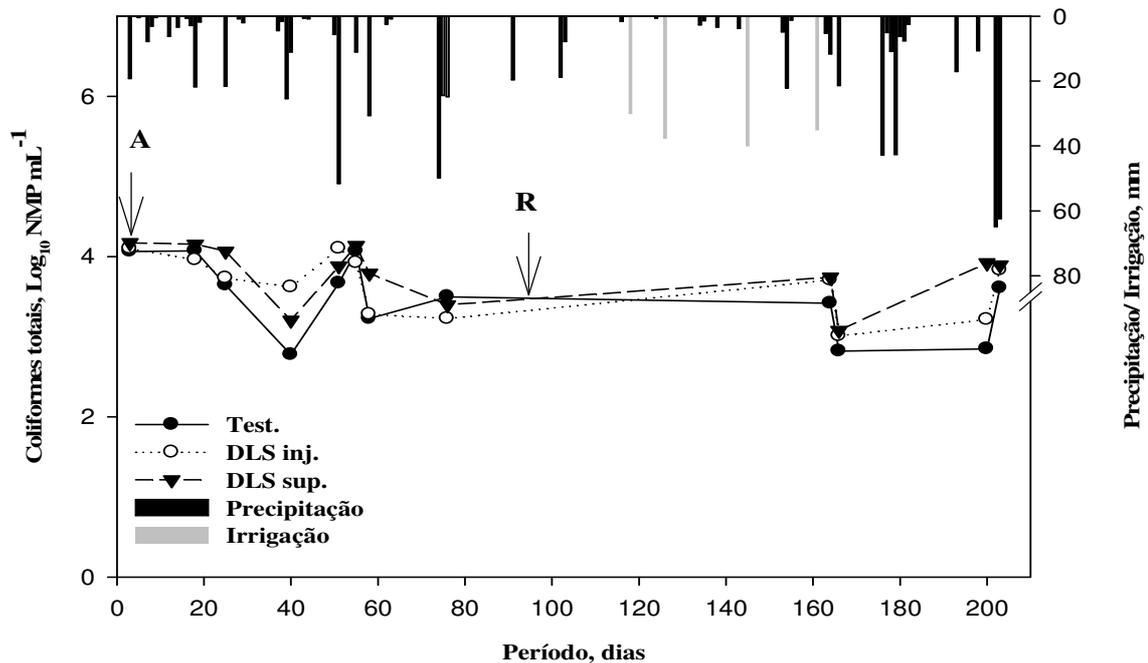


Figura 7 – Concentração de coliformes totais na água escoada superficialmente nos tratamentos com aplicação de dejetos líquidos de suínos (DLS) na superfície (DLS sup.) e com injeção (DLS inj.) no solo, precipitação pluviométrica e irrigação no período experimental. (A) Aplicação de dejetos de suínos para cultivo de aveia preta; (R) Reaplicação dos dejetos para o cultivo do milho.

Embora o NMP de coliformes totais na água escoada na superfície do solo não tenha sido alterado pela aplicação de dejetos líquidos de suínos, deve-se ter cuidado com o volume de DLS aplicado, especialmente se houver possibilidade de precipitação posterior, pois a adição de dejetos no solo provoca alteração no número de coliformes fecais. Esse fato pode ser observado nas avaliações iniciais do tratamento testemunha (Figura 8), onde, em um primeiro momento, não foram detectados coliformes fecais enquanto no tratamento com dejetos aplicados em superfície a população foi de $2,5 \text{ Log}_{10} \text{ NMP mL}^{-1}$ e com aplicação de dejetos injetados no solo de $1,4 \text{ Log}_{10} \text{ NMP mL}^{-1}$.

Na primeira avaliação, realizada quatro dias após a aplicação dos dejetos o número de coliformes fecais detectados na água escoada dos tratamentos com aplicação superficial e com injeção dos dejetos foi menor que o NMP de coliformes aplicados com os dejetos no início do experimento ($3,38 \text{ log}_{10} \text{ NMP mL}^{-1}$) em 86,1 % e 98,8 %, respectivamente. Provavelmente esse fato ocorreu em função da infiltração dos microrganismos no solo, juntamente com a fração líquida dos dejetos aplicados na superfície, e pelo maior contato dos microrganismos

com o solo quando os dejetos foram injetados. Com base nestes resultados iniciais, pode-se inferir que a injeção dos dejetos de suínos no solo constitui uma estratégia que possibilita reduzir o potencial de contaminação dos mananciais de superfície com coliformes fecais. Comparando à injeção dos dejetos com a sua aplicação em superfície, conforme é feito em plantio direto, houve redução de 44% no número de coliformes fecais presentes na água escoada sobre o solo.

No entanto, ao final do experimento não foram encontradas diferenças entre o NMP de coliformes fecais na água escoada do tratamento com aplicação do DLS injetado ($1,6 \pm 0,66 \log_{10}$ NMP mL⁻¹) e DLS em superfície ($1,6 \pm 0,59 \log_{10}$ NMP mL⁻¹), indicando que a presença de coliformes fecais ao longo do tempo independe da forma de aplicação dos DLS no solo. De acordo com este estudo, a aplicação de DLS além de alterar a população de coliformes fecais no solo ainda permite a sobrevivência destes por longos períodos e a migração para áreas onde não ocorreu aplicação. Isto pode acontecer pela ação do vento, onde os coliformes se aderem às partículas do solo, pela ação da chuva, pelo trânsito de animais e pessoas entre tratamentos ou, de acordo com a literatura, a sobrevivência das bactérias patogênicas pode ser afetada por fatores climáticos, propriedades físico-químicas do solo ou pelo tipo de planta cultivada (WOLNA-MARUWKA et al., 2003; SAHLSTROM, 2003; NICHOLSON et al., 2005).

O NMP de coliformes fecais encontrados no tratamento testemunha ($0,8 \pm 0,56 \log_{10}$ NMP mL⁻¹; $p < 0,05$). Foi significativamente menor do que o encontrado com injeção de DLS ($1,6 \pm 0,66 \log_{10}$ NMP mL⁻¹) e com aplicação de DLS em superfície ($1,6 \pm 0,59 \log_{10}$ NMP mL⁻¹). Considerando todo o período do experimento, inclusive a reaplicação de DLS no solo antes da semeadura do milho, percebe-se que no tratamento testemunha o NMP de coliformes fecais encontrados é sempre inferior ao encontrado nos tratamentos que receberam dejetos. A presença de coliformes fecais no solo testemunha pode ser atribuída à contaminação entre tratamentos, através do trânsito de pessoas entre as parcelas, e também pela presença de roedores, principalmente de ratos na área.

O NMP inicial de coliformes fecais que era de 2,51 (\log_{10} NMP mL⁻¹) nos dejetos aplicados em superfície diminuiu para 1,46 (\log_{10} NMP mL⁻¹) aos 18 dias após a aplicação no solo, enquanto o NMP de coliformes fecais dos dejetos injetados não sofreu nenhuma alteração, mantendo-se em 1,4 (\log_{10} NMP mL⁻¹) neste mesmo período. Enquanto no tratamento com injeção de DLS os coliformes estão, inicialmente, protegidos pelo solo do escoamento superficial. Por outro lado, tais microrganismos se movimentam no solo obedecendo ao fluxo de água nos macroporos, podendo infiltrar e só retornarem à superfície

quando ocorre a saturação total do solo após precipitações sucessivas (RODRIGUES et al., 2011). Esse retorno dos coliformes fecais à superfície do solo parece ter ocorrido cerca de 40 dias após a aplicação dos dejetos suínos e após a ocorrência de precipitação acumulada superior a 130 mm. Com isso, foi percebida a presença de coliformes fecais junto com a água escoada, inclusive com concentração superior ao tratamento onde os dejetos foram aplicados na superfície do solo.

Com a reaplicação dos DLS, contendo $3,1 \log_{10}$ NMP mL⁻¹ de coliformes fecais, na cultura do milho (15/11/2011), 96 dias após a primeira aplicação de DLS, ocorreu estiagem de aproximadamente 60 dias, o que tornou necessária a realização de quatro irrigações por aspersão, com volume aproximado de 35 mm cada. Apesar de ser um volume superior ao das precipitações, não ocorreu escoamento nas parcelas devido ao solo estar com baixo teor de umidade. Entre os dias 21 e 22/01/2012 ocorreram precipitações de 5 e 11 mm, o que gerou escoado e o NMP de coliformes fecais analisado foi de $0,8 \log_{10}$ NMP mL⁻¹ no tratamento testemunha, $1,7 \log_{10}$ NMP mL⁻¹ no tratamento DLS injetado e $1,8 \log_{10}$ NMP mL⁻¹ no tratamento DLS em superfície. No dia 24/01/2012 ocorreu nova precipitação 21,4mm e o NMP de coliformes fecais foi de 0,5, 0,9 e $1,3 \log_{10}$ NMP mL⁻¹ para estes mesmos tratamentos, respectivamente.

Aos 44 dias após essa análise ocorreram precipitações cumulativas do dia 20/02 até 27/02 de 28,2 mm e o NMP de coliformes fecais aumentou em 74%, 61% e 46% no tratamento testemunha, DLS injetado e DLS em superfície, respectivamente. Dois dias após essa coleta ocorreu nova precipitação de 127,2 mm e o NMP de coliformes analisado diminuiu em 46%, 53% e 41% no tratamento testemunha, DLS injetado e DLS em superfície, respectivamente, em relação ao NMP do dia 27/02/2012, destes mesmos tratamentos.

Um fato que pode explicar esses resultados pode ser que durante o mês de fevereiro as precipitações, apesar do baixo volume, ocorreram frequentemente fazendo com que o solo se mantivesse úmido durante todo o período. Alguns autores consideram a umidade como o principal fator que afeta a sobrevivência de bactérias entéricas no solo (MUBIRU et al., 2000; FERGUSON et al., 2003; GERBA et al., 2005, NICHOLSON et al., 2005). Estes resultados indicam que a liberação de bactérias a partir do DLS é gradual, e que a contaminação bacteriana proveniente da aplicação de dejetos líquidos de suínos no solo pode se estender por um longo período de tempo.

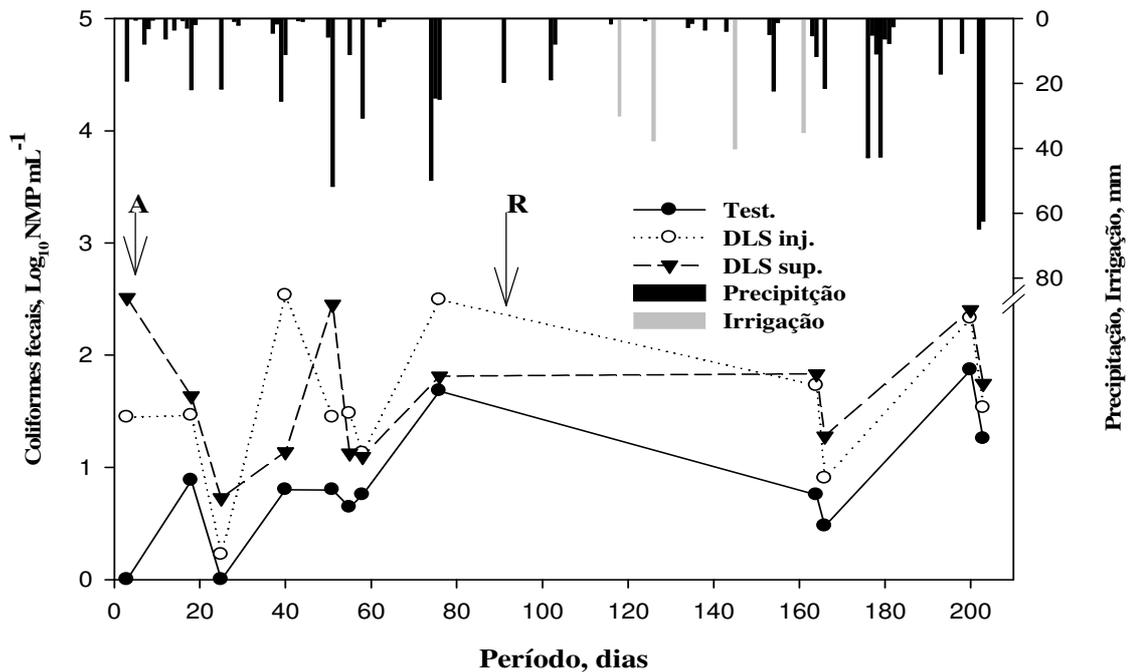


Figura 8 – Concentração de coliformes fecais na água escoada superficialmente nos tratamentos com aplicação de dejetos líquidos de suínos (DLS) na superfície (DLS sup.) e com injeção (DLS inj.) no solo, precipitação pluviométrica e irrigação no período experimental. (A) Aplicação de dejetos de suínos para cultivo de aveia preta; (R) Reaplicação dos dejetos para o cultivo do milho.

Estudos sobre transporte e destino de coliformes fecais no solo são recentes e tem aumentado significativamente desde 1996. Diversas pesquisas têm sido publicadas recentemente (JAMIESON et al., 2002; FERGUSON et al, 2003; UNC et al., 2004, GUBER et al., 2007; SEMENOV et al., 2010; JACOBSEN et al., 2012), melhorando a compreensão sobre os mecanismos de sobrevivência, transporte e destino destes microorganismos no ambiente. Uma vez adicionados ao solo os coliformes fecais podem dispor de apenas uma pequena parte do espaço dos poros disponível nos ambientes subsuperficiais (RODRIGUES et al., 2011). Podem infiltrar no solo como células livres e atingir o lençol freático, ligarem-se à partículas em suspensão dos dejetos ou aderirem às partículas do solo e, eventualmente, podem separar-se das partículas e serem carregados junto com a água de escoamento (UNC et al., 2004; GOSS et al., 2008).

O nível de detalhe sobre os processos acima mencionados depende do local e região em que um estudo ou previsões são feitas e os fatores que controlam o comportamento de migração dos coliformes no solo e a sua transferência aos mananciais através da água de

escoamento superficial. Entretanto, é preciso considerar que os mecanismos de transporte e sobrevivência das bactérias são, na sua maioria, oriundas de pesquisas realizadas com solos de clima temperado e não subtropical como é o caso dos solos do Rio Grande do Sul, o que torna difícil afirmar que estes valores podem ser utilizados como parâmetro, e evidencia a necessidade de intensificar os estudos nesta área.

4.2 Estudo II - Dinâmica da população de coliformes totais e fecais durante o tratamento de dejetos líquidos de suínos (DLS) por compostagem automatizada

O substrato inicial (maravalha + serragem) submetido ao processo de compostagem, juntamente com os dejetos de suínos, apresentou uma população inicial de coliformes totais de 5,2 (\log_{10} NMP g^{-1}). Como o substrato não foi esterilizado, a presença de coliformes totais, mesmo antes de adicionar os dejetos, deve ser de origem ambiental, em função do contato da maravalha e da serragem com chuva, poeira, animais, etc. Com a adição dos dejetos, cuja população inicial de coliformes totais foi de 6,5 (\log_{10} NMP g^{-1}), a população encontrada na mistura dos dejetos com o substrato aumentou para 7,1 (\log_{10} NMP g^{-1}) na primeira amostragem realizada (Figura 9).

A população de coliformes totais diminuiu na fase inicial da compostagem, atingindo entre 2 e 5 (\log_{10} NMP g^{-1}) aos 20 dias e permanecendo entre 2 e 3 (\log_{10} NMP g^{-1}) na maior parte das amostragens realizadas a partir desta data até o final do experimento. Nas duas últimas amostragens realizadas nota-se uma tendência na redução de coliformes totais, sendo que no encerramento do experimento, aos 156 dias, o tratamento em que os dejetos receberam ácido fosfórico apresentou uma população de 1,9 (\log_{10} NMP g^{-1} ; $p < 0,05$), que foi significativamente menor do que o composto sem adição de ácido (3,4 \log_{10} NMP g^{-1}).

Comparando os tratamentos em que os dejetos foram adicionados nas leiras de compostagem, com e sem adição de ácido fosfórico, observa-se que, até a nona coleta (71 dias), houve diferença no número de coliformes totais entre os dois tratamentos, com o tratamento com adição de ácido apresentando os maiores valores. A partir da nona amostragem, os dois tratamentos não diferiram entre si.

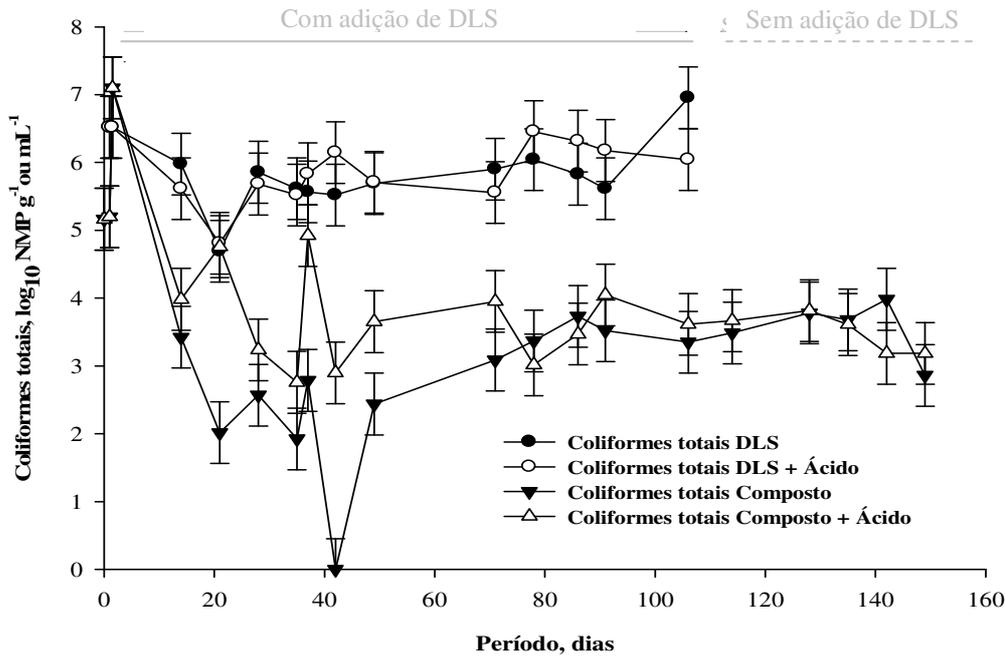


Figura 9 – População de coliformes totais (CT) em dejetos líquidos de suínos (DLS), com e sem adição de ácido fosfórico antes da sua aplicação nas leiras de compostagem e população de CT no composto obtido. As barras de erro representam o erro padrão da média.

Quanto aos dejetos adicionados, observa-se que a população de coliformes totais variou dentro da faixa de 5 a 7 (\log_{10} NMP g^{-1}) durante todo o experimento, sem diferenças entre o acréscimo ou não de ácido fosfórico. Um resultado inesperado a destacar refere-se ao fato da população de coliformes totais não ter diminuído na maior parte das amostragens realizadas após ter cessado a adição de dejetos nas leiras, aos 106 dias. Essa persistência foi observada, tanto com o composto que recebeu ácido como naquele sem ácido, até a última amostragem, que foi realizada aos 156 dias de compostagem. Esse resultado indica que as condições existentes nas leiras de compostagem, mesmo sem a adição de dejetos, foram suficientes para manter a população de coliformes totais.

O perfil de temperatura observado (Figura 10) indica que durante todo o período de compostagem ocorreram três fases distintas, sendo a primeira até 30 dias, a segunda de 30 a 106 dias e a última de 106 a 156 dias. Na primeira fase, observa-se que houve um aumento linear da temperatura das leiras durante os primeiros seis dias, a qual passou de aproximadamente 38 °C para 61 °C. Esse aumento da temperatura, passando rapidamente da faixa mesofílica para a termofílica, tem sido observado em outros trabalhos (KIEHL, 2004, VALENTE et al., 2009) e se deve à liberação de calor durante o metabolismo dos microrganismos heterotróficos, cuja atividade é favorecida pela mistura dos dejetos de suínos,

ricos em nitrogênio amoniacal ao substrato utilizado (maravalha + serragem), cuja relação C/N era elevada. Essa geração de calor pela atividade microbiológica durante o processo de oxidação da matéria orgânica é considerada de fundamental importância no tratamento de dejetos via compostagem, já que a maioria dos microrganismos potencialmente patogênicos é eliminada ou tem a sua população diminuída durante a fase termofílica (VALENTE et al., 2009). Por isso, a redução da população de coliformes totais observada na fase inicial da compostagem (Figura 9) pode ser atribuída a este aumento da temperatura das leiras.

Ainda na primeira fase, observa-se que durante os primeiros 20 dias, em que a temperatura das leiras se manteve em valores mais elevados oscilando entre 38 e 65 °C ocorreram maiores variações nos valores (Figura 10). Aos sete dias, por exemplo, a temperatura média das pilhas com e sem adição de ácido fosfórico, diminuiu de 60 para 45 °C e logo aumentou novamente até atingir 61 °C aos 10 dias. Do décimo ao décimo segundo dia a temperatura diminuiu para cerca de 50 °C e aumentou novamente até atingir o valor máximo observado no experimento, que foi de 65 °C aos 14 dias.

Esse comportamento pode ser explicado pela ação da máquina revolvedora nas leiras, pois a cada revolvimento efetuado ocorre liberação de calor das pilhas, com forte impacto na redução da temperatura. Logo após essa operação, a temperatura se eleva novamente até o próximo revolvimento. Todavia, isso é observado apenas durante as primeiras três semanas de compostagem, indicando que após este período a disponibilidade de carbono do substrato começou a limitar a atividade da população de heterotróficos e, mesmo com o revolvimento, não havia oscilação significativa da temperatura.

Na figura 10 observa-se que no período após três semanas e até os 30 dias ocorreu uma queda de aproximadamente 20 °C da temperatura, quando iniciou a segunda fase onde a temperatura se manteve em valores próximos a 45°C até 106 dias, quando cessou a adição de dejetos nas leiras. Isso reforça a hipótese de que a disponibilidade maior de carbono da mistura de maravalha + serragem ocorreu nas primeiras três semanas e que após este período a atividade microbiana foi sustentada pela adição de carbono através dos dejetos, já que estes eram adicionados semanalmente. Neste período, entre 30 e 106 dias, a temperatura das leiras superou a temperatura do ambiente 15 °C em média, o que demonstra a influência do substrato remanescente e, principalmente dos dejetos, como fontes de C e energia na manutenção da atividade dos microrganismos.

O efeito dos dejetos na manutenção da atividade microbiana e, por consequência, na temperatura das leiras, é comprovado ao se analisar o período entre 106 e 156 dias, a terceira fase do processo. Observa-se que, com a interrupção na adição de dejetos, aos 106 dias, a

temperatura das leiras diminuiu gradativamente, aproximando-se cada vez mais dos valores da temperatura ambiente. Isso indica que, aos 150 dias, o composto atingiu a maturidade, já que a temperatura tem sido usada como um índice de maturação do composto (STENTIFORD et al., 1996 ; MUKHTAR et al., 2004; CEMPIRKOVÁ et al., 2007; ELVING, 2009; McCARTHY, 2011). Essa condição foi assumida a partir dos resultados obtidos por Tiquia et al. (2002), Kiehl (2004) e Valente et al. (2009). As linhas médias de temperatura para ambos os tratamentos estão de acordo com o encontrado em estudos similares (DAI PRÁ et al., 2006; SEDIYAMA et al., 2008; McCARTHY et al., 2011).

Um resultado a destacar refere-se à comparação da temperatura entre as leiras com e sem a adição de ácido fosfórico. Observa-se na figura 10 que, no período entre 50 e 100 dias, houve uma tendência da leira do composto sem ácido em apresentar maiores valores de temperatura do que a leira com ácido. Entre 80 e 100 dias essa diferença média foi de 6 °C. Esse resultado indica que, neste período da segunda fase do processo de compostagem, a atividade microbiana foi afetada negativamente pela adição do ácido, liberando menos calor. A questão que se coloca é sobre as causas que determinaram a ocorrência deste efeito tão tardiamente. É provável que, nesta segunda fase do processo, a estrutura da população microbiana envolvida na decomposição dos constituintes do substrato e dos dejetos tenha diferido entre as leiras com e sem a adição de ácido.

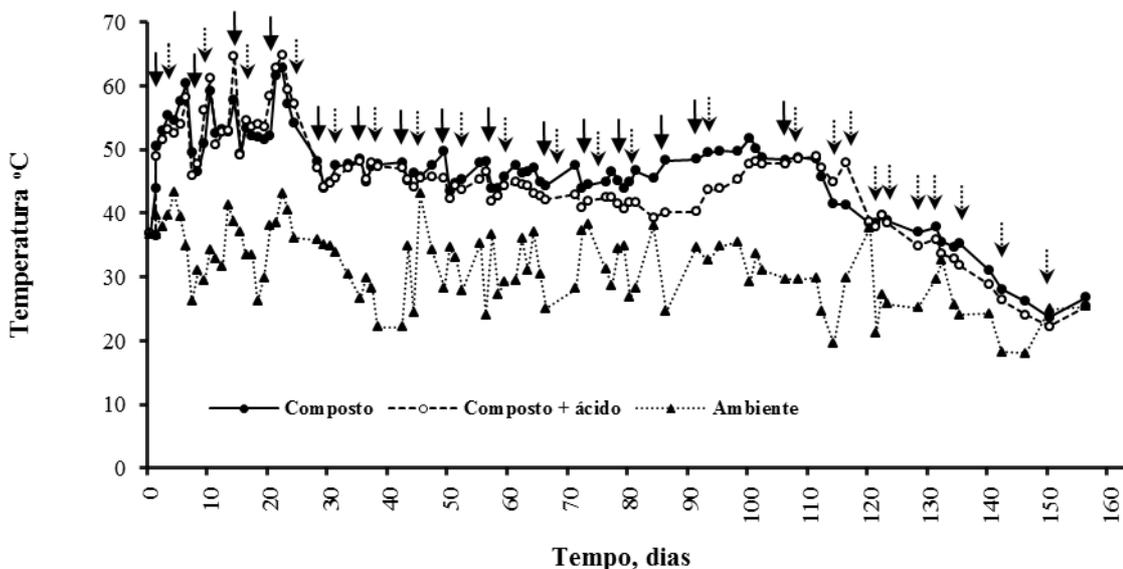


Figura 10 – Variação média da temperatura do ambiente e das leiras de compostagem, onde dejetos líquidos de suínos (DLS), com e sem a adição de ácido fosfórico, foram adicionados à mistura de maravalha + serragem como substrato. As setas com linhas cheias indicam a adição dos DLS e revolvimento das leiras e as pontilhadas somente revolvidas durante o processo de compostagem.

A umidade inicial era de apenas 6,3% no substrato, e na primeira adição de DLS atingiu valores próximos a 60,0 % (Figura 11). Isso ocorreu pelo fato dos dejetos líquidos apresentarem 98,9 % de umidade. O NMP de coliformes fecais do tratamento com adição de ácido fosfórico apresentou correlação negativa com a umidade ($p < 0,05$) o que demonstra ser a umidade um importante condicionante da sobrevivência dos coliformes fecais e um dos principais fatores ambientais de transporte, fornecimento de nutrientes dissolvidos e oxigênio para a atividade metabólica dos microrganismos que só são capazes de absorver nutrientes que se encontrem na fase dissolvida (OLIVEIRA et al. 2006).

A umidade das leiras aumentou gradativamente até atingir cerca de 78,0 % ao final do primeiro mês, mantendo-se próxima deste valor até 106 dias, através da adição semanal de dejetos (Figura 11). A partir do momento em que cessou a adição de dejetos e as pilhas foram submetidas apenas ao revolvimento duas vezes por semana, nota-se que a umidade de ambas as pilhas diminuiu em aproximadamente 3%. A expectativa era de uma redução maior com os revolvimentos frequentes, o que pode não ter ocorrido em função da redução na temperatura observada neste período (Figura 10), que deve ter reduzido a evaporação d'água. O teor final de umidade das pilhas, de 75,0 % é próximo ao encontrado por Leite et al. (2003), de 77,1 % e por Leal (2006), de 71,9 %. Com o aparecimento de chorume nas leiras após a segunda adição de dejetos optou-se por reduzir gradualmente a quantidade de DLS aplicado a cada semana (Tabela 1). Na maioria das adições de dejetos quantificou-se a população de coliformes totais (CT) e fecais (CF), nos dejetos sem e com adição de ácido fosfórico.

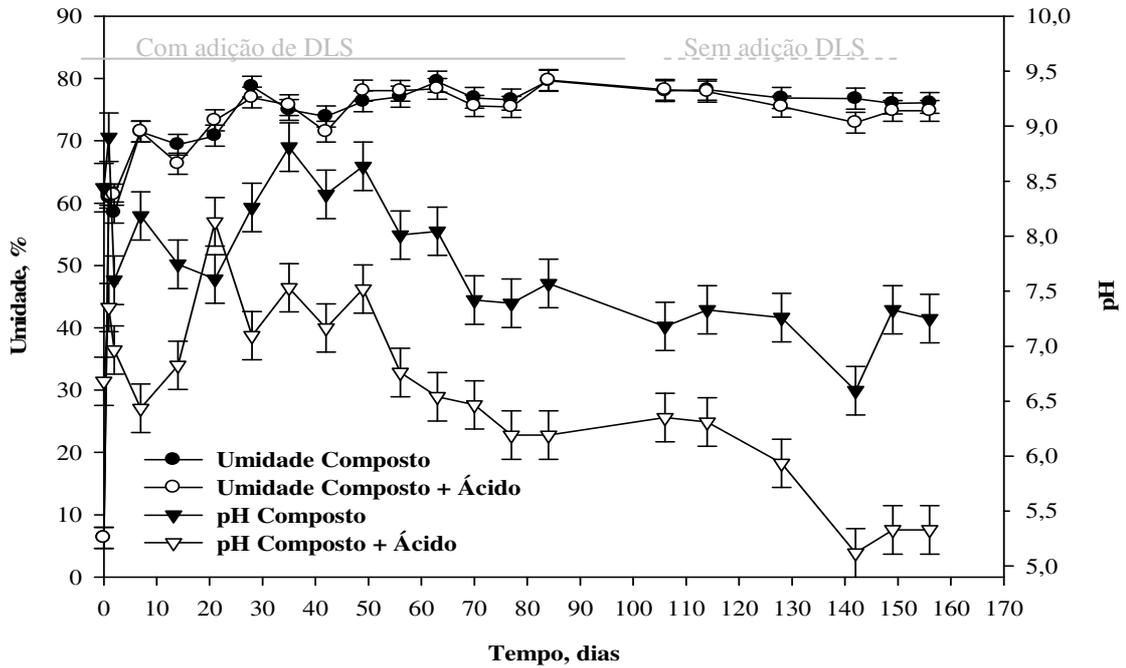


Figura 11 – Variação da umidade e pH ao longo do processo de compostagem nos tratamentos com e sem adição de ácido fosfórico. As barras de erro representam o erro padrão da média.

Os resultados das figuras 9 e 12 e da tabela 1 indicam que não houve diferença no número de coliformes entre os dejetos com e sem adição de ácido fosfórico. Sem a adição de ácido fosfórico, a população média de CF nos dejetos foi de $5,72 \pm 0,5$ (\log_{10} NMP mL^{-1}) enquanto com adição de ácido foi de $5,61 \pm 0,54$ (\log_{10} NMP mL^{-1}). Isso evidencia que as duas leiras receberam concentrações semelhantes de coliformes em cada adição de dejetos. Conforme observado para os coliformes totais (Figura 9), os coliformes fecais (CF) também estavam presentes no substrato, mesmo antes da adição dos dejetos.

Nessa condição, a população inicial era de 1,4 (\log_{10} NMP g^{-1}) evidenciando que o substrato pode ter sido contaminado com CF, tanto na serraria onde foi coletado como durante o seu transporte ou até mesmo durante os procedimentos analíticos do material no laboratório. Isso porque a presença de CF em matrizes ambientais como, por exemplo, na mistura de serragem e maravalha utilizada no experimento, indica que as mesmas tiveram contato com animais de sangue quente ou de humanos, cujo trato digestivo é habitado por CF.

Após a primeira adição de dejetos, cuja população inicial era de 6,52 (\log_{10} NMP mL^{-1}), o NMP do composto aumentou para 6,0 (\log_{10} NMP g^{-1}) no tratamento com adição de ácido fosfórico e 4,9 (\log_{10} NMP g^{-1}) no tratamento sem adição de ácido. No final do

experimento, a população de CF no composto que recebeu dejetos sem adição de ácido diminuiu para 1,3 (\log_{10} NMP g^{-1}) e no composto com ácido para 0,4 (\log_{10} NMP g^{-1}). Após o aumento inicial provocado pela adição dos dejetos, ocorreu uma redução acentuada na população de CF nos primeiros 35 dias, o que coincide com a fase termofílica da compostagem, em que a temperatura das leiras foi superior a 45°C (Figura 10).

Mesmo com a readição frequente de dejetos nessa fase, a população de CF diminuiu o que pode ser atribuído aos valores desfavoráveis de temperatura para o crescimento de CF, representados aqui por *Escherichia coli*. Quando a temperatura das leiras permaneceu em torno de 45 °C, no período entre 30 e 106 dias, não houve recuperação da população de CF para os níveis encontrados na segunda amostragem, realizada após a primeira adição de dejetos. Observa-se na figura 12 que a população de CF nos dejetos variou pouco no tempo, na faixa de 5 a 6 (\log_{10} NMP mL^{-1}), na média dos tratamentos com e sem ácido. Portanto, pode-se especular que o fato da população de CF não ter aumentado de forma consistente entre 35 e 106 dias, apesar das adições semanais de dejetos, seja resultado da temperatura ainda desfavorável, combinada a outros fatores, com destaque para a competição com outros microrganismos pelos nutrientes disponíveis.

Na primeira adição de dejetos realizada, os CF presentes nos mesmos devem ter sofrido pouca ou nenhuma competição com outros microrganismos pelo carbono e nutrientes dos próprios dejetos e, principalmente, pelo carbono do substrato. Todavia, o rápido aumento no crescimento e atividade de outros microrganismos heterotróficos aumentou a temperatura das leiras de compostagem para níveis provavelmente desfavoráveis aos coliformes fecais, além de aumentar a competição pelas fontes de nutrientes, carbono e energia. Turner (2002) sugere que fatores tais como o conteúdo de umidade, a liberação de amônia e a atividade de outros microrganismos exercem efeito inibitório sobre o desenvolvimento de microrganismos patogênicos em compostos.

Apesar das variações observadas na população de coliformes fecais durante a compostagem, observa-se na figura 12 que há uma tendência clara na redução da população deste grupo de bactérias, a partir do momento em que cessou a adição de dejetos nas leiras, aos 106 dias. Isso pode ser explicado pela não reinoculação semanal das leiras com bactérias contidas nos dejetos e pela exaustão das fontes de nutrientes, carbono e energia, além da redução gradativa da temperatura para valores subótimos (Figura 10). Portanto, para que haja redução efetiva de coliformes fecais nesse sistema de compostagem automatizada dos dejetos líquidos de suínos, parece de fundamental importância que haja um período no final do processo em que as leiras sejam apenas revolvidas, sem a readição de dejetos.

Com relação ao efeito da acidificação dos dejetos sobre a população de CF observa-se na figura 12 que, até cessar a adição de dejetos nas leiras, quando houve diferenças, ela ocorreu sempre no mesmo sentido com a leira que recebeu dejetos acidificados apresentando maior população. Por outro lado, após cessar a adição de dejetos, essa tendência se inverteu, com o tratamento com adição de ácido fosfórico apresentando menos CF. É difícil estabelecer as causas para este resultado já que a temperatura (Figura 10) e a umidade (Figura 11) não diferiram entre os dois compostos.

O pH também não explica o resultado, uma vez que a variação ocorreu sempre no mesmo sentido, com o composto da leira que recebeu dejetos com ácido fosfórico apresentando, durante todo o experimento, valor de pH entre 1 e 1,5 unidades menor do que o composto sem ácido. De acordo com Lei et al.(2000) , Sundberg et al. (2004) e Chroni et al. (2009), com valores de pH próximos a 9,0 ou acima, ocorre a morte de coliformes fecais, e valores de pH entre 5,5 e 8,3 permitem a sobrevivência destes no material compostado. Estes mesmos autores preconizam que o pH se correlaciona com o crescimento e desenvolvimento de microrganismos, incluindo *E. coli*, durante a compostagem, com valores baixos de pH podendo resultar na inibição do seu crescimento. No presente trabalho, raramente os valores de pH de ambos os compostos apresentaram valores fora desta faixa. Apesar do pH não ser um fator limitante para a eficiência do processo levando em consideração que vários microrganismos podem se desenvolver em diferentes faixa de pH, este é um parâmetro importante, pois condiciona o desenvolvimento dos microrganismos e se preconiza que o pH inicial da leira deva estar entre 5,5 e 8,5 (SILVA et al., 2003; HERBETS et al., 2005; WANG et al., 2011). Entretanto os fatores que controlam a sobrevivência de coliformes, como indicadores de poluição fecal, devem agir de modo interativo durante a compostagem, o que dificulta a interpretação dos resultados.

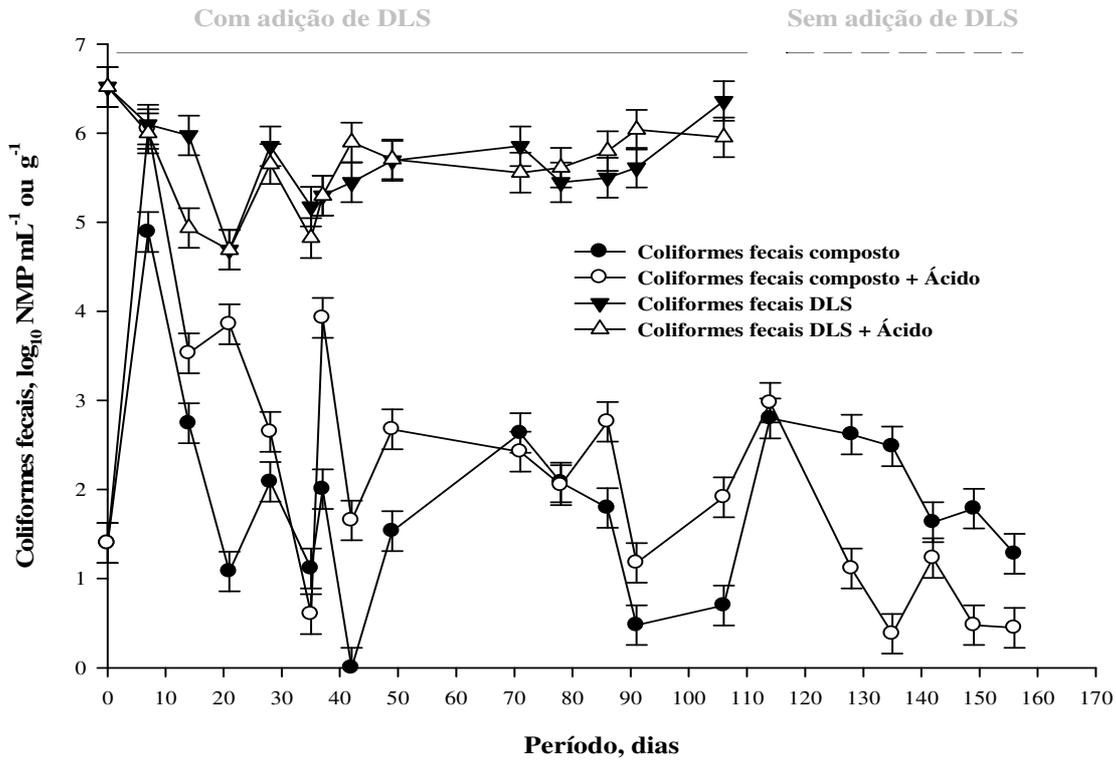


Figura 12 – População de coliformes fecais (CF) em dejetos líquidos de suínos (DLS), com e sem adição de ácido fosfórico antes da sua aplicação nas leiras de compostagem e população de CF no composto obtido. As barras de erro representam o erro padrão da média.

A partir dos resultados deste trabalho, pode-se inferir que a compostagem automatizada dos dejetos líquidos de suínos constitui uma estratégia eficiente na redução de tais microrganismos, porém sem diferenças entre acidificar ou não os dejetos na maior parte da compostagem. Ao final do processo, aos 156 dias de compostagem, a massa total do material compostado no tratamento que recebeu adição de ácido foi de 814,68 Kg e o NMP de coliformes fecais foi de $2,3 \times 10^4$, enquanto no composto sem adição de ácido a massa final foi de 635 kg com NMP de $1,2 \times 10^5$ (Tabela 2). Estes valores demonstram que o composto final está dentro dos limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que é de $1,0 \times 10^3$ NMP g⁻¹; (BRASIL, 2006), para compostos classe A, pois a concentração de coliformes fecais nos tratamentos com e sem adição de ácido foi de 0,03 e 0,19 NMP g⁻¹ de composto, respectivamente.

Esse resultado é mostrado na tabela 2, onde a eficiência de remoção de coliformes fecais foi próxima a 100 % para ambos os tratamentos, propiciando a sanitização do composto final e a possibilidade de recomendação do mesmo para uso agrícola.

Tabela 2 – Eficiência de remoção de coliformes fecais dos dejetos líquidos de suínos em compostagem automatizada com e sem adição de ácido fosfórico

Parâmetros	Composto	Composto + Ácido Fosfórico
Coliformes Fecais (NMP)		
CF _{AD}	4,2 x 10 ¹² a	3,8 x 10 ¹² a
CF _{FMC}	1,2 x 10 ⁵ b	2,3 x 10 ⁴ b
Substrato (kg)		
PS Inicial	466,0	466,0
PMC Final	635,0	814,7
Dejetos adicionados (L)		
DLS total	3.936	3.936
Ef. Rem. (%)	99,9	99,9

CF_{AD}= coliformes fecais adicionados por mL dejetos, CF_{FMC}= coliformes fecais final na massa total do composto, Ef. Rem.= eficiência de remoção, PS= peso substrato, PMC= peso massa composto, DLS= Dejetos líquidos de suínos.

5 CONCLUSÃO

A aplicação de DLS no solo causa alteração na concentração de coliformes fecais na água escoada, no entanto aplicar DLS em superfície ou injetado no solo não interfere na concentração de coliformes fecais que são carregados através da água de escoamento em longo prazo. Após 203 dias da deposição dos dejetos no solo, os coliformes fecais ainda eram detectáveis nos dois tratamentos.

O tratamento dos DLS com o sistema de compostagem automatizada propicia a redução significativa na população de coliformes fecais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIPECS- Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mundial/producao>. Acesso em 20/06/2012.
- ADAMS, J.D.W.; FROSTICK, L.E. Investigating microbial activities in compost using mushroom (*Agaricus bisporus*) cultivation as an experimental system. **Bioresource Technology**, 99: p. 1097-1102, 2008.
- ALMEIDA R.A.; ALMEIDA, N.A. Remoção de coliformes do esgoto por meio de espécies vegetais. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, 7:308-318, 2005.
- APHA, AWWA, EFA. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. Washington, DC, USA, 2005.
- ASAE, 1998. ASAE Standards 1998. Standards, Engineering Practices, and Data. ASAE, St. Joseph, MI.
- ASHBOLT, N.J.; GRABOW, N.O.W.; SNOZZI, M. **Indicators of microbial water quality. Water Quality: Guidelines, Standards, and Health. Risk Assessment and Management for Water-Related Infectious Disease**, Chapter 13. Ed. Fewtrell, L. and Bartram, J. p. 289, 2001.
- ASSMANN, M.J. et al. Produção de matéria seca de forragem e acúmulo de nutrientes em pastagem anual de inverno tratada com esterco líquido de suínos. **Revista Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2408-2416, 2009.
- BALODA, S.B.; CHRISTENSEN, L.; TRAJCEVSKA, S. Persistence of a Salmonella enterica Serovar Typhimurium DT12 Clone in a piggery and in Agricultural Soil Amended with Salmonella-Contaminated Slurry. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(6). 2859-2862, 2001.
- BARATTA JUNIOR, A.P.; MAGALHÃES L.M.S. Aproveitamento de resíduos da poda de árvores da cidade do rio de janeiro para compostagem. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.8, n.1, p.113- 125, 2010.
- BARROS, F.M. et al. Mineralização de nitrogênio em dejetos de suínos. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, n.12 Pág. 1, 2011
- BARRINGTON, S. et al. Compost convective airflow under passive aeration. **Bioresource Technology**, 86: 259-266, 2003.
- BASSO, C. J. et al. Dejeito líquido de suíno: II - perdas de nitrogênio e fósforo por percolação no solo sob plantio direto. **Revista Ciência Rural**, n. 35; p. 1305-1312, 2005.
- BASTHOLM S. et al. A simple bioluminescence procedure for early warning detection of coliform bacteria in drinking water. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24(10): 2323-2330, 2008.

BHADURI, S.; WESLEY, I. Isolation and characterization of *Yersinia enterocolitica* from swine feces recovered during the National Animal Health Monitoring System Swine 2000 study. **Journal Food Protection** 69:2107–2112, 2006.

BOULTER, J.I.; BOLAND, G.J.; TREVORS, J.T. Compost: a study of the development process and end-product potential for suppression of turf grass disease. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 16, 115-134, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 27, de 05 de junho de 2006. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 09 de junho de 2006. Seção 1, p.15.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Agência Nacional de Águas (ANA). Panorama da Qualidade das águas subterrâneas no Brasil. Brasília, 126p. **Cadernos de Recursos Hídricos** 5, 2007.

CANTUSIO NETO, R. Comparação entre os métodos de tubos múltiplos e o substrato cromogênico enzimático (ONPG/MUG), para detecção de coliformes na água tratada. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.90/91, p.64-67, 2001.

CARGNIN, R.H.O. et al. Persistência de coliformes em solos com aplicação de dejetos líquidos de suínos. In: 5º Fertibio, Bonito, MS: 4p. 2006 **Resumos...** (CD ROM).

CARNEIRO, L. et al. Phenotypic and genotypic characterisation of *Escherichia coli* strains serogrouped as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from pasteurised milk. **Internat Journal of Food Microbiology**, v.108, p.15-21, 2006.

CARPENTER-BOGGS, L.; KENNEDY, A.C.; REGANOLD, J.P. Use of phospholipid fatty acids and carbon source utilization patterns to track microbial community succession in developing compost. **Applied Environmental Microbiology**, 64(10): 4062-4064, 1998.

CEBALLOS, B.S.O. et al. Spatial and temporal distribution of fecal coliforms, coliphages, moulds and yeasts in freshwater at the semi-arid tropic northeast region in Brazil (Paraíba State). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.2, n.26, p.90 -100, 1995.

ČEMPÍRKOVÁ R.; ŠOCH, M. The analysis of real microbiological risks for dissociated slurry. **Agricultura tropica et subtropica**, v.40(4), 2007.

CERQUEIRA, D.A. et al Perfis de Ocorrências de Coliformes Termotolerantes e de *E. coli* em diferentes Amostras de Água. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária E Ambiental, 20. **Anais...** Rio de Janeiro: ABESA, 1999. p.1251-1257, 1999. 1 CD-ROM.

CEUSTERMANS, A. et al. Inactivation of *Salmonella* Senftenberg strain W 775 during composting of biowastes and garden wastes. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.53–64, 2007.

CHRONI C.H. et al. Investigation of the microbial community structure and activity as indicators of compost stability and composting process evolution. **Bioresource Technology** 100, 3745, 2009.

COELHO, W.M.; CARVALHO, E.H.; ARAUJO, J.L.B. **Avaliação de metodologias para detecção de ovos de helmintos no lodo e determinação do percentual de recuperação.** XXVIII Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 2002. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/mexico26/iii-012.pdf>. Acesso em 09 de julho de 2012.

COOLS, D. **Manure-derived antibiotic resistant bacteria: survival in soil and contamination of crop roots.** Ph.D. Thesis, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium, 320p, 2001.

COSTA, M.S.S.M. et al. Desempenho de quatro sistemas para compostagem de carcaça de aves. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.** v.10. n.3, p.692-698, 2006.

CÔTÉ, C.; S. QUESSY. Persistence of *Escherichia coli* and *Salmonella* in surface soil following application of liquid hog manure for production of pickling cucumbers. **Journal of Food Protection**, 68:900–905, 2005.

CUNHA, M. A.; SILVA, M. R. Métodos de detecção de microrganismos indicadores. **Saúde & Ambiente em Revista**, v.1, n.1, p.09-13, 2006.

DALFIOR, J.S. **Avaliação da eficiência do grupo coliforme fecal como indicador de balneabilidade de praias quando comparado com enterococcus: estudo de caso da praia da Curva da Jurema.** 53f. 2005. Monografia (Graduação em Oceanografia) – Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

DALLA COSTA, R. **Biodigestão de Resíduos da Suinocultura.** Dissertação de M.Sc., Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química, Maringá, PR, Brasil, 2004.

DAI PRÁ, M.A. **Desenvolvimento de um sistema de compostagem para o tratamento de dejetos de suínos.** 125p. Dissertação (Mestrado), Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2006.

DAI PRÁ, M. A. et al. Compostagem de dejetos de suínos. **Revista Tecnológica**, Santa Cruz do Sul, v.12 n.1, p.28-32, 2008.

DE CARLI, G.A.; TASCA, T.; MACHADO, A.R.L. **Parasitoses Intestinais.** In: DUNCAN, BB; SCHMIDT, M.I. & GIUGLIANI, E.R.J. **Medicina Ambulatorial: condutas e atenção primária baseadas em evidências.** 3ª edição, Ed Artmed, Porto Alegre, RS. Capítulo 160: 1465-1475, 2006.

DROFFNER, M.L.; BRINTON, W.F.; EVANS, E. Evidence for the prominence of well characterized mesophilic bacteria in thermophilic (50–70°C) composting environments. **Biomass Bioenergy.** 8:191–195, 1995.

EBNER, P.D.; MATHEW, A.G. Effects of antibiotic regimens on the fecal shedding patterns of pigs infected with *Salmonella Typhimurium*. **Journal of Food Protection.** 63:709-714, 2000.

ELVING, J. Pathogen Inactivation and Regrowth in Organic Waste during Biological Treatment. Department of Chemistry, Environment and Feed Hygiene, **National Veterinary Institute**. (SVA), SE-751 89, 2009.

ELVING, J. et al. Growth potential of faecal bacteria in simulated psychrophilic/mesophilic zones during composting of organic waste. **Journal Applied Microbiology**, 108: 1974-1981, 2009.

EPA – Environmental Protection Agency. Health Effects of Land Application of Municipal Sludge. EPA/1 – 85/015, 1985.

FERREIRA, R.V. de P.; APELLE, A.C.; TAKEDA, G.K. Avaliação da presença de parasitas em águas destinadas à recreação de contato primário do reservatório Guarapiranga, São Paulo, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23, **Anais...** Campo Grande: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária, 2005.

FERNANDES, F.; SILVA, S. M. C. P. **Manual prático de compostagem de biossólido**. 3ª ed. Rio de Janeiro: ABES, 84p, 2005.

FENLON, D.R. et al. The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. **Journal Applied Microbiology** 88, 149S–156S, 2000.

FERGUSON, C. et al. Fate and transport of surface water pathogens in watersheds. **Critical Review on Environmental Science and Technology**, 33(3): 299–361, 2003.

FONSECA, F.S.T.; ARAÚJO A. R. A.; HENDGES T.L. Análise de viabilidade econômica de biodigestores na atividade suinícola na cidade de Balsas-MA: um estudo de caso. 47º Congresso SOBER: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2009. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/13/687.pd>. Acesso em 07 de julho de 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Trad. Maria carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt – Porto Alegre: Artmed, p 216, 211, 2002.

FRANCO, B.D.G.M. **Microbiologia dos Alimentos**, 2º edição – São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p, 2008.

FRANZ, E.; Van BRUGGEN, A.H.C. Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in the primary vegetable production chain. **Critical Reviews in Microbiology**, 34, 143–161, 2008.

FREI, F.; JUNCANSEN, C.; PAES, J.T.R. Levantamento epidemiológico das parasitoses intestinais: viés analítico decorrente do tratamento profilático. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 24(12):2919-2925, dez, 2008.

GENTRY, R.W. et al. *Escherichia coli* loading at or near base flow in a mixed-use watershed. **Journal Environment Quality**. 35:2244–2249, 2006.

GESSEL, P.D. et al. Persistence of zoonotic pathogens in surface soil treated with different rates of liquid pig manure. **Applied Soil Ecology**, v.25, p.237–243, 2004.

GERBA, C.P.; SMITH, J.E. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. **Journal of Environmental Quality**, 34, 42–48, 2005.

GOSS, M.J. et al. The management of manure in Ontario with respect to water quality (Commissioned Paper No. 6). In: The Walkerton Inquiry. Queen's Printer for Ontario. Ontario Ministry of the Attorney General, Toronto, Ont., 2002.

GOSS, M.; RICHARDS, C. Development of a risk-based index for source water protection planning, which supports the reduction of pathogens from agricultural activity entering water resources. **Journal of Environmental Management**, 87, 623–632, 2008.

GRABOW, W.O.K. “**Bacteriophages**: update on application as models for viruses in water.” *Water South Africa*, 27(2), 251, 2001.

GRAVES, R.E. et al. Composting. In: United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. Part 637 **Environmental Engineering** - National Engineering Handbook. Washington 88p. , 2000.

GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiol Revist Warsaw**, v.13, p.60-98, 1991.

GUAN, T.Y.; HOLLEY, R.A. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness—A Review. **Journal Environmental Quality**, v.32, p.383-391, 2003.

GUBER, A.K. et al. Effect of bovine manure on fecal coliform attachment to soil and soil particles of different sizes. **Applied and Environmental Microbiology**, 73(10), 3363–3370, 2007.

GUTLER, M. et al. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in fattening pigs. **Journal Food Protection** 68:850–854, 2005.

HAJDENWURCEL, J.R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. São Paulo: Fonte comunicações e editora. v.1. p.28, 1998.

HASSEN, A.; BELGUTH, K.; JEDIDI, N. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. Proceedings of International Symposium on **Environmental Pollution Control and Waste Management**. 357-368, 2002.

HERBETS, R. A. et al. Compostagem de resíduos sólidos orgânicos: aspectos biotecnológicos. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v.6, n.1- p.41-50, 2005.

HERRMANN, R.F.; SHANN, J.F. Microbial community changes during the composting of municipal solid waste. **Journal Microbiology Ecology**, 33: 78-85, 1997.

HUNT, H.E.; RICE, E.W. Microbiological examinations. In: EATON, A.D. (Ed.) Standard methods for the examination of water & wastewater. 21th ed. Washington; APHA, 2005. Part 9000, p. 9-1 – 9-169, 2005.

HUTCHISON, M.L. et al. Analyses of livestock production, waste storage, and pathogen levels and prevalences in farm manures. **Appl. Environ. Microbiol.** 71:1231–1236, 2005.

INACIO, C.T.; MILLER, P.R.M. Compostagem: Ciência e prática para gestão de resíduos orgânicos- p. 141-144, 2009. Rio de Janeiro -**Embrapa Solos**.

IBGE- Censo Agropecuário 2010 - Produção da Pecuária Municipal. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>. Acesso em 20/06/2012.

IYENGAR, S. R.; BHAVE, P.P. In-vessel composting of household wastes. Waste Management, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 14 maio 2012.

JAMIESON, R.C. et al. Movement and persistence of fecal bacteria in agricultural soils and subsurface drainage water: A review. **Canadian Biosystems Engineering/Le génie des biosystèmes au Canada.** 44:1.1-1.9, 2002.

JACOBSEN C.S., BECH T.B. Soil survival of Salmonella and transfer to freshwater and fresh produce. **Food Research International**, n.45 p.557–566, 2012.

JAY, J.M. Parâmetros intrínsecos e extrínsecos dos alimentos que afetam o crescimento microbiano. In: **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. Cap. 3, p.51-72, 2005.

JARVIS, N.J. A review of non-equilibrium water flow and solute transport in soil macropores: Principles, controlling factors and consequences for water quality. **European Journal of Soil Science**, 58, 523–546, 2007.

JIMENEZ, E.I.; GARCIA, V.P. Evaluation of city refuse compost maturity: a review. **Biology Wastes**, 27:115-142. 1989.

KIEHL, E.J. **Manual de compostagem maturação e qualidade do composto**, 171p, 1998.

KIEHL, E. J. **Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto**. 4.ed. Piracicaba: E. J. Kiehl, 173p, 2004.

KIEHL E.J. **Adubação orgânica: 500 perguntas & respostas**. Piracicaba: De gaspari. 234p, 2005.

KIM, J.; LUO, F.; JIANG, X. Factors impacting the regrowth of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy manure compost. **Journal of Food Protection**, 72(7): 1576-1584, 2009.

KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed., Rio de Janeiro: MEDSI, 1465p, 2001.

- KUMAR, V.R.S. et al. Chemical Changes During Composting of Dead Birds With Caged Layer Manure. **Journal of Applied Sciences Research**, 3(10): 1100- 1104, 2007. INSInet Publication.
- KUNZ, A. et al. Effect of storage time on swine manure solid separation efficiency by screening. **Bioresource Technology**, v.100, n.5, p.1815-1818, 2009.
- LARSEN, H.E.; MUNCH, B.; SCHLUNDT, J. Use of indicators for monitoring the reduction of pathogens in animal waste treated in biogas plants. **Zentral blatt Hygiene Umweltmed.** v. 195, n.5 - 6, p.544–555, 1994.
- LEI F.; VANDERGHEYNST, J.S. The effect of microbial inoculation and pH on microbial community structure changes during composting. **Process Biochemical.** 35, 923, 2000.
- LEITE, V.D. et al. Tratamento de resíduos sólidos de centrais de abastecimento e feiras livres em reator anaeróbio de batelada. **Revista brasileira engenharia agrícola e ambiental**, Campina Grande: v.7, n.2, 2003.
- LEITE, A.M.O. FRANCO, R.M. Coliformes totais e *Escherichia coli* em coxas de frango comercializados no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.13, n.2, p.80-83, 2006.
- LEVANON, D. et al Impact of tillage on microbial activity and the fate of pesticides in the upper soil. **Water Air Soil Pollut**, 72, 179–189, 1994.
- LIMA, S. et al. Qualidade sanitária de efluentes tratados para reuso agrícola. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v.6, n.2, p.32-35, 2005.
- MACDONALD, J.M. et al. Manure use for fertilizer and for energy: report to congress. United States **Department of Agriculture.** 1-7, 2009.
- MC CARTHY, G. et al. An assessment of pathogen removal during composting of the separated solid fraction of pig manure. **Bioresource Technology**, 102 :9059–9067, 2011
- MANAFI, M.; KREMSMAIER, B. Comparative evaluation of different Chromogenic fluorogenic media for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.257-262, 2001.
- MANGIA, A. H. R. et al. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): filotipagem e resistência a antimicrobianos em um enteropatógeno emergente. **Revista de Patologia Tropical**, v.38 (1): 27-34, 2009.
- MCKERGOW, L.A.; DAVIES-COLLEY, R.J. Storm flow dynamics and loads of *Escherichia coli* in a large mixed land use catchment. **Hydrological Processes**, 24, 276–289, 2010.
- MCMURRY, S.W.; COYNE,M.S.; PERFECT, E. Fecal coliform transport through intact soil blocks amended with poultry manure. **Journal of Environmental Quality**, 27, 86–92, 1998.
- MEAYS C.L. et al. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. **Journal of Environmental Management**, 73:71-79, 2004 .

MELLO de, V.P. et al. Atributos físicos de Latossolos adubados durante cinco anos com biossólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília: 39: 67-72, 2004.

MERCK (2007). Fluorocult LMX Broth. Disponível em http://recife.ifpe.edu.br/recife/caldo_fluorocult.pdf. Acesso em 24 de junho de 2012.

MERCK (2009). Chromocult® Coliform Agar now Approved for Processed Food. Disponível em: <http://www.rapidmicrobiology.com/news/1054h30.php>. Acesso em 24 de junho de 2012.

MIELLE, M.. **Contratos, especialização, escala de produção e potencial poluidor na suinocultura de Santa Catarina**, 286p. Tese Doutorado, Porto Alegre: UFRGS, 2006.

MUIRHEAD, R. W.; COLLINS, R. P.; BREMER, P. J. Interaction of *Escherichia coli* and soil particles in runoff. **Applied and Environmental Microbiology**, 72, 3406–3411, 2006.

MIRANDA, A.P.; LUCAS JÚNIOR, 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, **SIGERA**, p.258-263, 2009.

MOORE, J.A. et al. Evaluating coliform concentrations in runoff from various animal waste management systems. Special Report 817, **Agricultural Experiment Station**, Oregon State University, Corvallis. (unpublished), 1988.

MUBIRU, D.N.; COYNE, M.S.; GROVE. J.H. Mortality of *Escherichia coli* O157:H7 in two soils with different physical and chemical properties. **Journal Environmental Quality** n.29:1821–1825, 2000.

MUKHTAR, S.; KALBASI, A.; AHMED, A. Composting. Chapter 3. In *Carcass Disposal: A Comprehensive Review*. **National Agricultural Biosecurity Center**, Kansas State University, Manhattan, 2004.

NEELY, A.N. A survey of Gram-negative bacteria survival on hospital fabrics and plastics. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, 21, 523–527, 2000.

NIKAEEN, M.; PEJHAN, A.; JALALI, M. Rapid monitoring of indicator coliforms in drinking water by an enzymatic assay. Iran **Journal Environment Health, Science & Engineering**, 6 (1), 7-10, 2009.

NICHOLSON, F.A.; GROVES, S.J.; CHAMBERS, B.J. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. **Bioresource Technology** 96:135–143, 2005.

NOLASCO, M.A.; BAGGIO, R.B.; GRIEBELER, J. Implicações ambientais e qualidade da água da produção animal intensiva. **Revista Acadêmica**, Curitiba, v.3, n.2, p.19-26 , 2005.

NONES, K. et al. Formulação de dietas, desempenho e qualidade da carcaça produção e composição de dejetos suínos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, n.4, p.645-644, 2002.

NUNES, M. U. C. Compostagem de resíduos para a produção de adubo orgânico na pequena propriedade, 2009. Circular Técnica 59. **Embrapa**.

OETTING, L. L. **Avaliação de diferentes marcadores para a determinação da digestibilidade e taxa de passagem do alimento em suínos**. Dissertação, 2002. 59f. (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

OLIVEIRA, V. et al. Teor de proteínas no metabolismo do nitrogênio e da energia em suínos durante o crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras: v.29, n.4, p.866-874, 2005.

OLIVEIRA, R. M. S.; TAVARES, C. R.G.; COSSIC, E. S. Processo integrado para tratamento de resíduos gerados na suinocultura. In: II Fórum ambiental da alta paulista, 2006, Tupã, SP: **Anais...** Tupã, SP. p. 1-14, 2006.

OLIVEIRA, P.A.V.; HIGARASHI, M.M. Unidade de compostagem para o tratamento dos dejetos de suínos- Concórdia: **Embrapa Suínos e Aves**, 2006.

OLSTADT, J. et al. A comparison of ten USEPA approved total coliform/*E. coli* tests. **Journal of Water and Health**, London, v.5, n.2, p.267-282, 2007.

ORRICO A.C.A.; LUCAS JUNIOR J.; ORRICO JÚNIOR M.A.P. Caracterização e biodigestão anaeróbia de dejetos de caprinos. **Engenharia Agrícola**, 27:639-647, 2007.

PAILLAT, J.M. et al. Effet du compostagem de défluentes porcins sur les émissions gazeuses et les teneurs en éléments polluants. Rennes: INRA, Centre de Recherches de Rennes. 106p., 2005.

PAIVA, E.C.R.; MATOS, A.T.; COSTA, T.D.R. Comportamento do pH e da temperatura do material durante a compostagem de carcaça de frango com diferentes materiais orgânicos. I Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, 2010. Disponível em: <http://www.ibeas.org.br/Congresso/Trabalhos2010/III-003.pdf>. Acesso em 26 de junho de 2012.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry** (2nd ed.). Academic Press. London, 1996.

PEGORINI E.S. et al. Qualidade do Lodo de esgoto utilizado na Reciclagem Agrícola na Região Metropolitana de Curitiba/PR. In: I SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE BIOSSÓLIDOS. **Proceedings**. São Paulo. 11p, 2003.

PERDOMO, C.C.; OLIVEIRA, P.A.V.O.; KUNZ, A. Sistema de tratamento de dejetos de suínos: inventário tecnológico. Concórdia: **Embrapa Suínos e Aves**, 2003. 83 p. (Documentos, 85).

PRÈRE, M.F. et al. Bacterial etiology of diarrhea in young children: high prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) not belonging to the classical EPEC serogroups. **Pathologie Biologie**. v.54, p.600-602, 2006.

RECHE M.H.L.R.; PITTOL, M.; FIUZA, L.M. Bactérias e bioindicadores de qualidade de águas de ecossistemas rizícolas da região sul do Brasil. **Oecologia Australis**, 14(2): 452-463, 2010.

REIS, M.F.P.; BIDONE, F.R.A.; GEHLING, G.R. Efeitos da escala e clima no processo de compostagem em região subtropical. XXVII CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENG. SANITÁRIA E AMBIENTAL, 2012.

ROBINE, E.; DERANGERE, D.; ROBIN, D. Survival of a *Pseudomonas fluorescens* and *Enterococcus faecalis* aerosol on inert surfaces. Int. **Journal of Foods Microbiology**. 55, 229–234, 2000.

ROCHA, R.E.M. et al. Avaliação de bio sólido de águas servidas domiciliares como adubo em couve. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.38, n.12, p.1435-1441, 2003.

RODRIGUES, K.F. et al. Desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte no período de 22 a 42 dias de idade alimentados com dietas contendo diferentes relações lisina digestível: proteína bruta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, n.4, p.645- 652, 2008.

RODRIGUES, H.J.B. et al. Variabilidade quantitativa de população microbiana associada às condições microclimáticas observadas em solo de floresta tropical úmida **Revista Brasileira de Meteorologia**, v.26, n.4, 629–638, 2011.

ROMPRÉ, A. et al. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging. **Journal of Microbiological Methods**, [S.l.], v.49, p.31-54, 2002.

ROSTAGNO, M.H. et al. Culture methods differ on the isolation of *Salmonella enterica* serotypes from naturally contaminated swine fecal samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 17:80–83, 2005.

RUFETE, B. et al. Total and fecal coliform bacteria persistence in a pig slurry amended soil B. **Livestock Science**, 102, p.211–215, 2006.

SAID-PULLICINO, D.; ERRIQUENS, F.G.; GIGLIOTTI, G. Changes in the chemical characteristics of water-extractable organic matter during composting and their influence on compost stability and maturity. **Bioresource Technology**, 98: p.1822-1831, 2007.

SAHLSTRÖM L. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. **Bioresource Technology**, 87, 161, 2003.

SALVUCCI, A. E. et al. The impact of biofilm-forming potential and tafi production on transport of environmental Salmonella through unsaturated porous media. **Biologia**, 64, 460–464, 2009.

SANTANA, L.R.R. et al. Qualidades físicas, microbiológicas e parasitológicas de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes sistemas de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.26, n.2, p.264-269, 2006.

SANTOS, S. S. **Influência da aplicação via irrigação por gotejamento, de esgoto sanitário tratado na cultura do cafeeiro e no solo**. 70f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

SCHMIDT, V.; GOTTARDI, C.P.T.; NADVORNY, A. Segurança sanitária durante a produção, o manejo e a disposição final de dejetos de suínos. In: SEGANFREDO, M.A. (Ed.) Gestão ambiental na suinocultura. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 302 p., cap. 11, p.259-286, 2007.

SEDIYAMA, M.A.N. et al. Fermentação de esterco de suínos para uso como adubo orgânico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.12, n.6, p.638–644, 2008.

SEGANFREDO, M. A. Indicadores de pressão ambiental no uso de dejetos suínos como fertilizante do solo e análise de sua aplicabilidade. In: Congresso Brasileiro De Veterinários Especialistas Em Suínos, 13, Florianópolis. **Anais**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. 1 CD-ROM.

SEMENOV, A.M.; KUPRIANOV, A.A.; Van BRUGGEN A.H.C. Transfer of Enteric Pathogens to Successive Habitats as Part of Microbial Cycles. **Environmental Microbiology** n. 60: p.239–249, 2010.

SILVA, M.C. et al. Compostagem em Portugal. Escola Superior de Biotecnologia, 23 jun. 2003. Disponível em: <<http://www.esb.ucp.pt/compostagem>>. Acesso em: 11 DE JUNHO DE 2012.

SILVA G.P.; MARQUES S.M.T. Impacto dos maus odores decorrentes da suinocultura na saúde de Moradores rurais no município de Concórdia, Santa Catarina, Brasil. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.3, n.2, p. 135-141, 2004.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica da água**. São Paulo: Varela, 164p.

STROM, P.F. 1985. Identification of thermophilic bacteria in solid waste composting. **Applied Environmental Microbiology**, 50(4): 906-913, 2005.

SILVA A.L.B. et al. Comportamento da biomassa metanogênica de lodo de reator UASB tratando esgoto sanitário e lodo de descarte de biofiltros aerados submersos. In: 23º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, ABES, Campo Grande, 2005.

SILVA, E.P.; BERGAMINI, A.M.M.; OLIVEIRA, M.A. Toxinfeções alimentares na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil – 2005 a 2008. **Boletim Epidemiológico Paulista (Bepa)** 7(77):4-10, 2010.

SILVA, M.M.P. et al. Tratamento aeróbio conjugado de lodos de tanques sépticos e resíduos sólidos orgânicos domiciliares. *Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, v.4, n.3, p.123-143, 2009.

SOUZA, J.A. et al. Contaminação microbiológica do perfil do solo com esgoto sanitário. **Acta Scientiarum. Technology**, v.33, n.1, p.5-8, 2011.

SUNDBERG C.; SMARS S.; JONSSON H. Low pH as an inhibiting factor in the transition from mesophilic to thermophilic phase in composting. **Bioresource Technology**, 95, (2), 140, 2004.

- TEDESCO, M.J et al. Análises de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p. (**Boletim Técnico**, 5).
- TEIXEIRA, L.B. et al. Processo de compostagem a partir de lixo orgânico urbano e caroço de açaí. **Circular Técnica**, 29, Embrapa, Belém, 8 p, 2002.
- TENUTA, M.; LAZAROVITS, G. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. **Phytopathology**, 92, 255–264, 2002.
- TIQUIA, S.M.; WAN, J.H.C.; TAM, N.F.Y. Dynamics of yard trimmings composting as determined by dehydrogenase activity, ATP content, arginine ammonification, and nitrification potential. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 37, p.1057–1065, 2002.
- TRAUTMANN, N.M.; KRASNY, M.E. **The science of composting**. EUA: Cornell University, 1997.
- TRONCO, V.M. **Manual para Inspeção da qualidade do leite**. 4. Ed., Editora UFSM, 2010.
- TSORAEVA, A.; MARQUES, P.F. **Meios cromogênicos e fluorogênicos: uma nova realidade-** Revista indústria de laticínios, 2005 disponível em: <http://www.biocendobrasil.com.br/documentos/cromogenicos.pdf>: acesso em 24 de junho de 2012.
- TURCO, R. F.; BLUME, E. Indicators of soil quality. In: SIQUEIRA, J. O; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. G. R.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Org.). Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa: **SBCS**; Lavras: UFLA/DCS, p. 529-549, 1999.
- TURNER, C. The thermal inactivation of *E. coli* in straw and pig manure. **Bioresource Technology**, 84: 57-61, 2002.
- UNC, A.; GOSS, M. J. Movement of faecal bacteria through the vadose zone. **Water, Air, and Soil Pollution**, 149, 327–337, 2003.
- UNC, A.; GOSS, M. Transport of bacteria from manure and protection of water resources. **Applied Soil Ecology**, 25: 1-18, 2004.
- VALENTE, B.S. et al. Fatores que afetam o desenvolvimento da compostagem de resíduos orgânicos. **Archivos de Zootecnia**. 58 (R): 59-85, 2009.
- VAN VLIET, P.C.J. et al. Effects of cow diet on the microbial community and organic matter and nitrogen content of feces. **Journal of Dairy Science**, 90, 5146 e 5158, 2007.
- VERGNOUX, A. et al. Monitoring of the evolution of an industrial compost and prediction of some compost properties by NIR spectroscopy. **Science Total Environment**, v.407, p.2390-2403, 2009.
- VINTEN, A J.A. et al. Fate of *Escherichia coli* and *Escherichia coli* O157 in soils and drainage water following cattle slurry application at 3 sites in southern Scotland. **Soil Use and Management**, 18, 223–231, 2002.

- VIVAN, M. et al. Eficiência da interação biodigestor e lagoas de estabilização na remoção de poluentes em dejetos de suínos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.3, p.320–325, 2010.
- WANG, G.; DOYLE, M.P. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. **Journal of Food Protection**, 61:662–667, 1998.
- WANG, P. et al. Maturity indices for composted dairy and pig manures. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p. 767–776, 2004.
- WANG, L.; MANKIN, K.R.; MARCHIN G.L. Survival of fecal bacteria in dairy cow manure. **American Society Of Agricultural Engineers**, v.47(4): 1239-1246, 2004.
- WANG, J.J. et al. Reducing potential leaching of phosphorus, heavy metals, and fecal coliform from animal wastes using brauxite residues. **Water Air Soil Pollut**, n,252, p.214-241, 2011.
- WATABE, M. et al. Prevalence of bacterial faecal pathogens in separated and unseparated stored pig slurry. Letters in **Applied Microbiology**, 36, 208–212, 2003.
- WOLNA-MARUWKA A.; SAWICKA A. The dynamics of microorganisms development in soil during decomposition of sewage sludge treated by different methods. **Polish Journal Natural Sciences**. 15(3), 672, 2003.
- WONG, J.W.C., SELVAM, A. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms in pig manure through fly ash and lime addition during alkaline stabilization. **Journal of Hazardous Materials**, 169p. 882–889, 2009.
- ZALESKI, K.J. et al. Survival, growth, and regrowth of enteric indicator and pathogenic bacteria in biosolids, compost, soil, and land applied biosolids. **Journal of Residuals Science and Technology**, 2, 49–63, 2005.
- ZILLI, J. E. et al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília: v.20, n.3, p.391-411, 2003.

ANEXO

ANEXO A – Escolha dos meios de cultura

Para a tomada de decisão de qual metodologia e/ou meio de cultura seria utilizado para identificar os microrganismos indicadores nos dois experimentos (Estudo I e Estudo II) foram realizados testes preliminares com diferentes amostras.

Foram coletadas as seguintes amostras:

1- coleta de afluentes da Estação de Tratamento de Afluentes (ETA) da CORSAN, Santa Maria, RS.

2- Dejetos Líquidos de Suínos (DLS) do setor de suinocultura, departamento de zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.

3- Lodo de esgoto da ETA da CORSAN, Santa Maria, RS.

4- Cama de aviário do setor de avicultura da UFSM, Santa Maria, RS.

Para cada amostra coletada utilizou-se três meios de cultura e três metodologias diferentes descritas a seguir.

1- Fermentação dos tubos múltiplos:

Considerado um método convencional que é realizado em três etapas.

Na primeira etapa (presuntiva) o meio usado foi caldo lauril sulfato triptose (LST), com tubos de Durham invertidos.

Na segunda etapa (confirmativa), alçadas do caldo lauril positivo foram inoculadas em caldo Verde Bile Brilhante (VBB) para coliformes totais, e caldo EC com tubo de Durham invertido para coliformes fecais.

Na terceira etapa (confirmativa adicional), os tubos de caldo EC positivos foram homogeneizados e uma alçada foi semeada em placas de ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para a confirmação de *E. Coli*.

Por esta técnica são considerados coliformes os microrganismos que são capazes de fermentar lactose nos testes presuntivos e confirmativos, com produção de gás a 35 +2°C e a 44 +1°C.

ANEXO A – Escolha dos meios de cultura (Continuação).

2- Caldo Fluorocult:

Considerado um método rápido onde se detecta simultaneamente coliformes totais e *E. coli* em amostras líquidas e sólidas.

Foram feitas diluições de 10^1 a 10^7 , distribuídos em três séries de cinco tubos e incubadas à 36 ± 1 °C por 24-48 horas. A presença de coliformes totais foi indicada pela cor azul-esverdeado do caldo e coliformes fecais e *E. coli* pela fluorescência azul sob luz UV. Para confirmação da *E. coli* foi adicionado cinco gotas de reativo de Kovacs em cada tubo que apresentou fluorescência e esta confirmação ocorria com a mudança de cor do reativo de amarelo para rosa.

3-Chromocult coliform ágar

Um ml de cada diluição foi distribuído cuidadosamente em toda superfície do meio com uma alça de Drigalski estéril, espalhando homogeneamente a amostra em placas de petri estéreis contendo o meio de cultura. As placas foram incubadas a 37 ± 1 °C por 24 horas.

A contagem dos microrganismos foi realizada visualmente, diferenciando-se, entre coliformes totais e *E. coli*, onde para coliformes totais as colônias eram vermelhas e *E.coli* colônias roxas Só foram consideradas as placas com contagem entre 30 e 300 colônias.

A quantidade de NMP mL⁻¹ não apresentou diferença em relação a metodologia e ao meio de cultura utilizado (dados não publicados).

O caldo fluorocult foi o escolhido por ser mais rápido e exigir menor mão-de-obra, sem afetar, no entanto, a qualidade dos dados finais.

Após a escolha da metodologia, foram realizados testes comparativos em amostras de DLS, cama de aviário e água de esgoto, afluyente da estação de tratamento da corsan, para averiguar se o volume de amostra e volume do meio de cultura interferia no resultado final.

ANEXO A – Escolha dos meios de cultura (Conclusão).

Para cada amostra líquida foram feitas diluições de 10^{-1} á 10^{-7} enquanto que para a amostra sólida (cama de aviário), foi pesado 10g da amostra e misturada em 90 mL de água peptonada tamponada 0,1% estéril (pH 6,5). A amostra foi levada ao agitador mecânico durante 15 minutos a 67 RPM, constituindo-se a diluição 10^{-1} . Dessa suspensão, 1 mL foi transferido para frascos contendo 9mL de água peptonada tamponada 0,1%, estabelecendo uma diluição 10^{-2} , procedimento que foi repetido para estabelecer uma sequência de diluições até 10^{-7} .

Para a realização do teste utilizou-se volumes de caldo fluorocult e inculo em tubos de ensaio nos volumes de 9:1, 4,5:0,5 e 0,9:0,1 mL respectivamente.

Os resultados obtidos não diferiram ente si em relação a tubos positivos e negativos (dados não publicados pela autora).

Diante desta informação, por questões científicas, econômicas e de representatividade optou-se pela utilização do volume intermediário de 4,5:0,5mL uma vez que o caldo fluorocult possui elevado custo para aquisição.