

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE UM
COMPOSTO PRODUZIDO A PARTIR DE RESÍDUOS ANIMAIS
E VEGETAIS**

Sonia Villamizar Cancelado

Tecnóloga Ambiental

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE UM
COMPOSTO PRODUZIDO A PARTIR DE RESÍDUOS ANIMAIS
E VEGETAIS**

Sonia Villamizar Cancelado

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2014

V715a

Villamizar, Sonia Cancelado

Avaliação da qualidade microbiológica de um composto produzido a partir de resíduos animais e vegetais / Sonia Villamizar Cancelado. -- Jaboticabal, 2014

vii, 67 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientadora: Lucia Maria Aparecida Carareto Alves

Banca examinadora: Manoel Victor Franco Lemos, Janaina Conrado Lyra da Fonseca

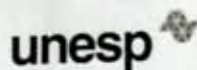
Bibliografia

1. Compostagem. 2. Carcaças. 3. Biossegurança. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 628473

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

SONIA VILLAMIZAR CANCELADO – filha de MARIA AGRIPINA CANCELADO NIÑO e de CARLOS VILLAMIZAR MORENO. Nascida na cidade de Bucaramanga (Santander -Colômbia), em 16 de janeiro de 1974. Em fevereiro de 2006, iniciou o curso de Tecnologia Ambiental obtendo o título de Tecnóloga Ambiental pelas Unidades Tecnológicas de Santander (Colômbia) no ano de 2010. Em 2012 ingressou no curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) no Câmpus de Jaboticabal (SP).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE UM COMPOSTO PRODUZIDO A PARTIR DE RESÍDUOS ANIMAIS E VEGETAIS

AUTORA: SONIA VILLAMIZAR CANCELADO

ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. JANAINA CONRADO LYRA DA FONSECA
Reitoria / São Paulo/SP

Data da realização: 21 de fevereiro de 2014.

“El primer paso de la ignorancia es presumir de saber”

Baltazar Gracián

A todos mis seres queridos, especialmente

.....A mi amadísimo esposo Juan Carlos Caicedo, quien ha sido esencia, impulso y pilar principal para la culminación de este propósito y de mi vida, quien con su apoyo constante y amor incondicional ha sido mi mejor amigo, mi compañero inseparable, mi consejero, mi cómplice... la fuente de sabiduría y calma en todo momento.

.....A mi madre María Agripina por toda su bondad y sacrificios, quien gracias a su sabiduría influyó en mi la madurez para lograr todos los objetivos en la vida.

(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves, minha orientadora, pela oportunidade cedida justo na hora certa, proporcionando me desenvolvimento pessoal e profissional, pela confiança, dedicação e ensinamentos cruciais para minha formação.

À todas as pessoas que fizeram parte direta o indireta na realização deste projeto cuja lista seria interminável, pois cada pessoa que conheci no transcorrer de este proposito gerou seu aporte.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

“Quando a gratidão é tão absoluta sobram as palavras”

Álvaro Mutis

GRATITUDE TOTAL A TODAS E TODOS!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
I INTRODUÇÃO	1
II REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1 O processo de compostagem.....	7
2.2. Parâmetros do processo de compostagem	7
2.2.1 Temperatura	7
2.2.2 Aeração	9
2.2.3 Umidade	9
2.2.4 pH.....	10
2.2.5 Relação Carbono e Nitrogênio	11
2.2.6 Microbiologia da compostagem	12
2.2.6.1 Comportamento dos microrganismos durante as dife- rentes fase do compostagem	14
2.2.6.2 Microrganismos considerados patógenos.....	15
2.2.6.3 Microrganismos patogênicos de alta importância para a saúde pública e de presença inadmissível no composto maduro.....	16
2.2.6.4 Papel das plantas no ciclo de vida dos agentes pato- gênico humanos.....	18
2.2.6.5 Fungos fitopatogênicos	20
2.2.6.6 Efeito do compostagem na destruição dos patógenos....	24
2.2.7 Estabilidade, maturidade e fitotoxicidade do composto.....	26
2.3 Aspectos legais.....	28

III OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos	30
IV MATERIAL E METODOS	31
4.1 Área de Estudo	31
4.2 Amostragem	31
4.3 Análises químicas.....	32
4.4 Avaliação de maturidade de composto.....	32
4.5 Determinação de fungos fitopatogênicos.....	33
4.6 Detecção de <i>E.coli</i> produtoras de STEC, EPEC, EHEC e ente- ropatogênicas humanas.....	33
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Análises Químicas	37
5.2 Avaliação da maturidade do composto	40
5.3 Determinação de fungos fitopatogênicos.....	42
5.4 Detecção de <i>E. coli</i> produtoras de STEC e EPEC e contagem de enterobactérias	45
VI. CONCLUSÕES	50
VII. REFERÊNCIAS	52

AValiação DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE UM COMPOSTO PRODUZIDO A PARTIR DE RESÍDUOS ANIMAIS E VEGETAIS

RESUMO - O processo de compostagem de resíduos animais com mortalidade cotidiana ou de surtos tem sido identificado como o método ideal para a disposição final de carcaças, entretanto o risco potencial de transmissão de microrganismos patogênicos limita severamente seu uso. Neste estudo foi avaliada a qualidade química e segurança microbiológica de um composto produzido com carcaças animais e resíduos vegetais, em uma unidade experimental de compostagem na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil. Em uma amostra do composto maduro, foi determinada a presença das bactérias patogênicas *E. coli* (STEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) mediante uso de técnicas moleculares; número de coliformes, *Salmonella* spp. e a existência dos fungos fitopatogênicos, segundo instrução normativa SDA/MAPA # 27 de 2006. A avaliação microbiológica e determinação de número de células foi feita usando meios de cultura seletivos e diferenciais. A presença de STEC, EPEC, EHEC, *Salmonella* spp. e fungos fitopatogênicos foram negativos. Os níveis de coliformes foram de 1160 UFC/g. O índice de germinação (IG) que surge da germinação relativa e da alongação de radículas esteve acima 100%, indicando que o composto contém uma baixa concentração ou não contém substâncias fitotóxicas. As determinações químicas obtidas apresentaram valores inferiores aos limites definidos pelas diretrizes brasileiras MAPA-SDA 25/09, CONAMA 375/06, e CETESB 195/05. Os resultados mostram que o método de compostagem de carcaças é eficaz para reduzir os microrganismos patogênicos. Entretanto para que o produto possa ser aplicado sobre as culturas usadas para consumo humano e animal, devem ser realizados testes que avaliem a presença de agentes patogênicos virais, tais como vírus da gripe aviária e Newcastle, e de bactérias formadoras de endósporos como *Bacillus anthracis*. E não devem ser incluídas carcaças de animais com doenças neurológicas ou com suspeitas das mesmas.

Palavras chaves: compostagem, carcaças, biossegurança STEC, EPEC, EHEC

MICROBIOLOGICAL QUALITY ASSESSMENT OF A COMPOST PRODUCED FROM ANIMAL WASTE AND VEGETABLES

ABSTRACT - Daily and outbreaks mortality composting have been identified as the best method for final disposal of carcasses, but the potential risk of pathogens transmission seriously limits its use. In this study we assessed the microbiological quality and biosafety of a compost produced in experimental unit composting daily mortality at the university in the state of Sao Paulo, Brazil. Mature compost sample was evaluated to determine the presence of pathogenic bacteria *E. coli* (STEC) *E. coli* (EPEC) and *E. coli* (EHEC) using molecular techniques, the presence and counting of coliforms and *Salmonella* sp. and several soilborne phytopathogenic fungi was also estimated, the evaluation was conducted using selective and differential microbiological culture media. The presence of STEC, EPEC, *Salmonella* and phytopathogenic fungi were negative. Coliform levels were 1160 UFC/kg. The results show that daily mortality composting method is effective to reduce pathogenic microorganisms, but so the product can be applied on crops or plants such as vegetables that are for direct human consumption, additional tests must be performed to assess the presence of viral pathogens such as viruses avian influenza and Newcastle, endospores forming bacteria like *Bacillus anthracis*, should not be included dead animals by neurological diseases confirmed or probable.

Key words: Compost, Carcass, Biosafety STEC, EPEC, EHEC

I. INTRODUÇÃO

A partir da década de 30 devido ao modelo de produção e consumo, a sociedade gera uma grande variedade de resíduos de diversas origens biodegradáveis ou não, muitas economias foram baseadas no modelo de vida do consumo, onde seu *slogan* é "produzir mais e consumir mais." Propiciando como resultado o acrescentamento do consumo de recursos, o que geram grandes quantidades de resíduos, um problema ambiental de gravidade, que é cada vez mais complexo e em incremento (CAMPITELLI, 2010). O aumento progressivo no volume de resíduos biodegradáveis e a quantidade de matéria orgânica que é descartada acarreta um grave problema para a conservação e preservação do meio ambiente, devido à poluição e dificuldades de saneamento que origina a sua disposição final.

Os resíduos são materiais gerados nas atividades de produção e consumo que não conseguiram no contexto de produção, nenhum valor comercial, pela falta de tecnologia apropriada para seu aproveitamento, ou pela ausência de um mercado para absorver os produtos recuperados (SEOANEZ, 2000).

Globalmente, a legislação atual tende a eliminar ou minimizar os riscos para a saúde dos habitantes e envolve uma melhoria substancial na gestão de resíduos (WOODARD et al., 2004). No paradigma atual da gestão de resíduos, cujas principais características são abrangência a sustentabilidade, tanto a recuperação como a reciclagem são opções para desviar uma fração de resíduos dos aterros e lixões (ROSAL et al., 2007; HUERTA et al., 2008). Assim, a disposição final tornou-se um grande problema na gestão dos resíduos sólidos, devido à diminuição da disponibilidade de locais para aterros e o aumentando de regulamentos ambientais no mundo (BENCH et al., 2005; ROSAL et al., 2007; MARTÍNEZ et al., 2010).

Entre os diferentes métodos de disposição final de resíduos para fins agrícolas destaca-se sua conversão em composto, ciclagem biológica de nutrientes indispensável para a vida, mediado por microrganismos. Processo de gestão sustentável dos resíduos que respeita o ciclo da conservação da matéria e possibilita

o aproveitamento dos nutrientes presentes. Dentro desse aspecto destaca-se o processo de compostagem. Esta técnica é extremamente antiga e seus princípios básicos têm sido apreciados e utilizados ao longo dos séculos, embora em diferentes graus, dependendo da situação econômica e social do tempo (MISHRA et al., 2003).

Com relação aos resíduos agrícolas, pode-se considerar que a compostagem é uma alternativa importante para a sua disposição final. Essa técnica pode ser definida como um processo de decomposição microbiana acelerada da matéria orgânica em condições aeróbias dos materiais e sob condições controladas; isso realizado num período de tempo ajustado. Durante esse processo ocorre o desenvolvimento de temperaturas termofílicas como resultado do calor produzido biologicamente, gerando entre outros produtos matéria orgânica estabilizada (CAMPITELLI, 2010; ZUCCONI e BERTOLDI, 1987). Além disso, a compostagem permite obter um produto chamado de composto, com grande valor agrícola, que pode ser utilizado como fonte de nutrientes e como um condicionador do solo para conservar a sua umidade, reduzir a erosão e melhorar o escoamento superficial (CASTALDI et al., 2008; HOITINK, 2000). Conjuntamente o composto orgânico adiciona carbono ao solo, depois da aplicação do composto a parte do carbono que não é mineralizado, é retido no solo onde foi depositado, desta forma a fração de carbono fica preso no solo por longos períodos. Além disso, indiretamente o composto orgânico também evita o uso de produtos que requerem alto custo energético para sua fabricação e que, portanto gerando emissões de CO₂. Desta forma o composto indiretamente sequestra o carbono da atmosfera e reduz os gases de efeito estufa, ademais é altamente eficaz na redução de microrganismos patógenos (EPSTEIN, 1997).

A presença de substratos orgânicos mistos é uma particularidade da compostagem. Mais especificamente de acordo com o seu significado etimológico, a compostagem do Latim *compositum* que significa mistura, refere-se a um processo de biodegradação de uma mistura de substratos realizados por uma comunidade microbiana formada por várias populações, em condições aeróbias e em estado

sólido. Transformação microbiana de substratos puros ocorre sob o nome de fermentação ou bioxidação, mas não ocorre na compostagem (EPSTEIN, 2011).

Diversos resíduos agropecuários têm sido compostados desde o início do século XX em grande escala, entretanto a compostagem de carcaças começou na indústria avícola durante o final dos anos 80, quando galinhas mortas foram totalmente biodegradadas em apenas 30 dias (MURPHY e HANDWERKE, 1988). Essa técnica foi usada com o principal objetivo de se evitar a propagação de doenças infectocontagiosas e proteger o ar, a água e a qualidade do solo. Na década 90, os produtores de peru (gênero *Meleagris*) aproveitaram o sucesso para a compostagem de carcaças maiores. Uma vez que este processo era uma técnica relativamente simples, ele foi rapidamente adotado pela indústria avícola (DOUGHERTY, 1999).

Atualmente a indústria pecuária precisa de uma maneira apropriada, ambientalmente aceitável e com biossegurança para a eliminação de carcaças. Geralmente nos aterros sanitários não aceitam carcaças, porquanto os pecuaristas encontram em muitos casos sem serviços de eliminação, principalmente quando existe a necessidade de altas taxas de eliminação. Por outro lado as entidades ambientais temem que com a situação atual de eliminação, os agricultores e pecuaristas possam causar sérios problemas ambientais com a destinação inadequada de carcaças (CORNELL UNIVERSITY, 2008).

A compostagem de carcaças define-se como o enterramento temporário do cadáver de animal na superfície do solo, num montículo de material que fornece carbono suplementar permitindo a decomposição por microrganismo. O aquecimento da pilha decorrente do metabolismo microbiológico reduz a maioria dos patógenos e digere os tecidos em condições predominantemente aeróbicas, o carbono suplementar absorve fluidos corporais e atua como um biofiltro para evitar o escape de odores (KABALSI et al., 2005). Este processo tem como vantagens: reduzir significativamente maioria dos patógenos; poder ser feito em qualquer época do ano; facilidade na execução do processo, pois o equipamento para o processo esta disponível na maioria das fazendas; ser relativamente livre de odor; possibilitar que

todos os tamanhos de animais possam ser compostados e ser de baixo custo. O material adequadamente transformado por compostagem possibilita a destruição de organismos patogênicos, vírus, sementes de ervas daninhas e nematóides (MISRA et al., 2003); o processo é ambientalmente seguro e gera um importante condicionador do solo que pode ser usado em várias culturas.

Os estercos e as carcaças são fontes valiosas de fertilizantes frequentemente usados como matéria prima no processo de compostagem, mas microrganismos patogênicos ou agentes zoonóticos podem estar presentes nessa matéria-prima ou no próprio composto, portanto a aplicação da compostagem necessita de controle para que não represente um risco para a saúde pública ou veterinária e não cause contaminação do ambiente natural.

A técnica de compostagem foi estruturada para reduzir a quantidade de microrganismos patogênicos, onde a temperatura é considerada um fator determinante na inativação dos patógenos que é complementada pela atividade microbiana antagônica. No entanto, dados quantitativos sobre as taxas de inativação microbiana e a influência da temperatura são limitados e controversos (NETH et al., 1989; SINGH et al., 2011). Mas apenas uma pequena fração das espécies microbianas autóctones do composto são artificialmente cultiváveis (TORSVIK, 1980), conseqüentemente é interessante coletar o material genético presente no composto, usando abordagens independentes de cultura para se estudar os microrganismos que estão nesse material.

A fim de garantir um produto de alta qualidade e seguro para todos os usos, no início da década 90 entidades como o Conselho Canadense de Ministérios de Ambiente (CCME), a Secretaria de normalização de Québec (BNQ) e a Agência Canadense de Inspeção de Alimentos (ACIA) estabeleceram um comitê para desenvolver as diretrizes de qualidade para o composto que é produzido, vendido ou doado. Igualmente no Brasil foram desenvolvidas normas contendo limites máximos permitidos para composto orgânico, biofertilizantes e corretivos do solo, entretanto

esse tipo de composto produzido a partir de carcaças não tem normatividade em que se enquadre.

A Univ. Estadual Paulista UNESP / FCAV produz anualmente entorno de 180 toneladas de resíduos animais (carcaças) por ano. Esses resíduos são produtos das atividades de ensino e pesquisa dos hospitais veterinários e outros departamentos da Universidade (FONSECA et al., 2013). Sendo estes resíduos materiais potencialmente adequados ao processo de compostagem e considerando-se a necessidade de descarte adequado, a Universidade teve a iniciativa de construir uma unidade piloto de compostagem com tais resíduos animais e vegetais sendo que, o composto maduro foi utilizado como material de partida desta pesquisa.

Neste estudo foram monitorados microrganismos patogênicos de importância em saúde pública, de gravidade na agricultura e elementos químicos de interesse na agrícola presentes no composto, conforme os parâmetros das normas canadenses e brasileiras para composto e as normas brasileiras para a avaliação de uso agrícola de lodos de esgoto e qualidade de solo.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O processo de compostagem

Compostagem imita o processo natural de decomposição (HAIGHT, 2001) de forma acelerada. Este processo requer o aporte de matéria orgânica, minerais, água e microrganismos. O material orgânico é processado em uma pilha ou leiras e libera calor, água e CO₂, em forma dependente de oxigênio.

O processo de compostagem é caracterizado por aumentos e diminuições de temperatura onde podem ser diferenciadas pelo menos duas fases. A primeira fase chamada de decomposição conduzindo um processo exotérmico onde moléculas complexas são degradadas em moléculas orgânicas e inorgânicas simples pela atividade biológica. A fase de decomposição consiste em dois estágios: o mesofílico com temperaturas entorno de 37° C, e o termofílico com temperaturas chegando até 70° C. A segunda fase é a de maturação também é constituída por duas etapas, uma de resfriamento, com temperaturas que variam desde 40° C até à temperatura ambiente, e uma de estabilização, caracterizado por baixa atividade microbiana (SOLIVA, 2001; COOPERBAND, 2002; HAIGHT, 2000).

O processo da compostagem é baseado na atuação de diversos microrganismos aeróbios (HAUG, 1993), que atuam de maneira sucessiva sobre o material orgânico de partida, dependendo da influência de fatores como temperatura, umidade, pH, areação e relação Carbono / Nitrogênio (C/N) principalmente. Estes fatores devem ser controlados para assegurar a produção de temperaturas elevadas, redução do volume e peso dos resíduos, e crescimento microbiano apropriado, portanto, resultando numa adequada mineralização da matéria orgânica (CRONJE et al., 2003; NAKASAKI, 2005).

2.2 Parâmetros do processo de compostagem

Assumindo-se que num processo de compostagem os responsáveis pela transformação são os microrganismos, todos os fatores que podem restringir o seu desenvolvimento também vai limitar o próprio processo. Para conseguir esta transformação sob condições controladas é necessário certos requisitos, que são nada menos que os indispensáveis para os microrganismos desenvolverem-se.

2.2.1 Temperatura

As alterações de temperatura são o resultado da atividade microbiana, as temperaturas ascendem desde a ambiente até mesofílicas e posteriormente para termofílicas. Durante estas oscilações de temperatura, a população microbiana muda, o grupo que foi favorecido por uma determinada temperatura decomporá os resíduos de matéria orgânica, tendo este como fonte de energia e como resultado, produzindo calor. Estas alterações são muito complexas, uma vez que permitem que os diferentes microrganismos consigam metabolizar os vários componentes do material de partida (TIQUIA, 2005).

A temperatura é muito importante para controlar patógenos assim como para destruir as sementes de ervas daninhas. À medida que o processo avança e os nutrientes disponíveis para os microrganismos são consumidos ou metabolizados, a temperatura desce e em algum momento volta a estar próxima da temperatura ambiente.

A taxa de produção de calor é proporcional à matéria orgânica disponível para consumo microbiano. A diminuição da temperatura até uma temperatura próxima do ambiente é uma indicação de que o processo está quase completo, e que o material, provavelmente é estável e maduro (EPSTEIN,2011).

Tem havido alguns debates sobre a temperatura ideal para a decomposição da matéria orgânica. Uma razão para esta controvérsia é que os diversos materiais de

partida se decomponham mais rapidamente a temperaturas diferentes. Mais a maioria dos dados da literatura indica que a temperatura ótima está entre 50 e 60° C.

A temperatura de decomposição ideal poderia ser dada em função da captação de oxigênio que mostra o comportamento da atividade microbiana, a maior taxa de consumo de oxigênio deveria indicar a temperatura mais regulada de decomposição. No entanto, há ocasiões em que é preciso manipular o processo de compostagem para atingir determinados alvos para conseguir ótima decomposição. Este é o caso em que é preciso manter as temperaturas superiores a 55° C, durante vários dias, a fim de destruir patógenos.

A manutenção de elevadas temperaturas assegura material sanitizado, mas pode haver problemas que inibem a atividade da maior parte dos microrganismos, se elas forem muito elevadas. Portanto, é necessário equilibrar uma máxima higiene com biodegradação. Para isto deve-se considerar que a maior diversidade microbiana é alcançada entre 35 e 40° C, a biodegradação máxima entre 45 e 55° C e a sanitização entorno dos 55° C (SOLIVA, 2001).

2.2.2 Aeração

A compostagem é um processo aeróbio e conseqüentemente requer oxigênio. O oxigênio é fornecido por meio de aeração e o processo de aeração é uma função do sistema. Nas leiras de compostagem o fornecimento do oxigênio é dado através de: técnica de viragem e por convecção, empilhas aeradas estáticas, leitos agitados, e outros sistemas o oxigênio é proporcionado por meio de sopradores. A aeração também pode ocorrer naturalmente por refrigeração passiva quando a mistura tem uma porosidade e uma estrutura que favorece a troca de gases por fenômenos físicos como a difusão, a evaporação (EPSTEIN,2011).

Para que o oxigênio alcance a população microbiana é preciso que exista porosidade suficiente através da matriz. A porosidade é dependente da matéria prima, de seu teor de umidade e de tamanho de partícula. O teor de oxigênio do ar

dependendo da matriz utilizada nunca deverá permanecer abaixo de o intervalo dentre 5 - 7 %. O oxigênio consumido pelos microrganismos durante a degradação do material tem que ser renovado porque é essencial para manter condições aeróbicas (EKINCI et al., 2004).

Segundo Haug (1993) as funções básicas da aeração são as seguintes:

- Beneficiar a regulação do excesso de umidade por evaporação,
- Fornecer o oxigênio necessário para a atividade dos microrganismos aeróbios,
- Conservar a temperatura adequada.

2.2.3 Umidade

O teor de água do material a ser compostado também é um parâmetro importante uma vez que os microrganismos só podem utilizar as moléculas orgânicas que estão dissolvidas em água. Além de que a água também promove a migração e proliferação microbiana.

A umidade pode ser um fator limitante no processo de compostagem, se a umidade estiver baixa, o processo de compostagem desacelera até parar. Geralmente, a taxa de atividade microbiana começa a diminuir a partir de 40 % de umidade e com níveis inferiores a 20 % a atividade biológica essencial é praticamente cessada. Não obstante quando o conteúdo de umidade é alto, superior a 60 % e acompanhado de escasso espaço poroso, ocorre diminuição na transferência de oxigênio, sendo insuficiente na demanda metabólica e, por conseguinte reduzindo atividade microbiana aeróbia. Nesse último caso pode ocorrer o aparecimento de odores desagradáveis, a produção de lixiviados e a perda de nutrientes.

O intervalo de umidade ótimo situa-se entre 50 - 55 %, embora este intervalo possa variar dependendo da natureza do material, no entanto, é também importante a forma de processamento. É importante destacar que antes de ser avaliado o teor de umidade final no composto, a massa deverá estar reduzida aproximadamente a 45 %

do seu volume inicial para que seja refletido eficientemente o valor medido (MORENO et al., 2008; HAUG, 1993; EPSTEIN, 2011).

Dado que o processo de compostagem é um método de secagem, a perda de umidade durante o procedimento está relacionada com o tipo de tecnologia empregada, da temperatura, e das condições ambientais aplicadas (EKINCI et al., 2004).

2.2.4 pH

O pH é um parâmetro que determina a presença de microrganismos, já que os valores extremos são prejudiciais para determinados grupos. O processo de desenvolvimento e crescimento das populações de microrganismos que realizam a degradação da matéria orgânica, além de ser influenciado pela temperatura e o tempo, dependem de reações químicas e da taxa em que estas reações ocorrem. O pH tem uma influência direta sobre a compostagem, devido à sua ação sobre a dinâmica dos processos microbianos dos numerosos microrganismos envolvidos (COCHRAN, 2005; CARNEY, 2006).

A evolução da compostagem pode ser avaliada pela medida do pH, através da utilização deste parâmetro é possível obter uma medida indireta do controle de aeração na mistura, pois em condições anaeróbicas são originados ácidos orgânicos de cadeia curta como produto metabólico, acidificando o meio e causando o seu declínio. Um pH extremo não é um impedimento para o desenvolvimento desta técnica, mas se para a cinética das reações envolvidas no processo, retardando a inicialização e a velocidade das reações (SOLIVA, 2001).

De acordo com a literatura, as alterações de pH na compostagem ocorre em três fases: durante a fase mesofílica inicial se observa uma diminuição devido à ação dos microrganismos na decomposição de matéria orgânica mais lábil e liberação de ácidos orgânicos (MORENO et al., 2008); em uma segunda fase ocorre a alcalinização progressiva do meio, devido à perda dos ácidos orgânicos e à geração

de amoníaco a partir de transformação de proteínas (SANCHEZ-MONEDERO, 2001); em uma terceira fase, o pH tende a neutralidade, devido à formação de substâncias húmicas as quais tem propriedades tamponantes (MORENO, et al., 2008).

O pH do sistema de compostagem deve estar no intervalo de 6 - 8, pois a maioria dos microrganismos têm uma atividade e crescimento máximo dentro destes valores (MANURE COMPOSTING MANUAL, 2013).

2.2.5 Relação Carbono e Nitrogênio (C/N)

Os dois nutrientes mais importantes para a atividade microbiana e crescimento, que afetam o processo de compostagem são carbono e nitrogênio, porquanto que os microrganismos de uma pilha de compostagem empregam carbono para a produção de energia e nitrogênio para a síntese proteica. O parâmetro que mede esta informação é chamado de relação Carbono / Nitrogênio (C/N).

Considera-se que uma relação ótima C/N num processo de compostagem permanece entre 25:1 a 35:1. Embora a proporção ideal normalmente fique em torno dos 27:1 a 30:1 o processo de compostagem é eficaz dentro do quociente de 22:1 a 40:1. Uma proporção elevada de C/N irá retardar o processo de compostagem, além de liberar amônia. Se os produtos submetidos à compostagem têm uma relação C/N baixa (inferior a 18:1-19:1) esta ocorre mais rapidamente (ZHU, 2006). Nos resíduos com elevada relação C/N, mas com material orgânico pouco biodegradável, a relação C/N realmente disponível para os microrganismos é reduzida e o processo evoluirá rapidamente, entretanto atenderá apenas uma proporção da massa total do material de partida (MORENO et.al, 2008).

A quantidade necessária de carbono é consideravelmente mais elevada do que a de nitrogênio, uma vez que os microrganismos o utilizam como fonte de energia, e está presente no material celular em uma quantidade muito maior do que a de o nitrogênio, incorporado em moléculas orgânicas que desempenham funções vitais para células.

Todas as transformações microbianas de nitrogênio que ocorrem na natureza também podem ocorrer durante a compostagem. Na compostagem as fases mais importantes são assimilação, nitrificação e mineralização. Assimilação redutiva de nitrato e a subsequência de conversão de compostos de nitrogênio orgânico, no interior das células microbianas, são passos importantes no processo de compostagem, a fim de reduzir as perdas de nitrogênio no composto e no solo .

Fixação de nitrogênio e desnitrificação são eventos anaeróbios que podem ocorrer durante a compostagem, mas em taxas baixas. Na compostagem o conteúdo total de nitrogênio diminui durante o transcorrer do processo, principalmente por volatilização. No entanto, a relação C/N diminui durante o processo devido à perda ainda maior de compostos de carbono (principalmente na forma de CO₂). O conteúdo total de nitrogênio na matéria-prima também influencia a taxa de volatilização.

A mineralização de compostos orgânicos nitrogenados leva à produção de amônia livre, a qual deve ser imediatamente oxidada por bactérias nitrificantes, para não ser arrastada para o ambiente por volatilização; uma perda adicional de nitrogênio durante a compostagem pode ser causada por desnitrificação, um processo microbiano anaeróbico que reduz o nitrato a N₂. Este processo pode ocorrer apenas em nichos anaeróbicos, que estão sempre presentes na compostagem, mesmo que o material esteja bem oxigenado. Apesar destas perdas de nitrogênio, a recuperação ocorre no final do processo, devido à atividade de bactérias fixadoras de nitrogênio. Muitas espécies dos gêneros *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* foram isoladas durante a compostagem, principalmente associadas à fase mesofílica (DE BERTOLDI et al., 1982).

2.2.6 Microbiologia da compostagem

A compostagem é um método que pode ser usado para tratar eficientemente esterco e cadáveres. É definido como um método em que a degradação biológica dos resíduos orgânicos sob condições aeróbias e que resulta num produto final similar

ao húmus contendo microrganismos, e compostos não biodegradáveis orgânicos e inorgânicos que são resistentes à biodegradação rápida. Os resíduos compostados adequadamente são eficazes na destruição de organismos patogênicos, vírus, bactérias, sementes de plantas daninhas e nematoides (MISRA et al., 2003).

O estudo da microbiologia da compostagem (ICHIDA et al., 2001) envolve três conjuntos definidos:

- A microbiologia de auto-aquecimento da matéria orgânica úmida, este fenômeno muito cedo levou ao conceito de geração de calor, como parte do metabolismo microbiano. Esta foi extensivamente estudada primeiro nos solos de produção agrícola, por exemplo, feno e grãos.

- A microbiologia de compostagem é de alguma forma relacionada com a microbiologia do solo e decomposição, a fertilidade do solo, o volume de matéria orgânica na natureza e a formação de substâncias húmicas.

- A microbiologia para o controle de agentes patogênicos em resíduos a serem compostados; da eliminação de agentes patogênicos das unidades de compostagem e do potencial risco de transmitir agentes causadores de doenças em plantas e animais; e inversamente da capacidade do composto de atuar controlando agentes patogênicos a plantas presentes no solo.

As bactérias e os fungos estão presentes e ativos em um processo de compostagem típico (GRAY, 1971). Estudos revelaram que os grupos principais de bactérias no início do processo de compostagem são as bactérias mesófilas que produzem ácidos orgânicos, tais como *Lactobacillus* spp. e *Acetobacter* spp. (GALUKE, 1954). Mais tarde, na fase termofílica, bactérias Gram-positivas tais como o *Bacillus* spp. e *Actinobacteria*, podem tornar-se dominante (DE BERTOLLI et al., 1980). No entanto, tem sido observado que o processo de compostagem mais eficaz é conseguido por comunidades mistas de bactérias e fungos.

2.2.6.1 Comportamento dos microrganismos durante as diferentes fases da compostagem

As variações de temperatura são o reflexo das atividades de populações microbianas sucessivas realizando a degradação da matéria orgânica mais recalcitrante. Através da Figura 1 podemos ver o típico comportamento da temperatura e sua correlação com os microrganismos em um processo de compostagem.

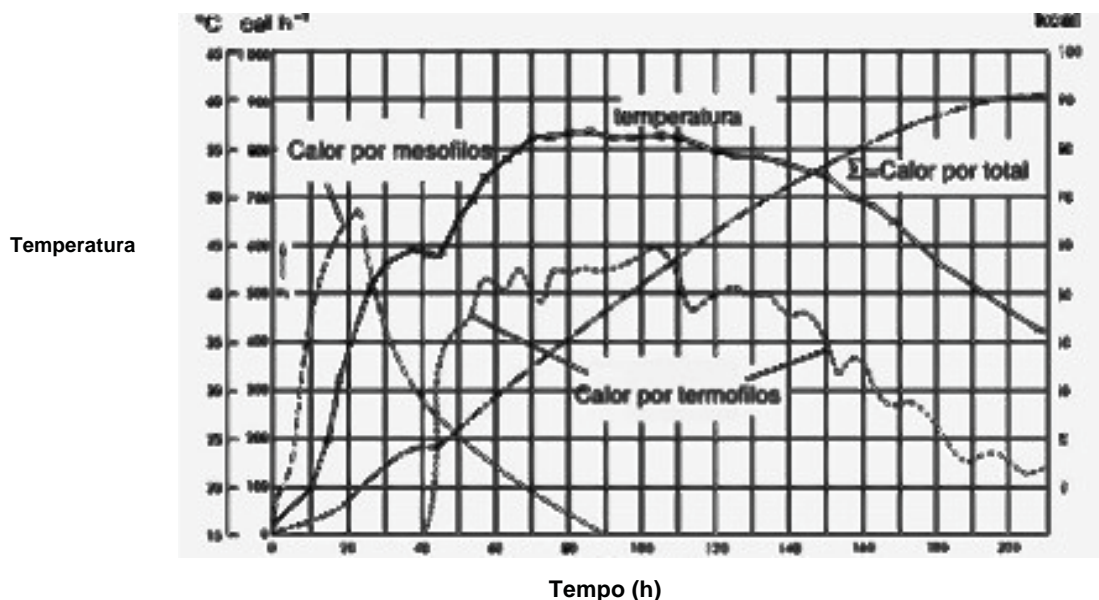


Figura 1. Curva correlacionando temperatura e grupos de microrganismos durante a evolução do processo de compostagem (Adaptado de Morgan, J.X. 2003)

- Fase mesofílica:

Durante a primeira fase uma população diversa de bactérias mesófilas e fungos prolifera degradando principalmente os nutrientes disponíveis e elevando a temperatura para aproximadamente 45° C. Neste ponto suas atividades cessam as células vegetativas e hifas morrem e eventualmente sofrem lise, e apenas esporos resistentes ao calor sobrevivem.

- Fase termofílica:

Após um período de latência curto (nem sempre perceptível), ocorre uma segunda mais ou menos íngreme subida da temperatura. Esta segunda fase é caracterizada pelo desenvolvimento de uma população microbiana termofílica que compreende várias espécies bacterianas e fungos. A temperatura ótima destes microrganismos é entre 50 e 65 ° C, as suas atividades terminam a 70 - 80 ° C.

- Fase estacionaria:

A terceira fase pode ser considerada como um período estacionário sem significativas mudanças de temperatura, com a produção de calor microbiano equivalente à dissipação de calor com tendência ao equilíbrio. Onde a população microbiana ainda é composta de bactérias termofílicas e fungos.

- Fase de maturação:

A quarta fase é caracterizada por um declínio gradual da temperatura, tendendo a ser equivalente à temperatura ambiente. Os microrganismos mesófilos que sobreviveram às altas temperaturas e os invasores do material de arrefecimento continuam o trabalho dos termofílicos prolongando o processo de degradação, na medida em que se designa.

2.2.6.2 Microrganismos considerados patogênicos

A maior parte da matéria-prima a ser compostada contém patógenos. É um equívoco considerar que matérias-primas, tais como: resíduos de jardim não contenham agentes patogênicos, sendo também um erro não fazer cumprir os regulamentos de tempo e temperatura de forma obrigatória aos produtores de este tipo de composto. Os patógenos são uma grande preocupação para os cidadãos que residem perto de instalações de compostagem, bem como uma preocupação para a saúde dos trabalhadores. Portanto, as instalações onde ocorre esse processo devem ser projetadas para minimizar a dispersão de patógenos. A chave para a comercialização do composto é a produção de um produto inócuo. Há uma

necessidade para o público ter certeza de que o produto é seguro e não irá prejudicar a sua saúde(EPSTEIN ,1997).

2.2.6.3 Microrganismos patogênicos de grande importância para a saúde pública e de presença inadmissível em compostos maduros

- *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella*, é um membro da família Enterobacteriaceae. *Salmonella* são organismos complexos que produzem uma variedade de fatores de virulência, incluindo endotoxinas, citotoxinas, e enterotoxinas. As toxinas produzidas por *S. typhimurium* são as verotoxinas e as enterotoxinas. As manifestações clínicas são gastroenterite, a septicemia, ou uma febre entérica, tais como a febre tifóide (DEBBIE, 2009). O organismo é bastante resistente e pode sobreviver no ambiente por longos períodos de tempo (GUAN e HOLLEY, 2003). *Salmonella* spp. foi identificada em fezes de gado, esterco de galinha, dejetos de suínos e cavalos (MURRAY, 1998). Jones (1980) relatou que o gado saudável pode excretar ao redor de 107 UFC de *Salmonella* por grama de fezes. *S. enteritidis* foi encontrada no estrume de bandos de aves, e os galpões com altos níveis de contaminação de estrume eram dez vezes mais propensos a produzir ovos contaminados. Os cavalos diarréicos apresentam o maior risco de *Salmonella* spp. gerando contaminação do meio ambiente (MURRAY, 1998). A principal fonte de infecção de *S. entérica* tem sido associada com a ingestão de alimentos, como brotos de alfafa, suco de laranja não pasteurizado, e tomates contaminados (DEBBIE, 2009).

- *Escherichia coli* patogênicas (EHEC, EPEC, STEC)

E. coli é classificada dentro da família de Enterobacteriaceae. Elas são bactérias em forma de bastonete, gram-negativas, e podem ser móveis por meio de flagelos. *E. coli* é um habitante normal do intestino grosso de animais de sangue quente. A *E. coli*

O157 produtora de shiga toxina: H7 foi identificado pela primeira vez como um agente patogênico humano em 1982. As shiga toxinas produzidas por este organismo podem resultar em três diferentes conjuntos de sintomas: colite hemorrágica (diarréia profusa e que se torna sangue), síndrome hemolítica urêmica (diarréia com sangue, seguido de insuficiência renal) e púrpura trombocitopênica (sintomas semelhantes aos da síndrome hemolítica urêmica com envolvimento do sistema nervoso central). A morte geralmente ocorre em pacientes com síndrome hemolítica urêmica e púrpura trombocitopênica (PELL, 1997). A dose infecciosa humana é acreditado para ser $\leq 10^2$ células / grama. *E. coli* O157:H7 foi documentada em gado de leite sendo implicada como o principal reservatório em animais jovens (GARBER et al., 1999). Kudva e seus colaboradores (1998) estudaram a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em estrume. Eles descobriram que os organismos sobreviveram por pelo menos cerca de cem dias no esterco bovino congelado. No caso de temperaturas de 4 a 70° C a sobrevivência variou de 40 dias a vinte e quatro horas.

No verão de 2006, a *E. coli* O157:H7 infectou mais de 120 pessoas a partir de o consumo de espinafre ensacado. Durante a última década, houve vinte casos notificados de infecção por este organismo a partir do consumo de alface, espinafre e outros vegetais folhosos. Estima-se pelos Centros de Controle de Doenças que mais de vinte mil casos ocorram anualmente. Várias causas de contaminação foram sugeridas. Estes incluem a água contaminada por fezes de animais, o uso de esterco compostado indevidamente, e aplicação direta de estrume. Houve vários pequenos e grandes surtos de veiculação hídrica por causa da contaminação da água por dejetos animais (DEBBIE, 2009).

- Outros Patógenos

Helicobacter pylori é uma bactéria gram-negativa microaerofílica espiral. Ela está associada com úlceras gástricas e duodenais e é considerada por ser um risco para o cancro gástrico. Ela causa dor abdominal, anorexia, náuseas e vômitos. Possivelmente, é a infecção bacteriana crônica mais comum nos humanos. Acredita-

se que quase 90% de algumas populações de países em via de desenvolvimento estão infectadas (CDC, 2014). A contaminação ocorre através da ingestão de alimentos e água contaminados (HASS et al., 1999).

Listeria monocytogenes é uma bactéria gram-negativa. Encontra-se no solo, silagem e em plantas. Isso faz com que a doença seja transmitida por alimentos e tem sido associada com leite cru, queijos, sorvetes, vegetais crus, carne crua, aves e peixe cru e defumado. Ela pode causar septicemia, meningite, encefalite, e infecções intra-uterinas ou cervicais. Ela não afeta pessoas saudáveis (MCLAUCHIN et al., 2004).

Cryptosporidium parvum é um protozoário parasita que causa uma doença aguda intestinal, traqueal, ou pulmonar em humanos. Ela provoca diarreia, vômito e perda de peso. Os animais de fazenda são as principais fontes de infecção. Bezerros infectados podem expelir 1 milhão de oocistos por dia durante os primeiros 12 dias de infecção e pode resultar em contaminação do solo e dos recursos hídricos, Os bovinos de corte adultos podem lançar entre 6000 oocistos por animal por dia (ATWILL et al., 2003).

2.2.6.4 Papel das plantas no ciclo de vida dos agentes patogênicos humanos.

Os inúmeros surtos de enterocolite provocados pelo consumo de vegetais frescos são testemunho de que *S. enterica* e *E. coli* patogênicas tem a capacidade de persistir e usar as plantas como vetores para depois lograr atingir as células alvo nos seres humanos (TEOARMINA et al., 1999). No entanto, *S. enterica* e *E. coli* patogênicas não são patógenos de plantas. Dois trabalhos prévios têm sugerido que as plantas mostram clorose ou vigor reduzido após a inoculação de *S. entérica* (KLERKS et al., 2007; SCHIKORA et al., 2008), mas o postulado de Koch não foi observado em nenhum deles.

Em geral, os agentes patogênicos bacterianos entéricos entram nos ambientes

agrícolas através de fezes de animais. As rotas de contaminação das culturas por fezes são a água, solo, compostagem e / ou sementes. A água pode entrar em contato direto com as culturas de duas maneiras a irrigação ou fertilizantes diluídos. Os mecanismos de disseminação bacteriana são semelhantes aos identificados para os fitopatógenos de plantas (Figura 2).

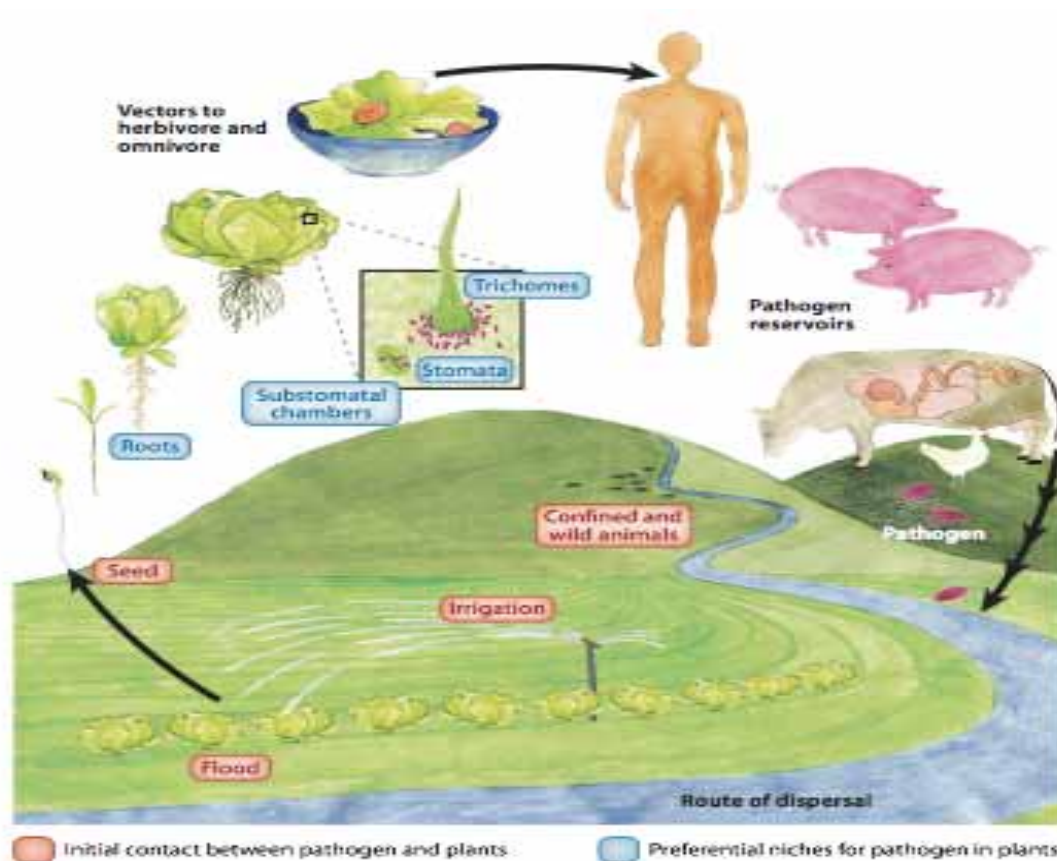


Figura 2. Esquema dos mecanismos de disseminação de doenças bacterianas por vegetais ao homem (Tomado de: Barak, Schroeder, Brenda, 2012).

Os patógenos apresentam uma sequência característica para a colonização nas plantas o primeiro passo da sequência é a atração: bactérias patogênicas humanas são capazes de perceber a presença de nutrientes disponíveis e usar isso

para se movimentar ativamente para as plantas com subsequente fixação e colonização. *S. enterica* é atraída para a rizosfera de alface por uma fonte de carbono tipo açúcar presente nos exsudatos radiculares (KLERKS et al., 2007), muitas bactérias proliferam na rizosfera das plantas pois aproveitam os nutrientes disponíveis do solo, essas bactérias podem alcançar a rizosfera e posteriormente colonizar a filosfera, além disso, podem-se multiplicar nas plantas oriundas de sementes germinadas em solos contaminados, sugerindo um caso de quimiotaxia diferencial para plantas específicas (BARAK et al., 2008).

A persistência de patógenos bacterianos entéricos humanos em campos agrícolas depende de numerosas características do solo, tais como a comunidade residente bacteriana, estrutura do solo e teor de argila. Adubos utilizados pelos agricultores incluem esterco e lixiviados de animais de fazenda ou resíduos da produção de laticínios. Sendo que a *E. coli* é uma bactéria copiotrófica, sua sobrevivência no solo é mais previsível, pois o solo contém uma proporção maior de bactérias oligotróficas na sua microbiota residente, em comparação com as bactérias copiotróficas (FRANZ et al., 2008).

Os mecanismos de sobrevivência anteriormente expostos permitem associar os agentes patogênicos em humanos na colonização de plantas. Patógenos inter-reinos são exemplares de pleno êxito em ambos os ambientes, medida pela capacidade de colonizar, replicar e disseminar entre os hospedeiros vegetais, vertebrados onívoros humanos e animais.

2.2.6.5 Fungos fitopatógenos

Na agricultura mundial os fungos fitopatogênicos causam doenças em diversas culturas, sendo responsáveis por grandes perdas. Desde o ponto de vista econômico, em termos de frequência de ocorrência e dos danos que podem causar é o grupo mais importante do mundo. Entorno de dois terços das doenças das plantas são causadas por fungos, dos quais se conhecem aproximadamente 10.000 espécies, sendo que, a maioria é saprófitos obrigatórios, e perto de 8.000 são conhecidos como

fitoparasitas. Eles provocam não só a perda econômica, mas também a perda de produção biológica (GONZÁLEZ, 1986; FAO, 2004).

O ciclo de vida dos fitopatógenos transcorre entre plantas hospedeiras e o solo, portanto, a sobrevivência e a patogenicidade do fungo dependem de condições ambientais (temperatura e umidade) e características intrínsecas das plantas (resistência) (AGRIOS, 1998). Dentro deste grupo os gêneros com maior relevância são: *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp. e *Sclerotinia* spp.

- *Fusarium* spp.: O gênero *Fusarium* é um grupo cosmopolita de espécies de fungos filamentosos que estão amplamente distribuídas no solo, capazes de colonizar as partes aéreas e subterrâneas de plantas e resíduos de plantas e outros substratos orgânicos (LOGRIECO et al., 2003).

Muitas espécies de *Fusarium* são consideradas importantes patógenos agrícolas sendo responsáveis pela podridão da raiz, murchamento e cancrios em uma grande variedade de culturas, tais como os cereais. Portanto, causando grandes perdas econômicas na agricultura e na indústria de processamento e transformação de alimentos para consumo humano e animal, devido à diminuição na qualidade. Além disso, algumas espécies deste gênero são capazes de produzir metabolitos secundários conhecidos pelo nome de micotoxinas, que causam doenças graves, agudas e crônicas em animais e em seres humanos através da ingestão dos produtos contaminados (PITT, 2000; GUARRO, 2000).

Nos últimos anos, algumas espécies deste gênero estão ganhando importância como patógenos oportunistas emergentes, capazes de causar infecções cardíacas (GUZMAN-COTTRILL et al., 2004), de pulmão (PAGANO et al., 2005), da pele (GARDNER et al. 2005) e inclusive os olhos (O'DONNELL et al., 2007) em pacientes imunocomprometidos. Este tipo de infecção está associado à elevada taxa de mortalidade em seres humanos, uma vez que eles apresentam uma elevada resistência a agentes antifúngicos (CASTON-OSORIO et al., 2008).

- *Rhizoctonia* spp.: As formas encontradas no gênero *Rhizoctonia* são consideradas como um conjunto heterogêneo de táxons de fungos filamentosos que não produzem esporos assexuais e compartilham uma série de características comuns em seus estados anamórficos. Os organismos pertencentes a este complexo de espécies são geralmente fungos do solo, principalmente associados com raízes e, geralmente patógenos, embora tenham havido relatos de um número de espécies saprófitas e simbióticas. Diversas formas de fungos deste gênero são distribuídos em todo o mundo, tanto em os solos agrícolas como em florestais, sendo incluído dentro dos patógenos mais relevantes em plantas, pois ocorre em culturas economicamente importantes, causando doenças foliares e podridão radicular.

Entre o gênero *Rhizoctonia* spp., a complexa espécie multinucleada *R.solani* tem sido estudada mais amplamente, por possuir uma ampla gama de hospedeiros de mais de 250 espécies de plantas e ser capaz de incitar a doença sob diversas condições ambientais. Este fungo é geralmente recuperado de solos no mundo todo, é considerado como um fitopatógenos muito agressivo, e causador de doença em uma grande variedade de culturas de importância agrônômicas, ornamentais e espécies florestais. (SNEH et al., 1991, GONZÁLEZGARCÍA et al., 2006).

- *Pythium* spp.: é um gênero de Oomycetes parasitas, classificado dentro da família *Pythiaceae*. Cada espécie pode infectar uma ampla gama de hospedeiros, em plantas propiciando doenças radiculares e gerando uma série de prejuízos em diversos sistemas de produção agrícola, conseguindo originar detrimento em culturas de cereais, bem como plantas ornamentais. Igualmente existem espécies patogênicas em animais especialmente em peixes ou crustáceos (OWEN-GOING, 2002).

Nas plantas o fungo invade o sistema vascular das raízes e é distribuído através dos vasos da planta, obstruindo-os e impedindo o acesso da seiva proveniente das raízes. Provocando flacidez e necrose das folhas, e ao longo do tempo terminam por colonizar toda a planta. Apesar da podridão da raiz ser causada por uma única espécie do fungo, frequentemente várias espécies são isolados a partir

de uma única planta (CHEN, 1999; DEEP, 1996). Espécies de *Pythium* podem viver como saprófitas ou parasitas, embora o papel como agente parasitário, muitas vezes dependa de fatores externos (ZHANG e YANG, 2000).

- *Phytophthora* spp.: O gênero *Phytophthora* compreende mais de 60 espécies, muito das quais são patógenos importantes em plantas (ERWIN e RIBEIRO, 1996). O gênero *Phytophthora* está atualmente classificado na divisão Oomycota, na ordem Peronosporal e família Phythiaceae. Ele se adapta a um intervalo de temperatura muito ampla, entre 6 e 33 °C, embora a maior atividade parasitária ocorra entre 18 e 24° C. É muito ativo em solos argilosos, muito úmidos ou com drenagem deficiente, onde produz grande quantidade de zoósporos, que facilmente penetram os tecidos, iniciando assim a doença. (CASTRO et al., 2012)

Espécies do gênero *Phytophthora* são fitopatógenos devastadores tanto em agroecossistemas como em ecossistemas naturais (CASTRO et al., 2012). O gênero *Phytophthora* é responsável por alguns das mais graves doenças em plantas (SCHENA e COOKE, 2006), como a podridão radicular da soja (TANG et al., 2011), a podridão da raiz de tomate (QUESADA e HAUSBECK, 2010), murchamento da pimenta (TRUONG et al., 2010), e da morte repentina do carvalho (MARTIN e TOOLEY, 2003). A maioria das espécies de *Phytophthora* são invasores primários de tecidos vegetais saudáveis com capacidade saprófita limitada.

Oósporos são considerados como o principal propágulo para a sobrevivência do gênero *Phytophthora*, sendo a germinação de oósporos influenciada pela idade, nutrição, temperatura e luz. Se as condições ambientais forem favoráveis, os oósporos germinam e desenvolvem micélio ou produzem esporos (WIDMER, 2010). Algumas espécies possuem hospedeiros específicos, entretanto outros têm uma ampla gama de hospedeiros e podem causar sintomas semelhantes ou diferentes, em muitos tipos de plantas hospedeiras.

- *Sclerotinia* spp.: é um gênero de fungos na família *Sclerotiniaceae*.

Doenças causadas por *Sclerotinia* spp., geralmente são conhecidas como "mofo branco", estas conseguem afetar centenas de espécies de plantas, incluindo muitas culturas de importância econômica. O mofo branco é facilmente identificado pela característica de micélio felpudo branco do patógeno, que cresce sobre as superfícies dos tecidos aéreos infectados. As hifas produzem enzimas e ácido oxálico, criando lesões alagadas de água, frequentemente com uma margem distinta. Sintomas secundários: como murchamento, branqueamento e trituração também podem ser observado em tecidos por cima do solo, incluindo talos, folhas, pecíolos e órgãos reprodutivos. Os patógenos são favorecidos por condições úmidas, frias, mas mostram surpreendentemente amplas distribuições ecológicas. Os ascósporos de *Sclerotinia* spp. infectam porções superiores de plantas conseguindo ocasionar doenças como pragas de flores, apodrecimento de tronco e do fruto (HAO et al., 2003; NIAMBERE et al., 2008).

Uma das espécies de maior relevância é *Sclerotinia sclerotiorum* que é um patógeno de origem do solo, agressivo e necrotrófico, está entre os patógenos não específicos, globais e devastadores das plantas (PURDY, 1979). Esse patógeno é capaz de atacar mais de 400 espécies de plantas, de 75 famílias, incluindo muitas culturas economicamente importantes, tais como leguminosas, oleaginosas e legumes, e com poucos relatos do patógeno em culturas de cereais importantes (BOLAND e HALL, 1994). Este patógeno é distribuído em todo o mundo, mas *S. sclerotiorum* é mais prevalente em regiões temperadas e subtropicais com estações frescas e úmidas (PURDY, 1979).

2.2.6.6 Efeito do compostagem na destruição dos patógenos

Os critérios de tempo e temperatura são mais importantes para a destruição eficaz do patógeno durante a compostagem. Um dos melhores exemplos dessa relação é a pasteurização do leite. Aquecer o leite cru de 60 a 63°C, durante vinte a trinta minutos resulta em pasteurização e destruição de organismos patogênicos.

Somando-se ao efeito da temperatura, durante a compostagem, amoníaco é libertado e esse composto é também um agente de desinfecção. Além disso, a presença de bactérias autóctones também podem contribuir para a redução do nível de agentes patogênicos durante a compostagem. Como foi indicado anteriormente, a desinfecção do produto é um dos principais objetivos de uma boa operação de compostagem. Para que o produto possua alta aceitação do público e ambientalmente correto ele deve ser seguro e de confortável aplicação.

O principal método de desinfecção do composto orgânico é a manutenção da temperatura por um tempo adequado. Walke (1975) monitorou a presença de *E. coli*, *S. eidleberg* e *Candida albicans* durante o processo de compostagem de misturas de resíduos de cascas. O composto inicial continha estes microrganismos a um nível de 106 microrganismos por grama de peso seco. Após 24 horas, os níveis dos micróbios por grama de peso seco, no material compostado eram: *E. coli* 11, *S. eidleberg* 130 e *Candida albicans* 620. E 36hs depois verificou-se que não permaneceu nenhum destes microrganismos. Grewal e colaboradores (2006) não detectaram *E. coli*, *Salmonella* e *Listeria* no estrume de gado bovino e de suínos, após de três dias de compostagem, a 55°C. Posteriormente no ano 2007 relataram que a compostagem termofílica destruiu *Listeria* e *Salmonella* em dejetos de suínos. Porquanto é altamente recomendado a compostagem de estrume destinado para a produção de hortaliças, a jardinagem residencial, ou uso como corretivo em solos com baixo potencial de drenagem.

O problema com as bactérias patogênicas é o potencial de repovoamento de um material (EPSTEIN, 1997) Não obstante, isto não ocorre com os vírus e os ovos de helmintos, eles não contaminam novamente o material tratado. Parasitas obrigatórios inativados em uma fase do processo de compostagem não conseguem voltar invadir esse material (HAUG, 1993). Para impedir o potencial nas bactérias de povoar novamente algum tipo de material, requeresse a remoção de sua fonte de alimento. O melhor método para minimizar este potencial é assegurar-se do que o composto está estabilizado. Atingir a estabilização do produto final é importante para

controlar recrescimento; ademais organismos autóctones são muito mais resistentes do que a maioria dos organismos patogênicos. Epstein e seus colaboradores (1997) discutiram o aspecto de estabilização e a sua medição; indicando que a estabilização é um termo que é frequentemente usado como sinônimo de maturidade.

A estabilização é uma função do processo e indica, na medida em que o processo é realizado, em que intensidade ocorre a decomposição. Enquanto que a maturidade é um índice químico e indica o potencial impacto do produto sobre a germinação e o crescimento das plantas.

A estabilização é conseguida por meio de cura apropriada. No processo, há uma diminuição da fonte de alimentação, mas também o restabelecimento da microflora autóctone (HAUG, 1993), condições desfavoráveis para o crescimento de patógenos.

A possibilidade de recontaminação por patógenos num produto curado deve ser evitada. Por isso em grandes operações os equipamentos estão separados e são utilizados especificamente para as diferentes atividades, havendo pouca probabilidade de que o equipamento seja utilizado para o tratamento da matéria-prima, bem como o produto final. Sem embargo em pequenas operações de compostagem não existe essa facilidade. Por isso, eles precisam desinfetar o equipamento entre as operações (EPSTEIN, 2011).

2.2.7 Estabilidade, maturidade e fitotoxicidade do composto

O composto que já não está passando por rápida decomposição e onde seus nutrientes estão fortemente ligados é denominado estável; composto instável, ao contrário, pode tanto liberar nutrientes no solo devido à decomposição adicional, ou pode tornar indisponível o nitrogênio do solo. O termo maduro se refere ao grau de fitotoxicidade de um composto, enquanto que o composto imaturo conterá mais inibidores de crescimento do que o composto maduro (INSAM e DE BERTOLDI, 2007).

A estabilidade é um estágio na decomposição da matéria orgânica em decorrência da atividade biológica. Ele é uma função do processo e está muitas vezes relacionada com o período de tempo em que o processo é realizado. Quanto mais estável o composto, menor ou mais lenta é a atividade biológica. Num produto estável, há menos possibilidades de odores desagradáveis e de reaquecimento. Quando o composto instável é aplicado ao solo, a população microbiana contida nele, vai aproveitar o nitrogênio do solo, que seria normalmente disponível para as plantas. Alguns dos índices de estabilidade mais conhecidos são:

- Teste respirométrico (O_2 , CO_2)
- Demanda de Oxigênio
- Teste de aquecimento

Maturidade é uma condição de química orgânica do composto que indica a presença ou ausência de ácidos orgânicos fitotóxicos. Isto também está relacionado com o processo. Enquanto os índices mais utilizados com maturidade se encontram os seguintes:

- Concentração de amônio
- Ácidos orgânicos voláteis
- Teste de germinação

Fitotoxicidade refere-se a qualquer substância, orgânica ou inorgânica, que é tóxica para as plantas. A fitotoxicidade pode não estar relacionada com o processo, mas pode indicar que um produto químico constituiu o material de partida foi incluída de outro modo no processo, podendo ser prejudicial para as plantas (EPSTEIN, 2011).

A análise tradicional do composto tem-se centrado em NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) e concentrações de micronutrientes, num esforço por reproduzir as análises de fertilizantes. O composto, no entanto, é muito mais complexa do que o fertilizante e o seu valor podem ser significativamente mais importante nas plantas, do que a sua contribuição mineral para o solo. Seu componente microbiológico determina

como o composto vai atuar como um inoculante no solo e inibidor de doenças de plantas (INSAM e DE BERTOLDI, 2007).

2.3 Aspectos legais

- Resolução CONAMA nº 420, de 28 de dezembro de 2009

“Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas.”

- Instrução normativa MAPA / SDA nº 25, de 23 de julho de 2009

“Normas sobre as especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos fertilizantes orgânicos simples, mistos, compostos, organominerais e biofertilizantes destinados à agricultura, na forma dos Anexos a presente Instrução Normativa.”

- Instrução Normativa SDA/MAPA nº 27, de 5 de junho de 2006 (BRASIL, 2013a)

“Os fertilizantes, corretivos, inoculantes e biofertilizantes, para serem produzidos, importados ou comercializados, deverão atender aos limites estabelecidos nos Anexos I, II, III, IV e V desta Instrução Normativa nº que se refere às concentrações máximas admitidas para agentes fitotóxicos, patogênicos ao homem, animais e plantas, metais pesados tóxicos, pragas e ervas daninhas.”

- Resolução CONAMA nº 375, de 29 de agosto de 2006 (BRASIL, 2013b).

“Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências.”

- Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME) 2005, Guidelines for Compost Quality

Em 1996, CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment) desenvolveu diretrizes para produtos de compostagem, num momento em que a

indústria de compostagem ainda era relativamente nova. Desde então, muitas indústrias e municípios têm implementado operações de compostagem em grande escala. A fim de reconhecer os avanços das novas tecnologias e da ciência no ano 2005, foi aperfeiçoada uma nova revisão de “Guidelines for Compost Quality”, com a finalidade de refletir o desenvolvimento e a evolução na área, para proporcionar melhor utilização dos recursos biológicos e para proteger o ambiente e a saúde humana.

- Decisão de diretoria CETESB nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005

“Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2005, em substituição aos Valores Orientadores de 2001, e dá outras providências.”

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a qualidade e a segurança microbiológica do composto produzido na FCAV/UNESP a partir de resíduos vegetais e animais.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar os conteúdos em termos de elementos químicos de relevância na agricultura.

3.2.2 Avaliar a maturidade do composto mediante provas de experimentação de germinação *in vitro*.

3.2.3 Determinar a presença dos fungos fitopatogênicos: *Phythium* spp., *Rizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp. e *Sclerotinia* spp.

3.2.4 Estabelecer a presença de bactérias enteropatogênicas e indicadoras de contaminação fecal no composto.

3.2.5 Determinar os pato-tipos de *Escherichia coli*, STEC, EPEC, EHEC através de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).

IV MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Localidade de estudo

O estudo foi realizado com amostras de compostagem da unidade experimental da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil, com coordenadas geográficas: latitude 21°14'48" S, longitude 48°16'44" W e altitude média de 557 m. Composto feito a partir de resíduos de poda de arvores, cascas de amendoim, carcaças de animais (cuja morte não foi provocada por doenças infecto contagiosas), resíduos produzidos nas atividades de ensino e pesquisa do Hospital Veterinário e outros departamentos do campus universitário.

4.2 Amostragem

O desenvolvimento do projeto foi realizado com o composto que possuía mais de 150 dias de retenção, havendo atingindo temperaturas superiores a 55° C durante seu processamento (FONSECA et al., 2013).

As amostras do composto foram coletadas das células de compostagem com capacidade de 400 L, em pontos diversos de acordo com o esquema da Figura 3, tomando de cada ponto selecionado, amostras a profundidades de 20 cm, 50 cm e 100 cm em duplicata, sob condições de esterilidade, a posteriori foram, combinadas e misturados para gerar uma amostra composta.

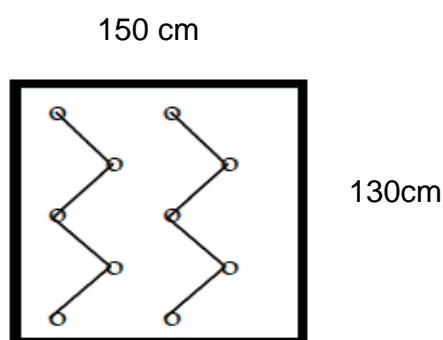


Figura 3. Esquema mostrando os locais dos pontos utilizados para a coleta do nas células de compostagem

4.3 Análises químicas

Os conteúdos dos elementos examinados foram realizados no Laboratório de Bioquímica dos Solos de Departamento de Tecnologia FCAV- UNESP Jaboticabal, conforme os métodos estabelecidos na resolução CONAMA 375/2006. Foram avaliados os teores de elementos determinados na legislação para a concentração máxima permitida no lodo de esgoto ou produto derivado.

4.4 Avaliação da maturidade do composto

Para avaliar o efeito das suspensões de composto de diferentes concentrações no processo germinativo de sementes foi realizado teste fundamentado na metodologia de Zucconi e seus colaboradores (1985). A partir de uma suspensão inicial (p:v) de 1 g de composto em 10 mL de água estéril foram elaboradas suspensões nas proporções de 1:5, 1:10 e 1:15 (v:v), 15 mL de cada suspensão foram depositadas em placas de Petri (em duplicata), juntamente com 5 sementes de *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Lactuca sativa* (alface). Placas de Petri contendo apenas água destilada e sementes foram usadas como controle. Todas as placas permaneceram incubadas em câmara de germinação sob condições controladas de temperatura (22° C) e na ausência de luz, por 5 dias. Durante esse período, a cada 24h, registraram-se as sementes germinadas e a alongação das radículas, foram consideradas germinadas sementes com radícula igual o superior a 2 mm de longitude. A partir destes dados determinou-se a germinação relativa (% GR), o crescimento relativo da radícula (% ER) e o índice de germinação (IG) segundo Tiquia (1998):

$$GR = \frac{\% \text{ de sementes germinadas no extrato}}{\% \text{ de sementes germinadas no controle}} \times 100$$

$$ER = \frac{\text{Elongação de radículas no extrato}}{\text{Elongação de radículas no controle}} \times 100$$

$$IG = \frac{GR.ER}{100}$$

4.5 Determinação de fungos fitopatogênicos

Para análise dos fungos fitopatogênicos foi preparada uma suspensão (p:v), inicial de 1 g de composto em 10 mL de água estéril, a partir dessa suspensão se preparam outras em proporções de 1:10, 1:100 e 1:1000 (v:v). As suspensões (100 µL) foram depositadas em placas de Petri contendo meios seletivos e diferenciais (Tabela1), em duplicata. Posteriormente as placas foram incubadas a temperatura ambiente e na ausência de luz, com observação visual para verificar crescimento a cada 2 dias, por 7 semanas.

Tabela 1. Meios seletivos usados para determinação de fungos fitopatogênicos

MEIO	FUNGO	REFERENCIA
PARP	<i>Pythium</i> spp.	MIRCETICH AND KRAFT (1973)
KW e Hora	<i>Rhizoctonia</i> spp.	KO AND HORA (1971)
PCNB	<i>Fusarium</i> spp.	NASH AND SNYDER (1962)
SFA	<i>Fusarium</i> spp.	TIO et al., (1977)
PARP -V8	<i>Phytophthora</i> spp.	MIRCETICH AND KRAFT (1973)
SSM	<i>Sclerotinia</i> spp.	STEADMAN et al., (1994)

4.6 Detecção de *E. coli* produtoras de STEC, EPEC, EHEC e enteropatogênicas humanas

Para a determinação de coliformes totais e fecais foi empregada a técnica de membrana filtrante utilizando o kit para microrganismos heterotróficos (Alfakit, Florianópolis-Brasil) segundo as especificações do fabricante. Foram preparadas suspensões de composto em água estéril, partindo de uma suspensão (p:v) de 1g de composto em 10 mL de água estéril, e elaboradas diluições sucessivas de 1:10³,

1:10⁵ e 1:10⁷. Cada suspensão foi passada pela membrana filtrante com diâmetro de poro de 0,45 µm, posteriormente membrana foi incubada em meio seletivo e diferencial a 37° C e 41° C por 24 e 48 hs. O contagem das UFC foi realizado pela topologia característica de colônias de bactérias desenvolvidas na membrana.

A determinação dos pato-tipos de *E. coli*, STEC, EPEC e EHEC foi avaliada através da reação da polimerase em cadeia PCR usando primers para os genes *stx1*, *stx2* e *eae* (Tabela 2); o DNA metagenômico foi extraído usando o kit Nucleo Spin®Soil, (Macherey Nagel- Alemanha) cumprindo as especificações do fabricante.

Tabela 2. Primers usados na determinação de *E. coli* produtoras de STEC, EPEC, EHEC.

GENE ALVO	PRIMER	TAMANHO DO AMPLICON
<i>stx1</i>	B54, AGAGCGATGTTACGGTTTG B55, TTGCCCCCAGAGTGGATG	388bp (BEEBAKHEE et al., 1992)
<i>stx2</i>	B56, TGGGTTTTTCTTCGGTATC B57, GACATTCTGGTTGACTCTCTT	807bp (JACKSON et al., 1987)
<i>eae</i>	B52, AGGCTTCGTCACAGTTG B53, CCATCGTCACCAGAGGA	570bp (JACKSON et al., 1987)

As condições adaptadas usadas para a amplificação da PCR (BORGES et al., 2012) consistiram de: 4 µL de DNA metagenômico do composto [2,05 ng/µL], 0,4 µL de dNTPs [10 mM], 2 µL de 10X tampão (100 mM Tris-HCl, pH 8,8 a 25° C, 500 mM KCl , 0,8 % [v / v] de Nonidet P40), 1,6 µL de MgCl₂ [25 mM], 0,8 µL [10 µM] de cada primer, e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas, Europe).

A fim de confirmar que a amostra de composto não apresentava inibidores para a reação de PCR, misturou-se em iguais quantidades DNA de controle positivo para cada gene alvo e DNA metagenômico do composto. Esta mistura foi usada como DNA molde na PCR que foi realizada sob as mesmas condições antes mencionadas.

Para a identificação de *Salmonella* empregou-se o meio Agar MacConkey, meio diferencial e seletivo utilizado para o isolamento e diferenciação de bactérias

Gram negativas fermentadoras e não fermentados da lactose. No meio de cultura a peptona fornece os nutrientes necessários para o crescimento bacteriano, a lactose é o hidrato de carbono fermentável, e a mistura de sais biliares e cristal violeta são agentes seletivos que inibem o desenvolvimento de muitas das bactérias Gram positivas. A fermentação da lactose por parte de bactérias como *E. coli*, *Enterobacter* *Klebsiella* produz ácido, o que baixa o pH, isto produz uma mudança de cor do indicador de pH (vermelho) e o aparecimento de colônias de cor de rosa ou vermelha. Por outro lado as bactérias que não fermentam lactose como *Salmonella*, *Shigellae* *Proteus* utilizaram peptona formando amônio, isso leva a o aumentando do pH e formação de colônias brancas ou incolores.

Com as suspensões anteriormente mencionadas no estudo dos coliformes, inocularam-se placas de Petri contendo Agar MacConkey se verteram 100 µL de suspensão por placa, as placas foram incubadas a 37° C por 24hs. Posteriormente foi plaqueado novamente por esgotamento em Agar MacConkey as colônias de bactérias não fermentadoras (colônias brancas ou incolores) que apresentaram morfologias diferentes, isso possibilitou a obtenção de colônias isoladas. À partir de estas novas colônias compatíveis com *Salmonella* (não fermentadoras de lactose), se prepararam suspensões em solução salina estéril até a obtenção de uma densidade ótica (OD₆₀₀) igual 0,5 para então se proceder a análise de identificação dos possíveis isolados de *Salmonella*.

Na identificação de espécies de *Salmonella* foi usado o Kit API® 20E (BioMérieux - França). Esse é um sistema de identificação padronizado para Enterobacteriaceae e outros, bacilos Gram-negativos não exigentes e que usa 21 testes bioquímicos miniaturizados e um banco de dados contendo as características das espécies bacterianas. Cada cartela de API 20E é composta por 20 microtubos contendo substratos desidratados. Estes testes foram inoculados com a pipeta estéril na câmara de fluxo laminar, com uma suspensão bacteriana saturada preparada a partir de uma cultura pura, numa solução de NaCl 0,85 %, certificando-se que a suspensão estivera homogênea e sem grumos flutuantes de bactérias. A suspensão

bacteriana foi inoculada em cada poço eliminando as bolhas formadas. Os poços identificados com CIT (utilização citrato), VP (Voges Proskauer produção de acetoina) e GEL (gelatinase) foram preenchidos com a suspensão até ao topo do poço, e os nomeados com LDC (lisina descarboxilase), ODC (ornitina descarboxilase), ADH (arginina desidrolase), H₂S (produção de H₂S) e URE (hidrolises da uréia) foram completados até o topo com óleo mineral estéril para criar uma atmosfera de anaerobioses. Para o processo de incubação o qual foi feito na estufa a 37° C por 18hs, o kit providencia uma câmara de incubação que apresenta pequenos poços de fundo os que ficaram cobertos com água suficiente para manter a umidade.

Durante a incubação, o metabolismo bacteriano produz em os poços alterações de cor devido as reações bioquímicas acontecidas e outros produzem produtos finais que têm de ser identificados com reagentes específicos. As reações foram lidas de acordo com a tabela subministrada pelo fabricante (Tabela 3), a identificação de *Salmonella* é obtida examinando o índice de perfil analítico e usando o software de identificação também fornecido pelo fabricante.

Tabela 3. Tabela de leitura Kit API® 20E (BioMérieux)

Tests	Substrate	Reaction tested	Negative results	Positive results
ONPG	ONPG ^a	Beta-galactosidase	Colorless	Yellow
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Yellow	Red/orange
LDC	Lysine	Lysine decarboxylase	Yellow	Red/orange
ODC	Ornithine	Ornithine decarboxylase	Yellow	Red/orange
CIT	Citrate	Citrate utilization	Pale green/yellow	Blue-green/blue
H ₂ S	Na thiosulfate	H ₂ S production	Colorless/gray	Black deposit
URE	Urea	Urea hydrolysis	Yellow	Red/orange
TDA	Tryptophan	Deaminase	Yellow	Brown-red
IND	Tryptophan	Indole production	Yellow	Red (2 min)
VPNa pyruvate	Acetoin production	Colorless	Pink/red (10 min)	
GEL	Charcoal gelatin	Gelatinase	No diffusion of black	Black diffuse
GLU	Glucose	Fermentation/oxidation	Blue/blue-green	Yellow
MAN	Mannitol	Fermentation/oxidation	Blue/blue-green	Yellow
INO	Inositol	Fermentation/oxidation	Blue/blue-green	Yellow
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxidation	Blue/blue-green	Yellow
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxidation	Blue/blue-green	Yellow
SAC	Sucrose	Fermentation/oxidation	Blue/blue-green	Yellow
MEL	Melibiose	Fermentation/oxidation	Blue/blue-green	Yellow
AMY	Amygdalin	Fermentation/oxidation	Blue/blue-green	Yellow
ARA	Arabinose	Fermentation/oxidation	Blue/blue-green	Yellow

^aONPG = orthonitrophenyl beta-D-galactoside.

V RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises Químicas

Dado que não existem versões definitivas de normatividade específica para avaliar a qualidade e biossegurança microbiológica e química da compostagem de carcaças (WILKINSON, 2007). Os valores achados na amostra analisada foram confrontados com os valores de referência da normatividade para lodos de esgoto, fertilizantes orgânicos e de qualidade no solo da legislação brasileira (CONAMA Res 375/2006, MAPA-SDA IN. 27/2009, CETESB IN 195/2005).

Os dados mostram que os elementos citados como contaminantes nas normativas estão em muito menor concentração no composto que as concentrações máximas permitidas para lodo de esgoto, para os fertilizantes orgânicos e para os valores de referência que determinam a qualidade de solo (Tabela 4 e 5). Entretanto os valores dos elementos analisados estão maiores quando são comparados com os valores mínimos necessários para a qualidade dos fertilizantes orgânicos (Tabela 5).

Comparando os elementos químicos analisados com a concentração máxima permitida no lodo de esgoto ou produto derivado e com limites máximos de contaminantes admitidos em fertilizantes orgânicos, estes apresentam valores em média 100 vezes abaixo dos níveis máximos de contaminantes permitidos. Entretanto o cálcio, por exemplo, está em concentrações muito maiores no composto (406.2 % ou 4.062.500 mg / kg) do que o mínimo que se deseja em um fertilizante orgânico (1 % ou 10.000 mg / kg) podendo ser usado como corretivo em solos ácidos.

Tabela 4. Elementos analisados comparados com normatividade para lodos de esgoto e qualidade do solo.

Elemento	Amostra analisada (mg.kg ⁻¹ , base seca)	¹ Concentração máxima permitida no lodo de esgoto ou produto derivado (mg.kg ⁻¹ , base seca)	² Valores de referencia de qualidade para solo (mg.kg ⁻¹ , base seca)
Arsênio	0.009	41	3,5
Bário	15.84	1300	75
Boro	4.03	---	---
Cádmio	0.36	39	<0,5
Cálcio	4.062.500	---	---
Chumbo	3.34	300	17
Cobalto	11.92	---	13
Cobre	10.48	1500	35
Cromo	1.49	1000	40
Enxofre	1746.34	---	---
Ferro	1851.8	---	---
Fósforo	20699.30	---	---
Manganês	68.1	---	---
Magnésio	1511.6	---	---
Mercúrio	0.004	17	0,05
Níquel	2.22	420	13
Nitrogênio	2381.7	---	
Selênio	0.045	100	0,25
Zinco	16.7	2800	60

1. CONAMA Resolução 375 de 2006, 2. CETESB Decisão de diretoria 195 de 2005, --- Não especificado

Tabela 5. Elementos analisados comparados com normatividades para fertilizantes orgânicos.

Elemento	Amostra analisada mg.kg ⁻¹ (%)	¹ Limites máximos de contaminantes admitidos em fertilizantes orgânicos mg.kg ⁻¹	² Teor Total Mínimo-% Fertilizantes orgânicos
Arsênio	0.009	20	---
Bário	15.84	---	---
Boro	4.027 (0.0004)	---	0,03
Cádmio	0.361	3	---
Cálcio	4.062.500 (406.2)	---	1
Chumbo	3.342	150	---
Cobalto	11.92 (0.001)	---	0,005
Cobre	10.48 (0.0001)	---	0,05
Cromo	1.484	200	---
Enxofre	1746.34 (0,17)	---	1
Ferro	1851.8 (0.18)	---	0,2
Fósforo	20699.30	---	---
Manganês	68.1 (0.007)	---	0,05
Mercúrio	0.004	1,0	---
Níquel	2.22 (0.0002)	70	0,005
Nitrogênio	2381.7 (0.24)	---	0,5
Selênio	0.045 (0.000004)	80	1,0
Zinco	16.7 (0.00167)	---	0,1

1. MAPA-SDA Instrução Normativa Nº 27 de 2006, 2. MAPA-SDA Instrução Normativa Nº 25 de 2009, --- Não especificado

5.2 Avaliação da maturidade do composto

Os resultados das provas de maturidade do composto determinados pela influência do mesmo na germinação de sementes de alface e tomate (porcentagem de sementes germinadas, germinação relativa, índice de germinação IG, alongação média da radícula e alongação relativa da radícula) são mostrados nas figuras 4a, 4b, 5a, 5b e 6, respectivamente. A Tabela 6 mostra os valores achados nos testes de prova de germinação.

Em todas as concentrações testadas se observou uma alongação da raiz acima do controle (Tabela 6), entretanto na concentração [1:10] as sementes de alface alcançaram radículas com a maior alongação (Figura 4a,) e igualmente o máximo porcentagem de germinação relativa (Figura 4b), enquanto que nas sementes de tomate a alongação das radículas foi inversamente proporcional a as concentrações testadas (Tabela 6) mesmo assim ficaram acima da alongação das radículas no controle.

Tabela 6. Germinação relativa, crescimento relativo e índice de Germinação

Concentração (v/v)	(%) Germinação Relativa	(%) Crescimento relativo das raízes	ÍNDICE DE GERMINAÇÃO
ALFACE (<i>Lactuca sativa</i>)			
[1:5]	83,33	185	154,2
[1: 10]	116,6	302,47	302,5
[1: 15]	100	130	130
TOMATE (<i>Solanum lycopersicum</i>)			
[1:5]	100	107	107
[1: 10]	100	149,7	149,7
[1: 15]	100	156,6	156,6

Os valores dos testes de maturidade obtidos nesse estudo evidenciam que foi alcançada a estabilidade e maturidade do composto; as porcentagens de germinação

achadas foram iguais e superiores a 100 % (Figura 6), para os dois tipos de sementes estudados indicando que o composto não apresenta toxicidade que possa inibir a germinação.

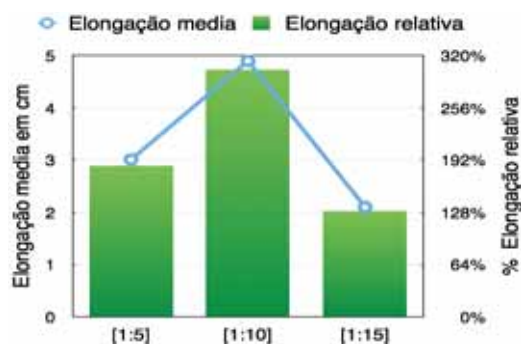


Figura 4ª. Elongação média e relativa em alface

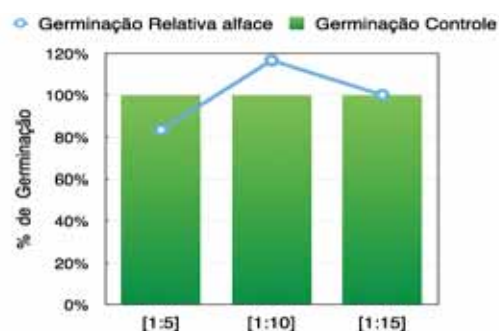


Figura 4b. Germinação relativa em alface

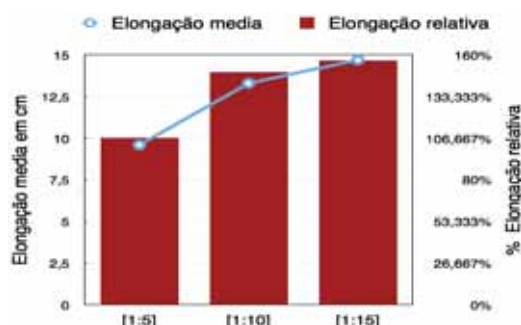


Figura 5a. Elongação média e relativa em tomate

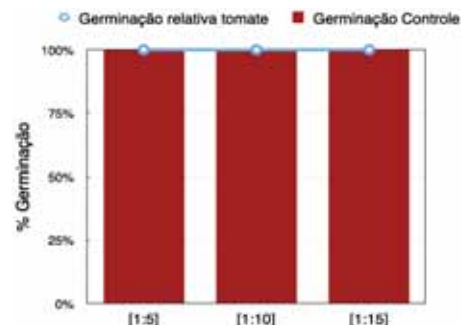


Figura 5b. Germinação relativa em tomate

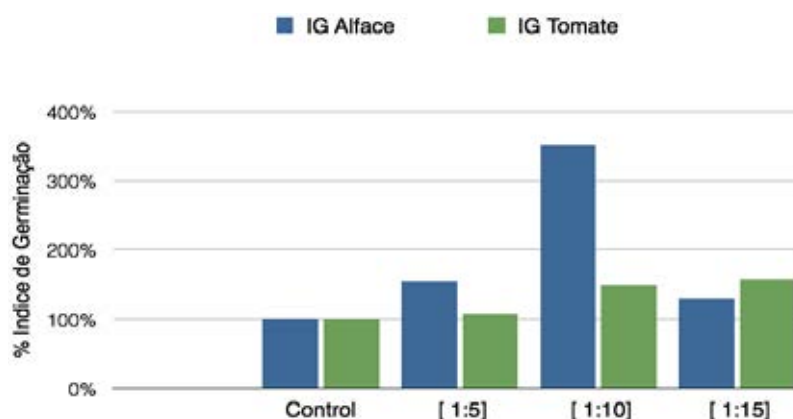


Figura 6. Índices de germinação em porcentagem

A estabilidade do composto e maturação são propriedades integrais que indicam o grau de decomposição de matéria orgânica e o potencial de fitotoxicidade causado por uma compostagem insuficiente. Muitas das substâncias que se encontram no composto imaturo podem resultar na redução da taxa de germinação de sementes e sua magnitude.

A estabilidade e a maturação do processo de compostagem podem ser operacionalmente definidas pela atividade respiratória e pela fitotoxicidade do composto, respectivamente (WU et al., 2000). Como a compostagem é um processo microbiano, a estabilidade do composto e maturidade são os resultados da atividade microbiana.

5.3 Determinação de fungos fitopatogênicos

Usando meios microbiológicos seletivos e diferenciais não se observou nem se isolou os fungos fito-patogênicos pesquisados, *Pythium* spp., *Rizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp. e *Sclerotinia* spp. (Figura 7). São bem conhecidos diversos mecanismos envolvidos na inativação de agentes patogênicos durante a compostagem, tais como a exposição ao calor, o antagonismo microbiano (incluindo a produção de antibióticos e parasitismo), a produção de ácidos orgânicos e de amoníaco e a competição por nutrientes (EPSTEIN., 1997). A temperatura é considerada o fator mais importante na inativação de patógenos, e a maioria de fungos fitopatogênicos são sensíveis à temperatura acima de 50° C, quando esta é mantida por mais de 72hs. Atividade supressiva contra doenças de plantas transmitida pelo solo é, em geral, uma propriedade desejável em corretivos orgânicos para solos e substratos para cultura (AVILÉS et al., 2011), tal efeito dos compostos pode constituir um valor adicional para este tipo de produto. As fotografias apresentadas na figura 7 mostram dos testes feitos para a determinação dos fungos fitopatogênicos, todos negativos.



Meio SFA (*Fusarium* spp)



Meio SSM (*Sclerotinia* spp)



Meio PARP (*Pythium* spp)



Meio PARP -V8 (*Phytophthora* spp)



Meio PCNB (*Fusarium* spp)



Meio Ko e Hora (*Rhizoctonia*spp)

Figura 7. Meios de seletivos e diferenciais usados para isolamento de fungos fitopatógenos transmitidos pelo solo.

5.4 Detecção de *E. coli* produtoras de STEC, EPEC, EHEC e contagem de enterobactérias

O número de coliformes fecais encontrado foi quase 5 vezes abaixo do que o valor máximo permitido, quando foi comparado com os fertilizantes orgânicos e lodo de esgoto ou produto derivado, na regulamentação brasileira e canadense. Nenhuma espécie *Salmonella* spp. de foi detectada pelas duas metodologias usadas: Alfa kit (Figura 8) e o teste confirmatório exclusivo para detecção de bactérias entéricas API 20E de BioMérieux (Figura 9), concordando com o exigido com as normatividades comparadas (Tabela 6). Consequentemente, nenhuma espécie de *Salmonella* interesse em saúde pública das espécies *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella cholerae suissparizonae*, *Salmonella ser gallinarum*, *Salmonella serparatyphi*, *Salmonellapollorum* foram isoladas na amostra analisada (Figura 10), . A percentagem de identificação garantida pelo kit API 20E de BioMérieux é de fiabilidade 99,8%.

A contagem de coliformes totais na amostra poderia sugerir uma fonte de contaminação ambiental, isso devido à ubiquidade de coliformes, concordando com o relatado em um estudo feito por Dunkley e seus colaboradores no ano 2011, que mostraram a ausência de *E. coli* e *Salmonella* spp. e presença permanente de coliformes, em uma amostra desolo sujeito à aplicação de composto livre de coliformes.

Tabela 6. UFC de coliformes totais , fecais e *Salmonella* spp.

Bactéria	UFC Amostra	¹ Lodo de esgoto ou produto derivado	² Fertilizante orgânico ou condicionador do solo	Normatividade canadense para composto
<i>Coliformes totais</i>	1160/g	NE	NE	NE
<i>Coliformes fecais</i>	220/g	Coliformes termotolerantes <1000 UFC/g de ST	Coliformes termotolerantes <1000 UFC/g de ST	Coliformes tolerantes <1000 UFC/g de ST
<i>Salmonella</i> spp.	0	<i>Salmonella</i> ausência em 10 g de ST	<i>Salmonella</i> ausência em 10 g de ST	<i>Salmonella</i> <3 UFC/4g g de ST

NE: não especificado *Norma brasileira: 1 .CONAMA Res.375/2006 ; 2.MAPA–SDA IN. 27/2006



a

b

Figura 8. Teste de identificação e contagem de coliformes (Alfa kit), a) Mostrando crescimento de coliformes totais, b) Mostrando colônias fluorescentes correspondentes a coliformes fecais.

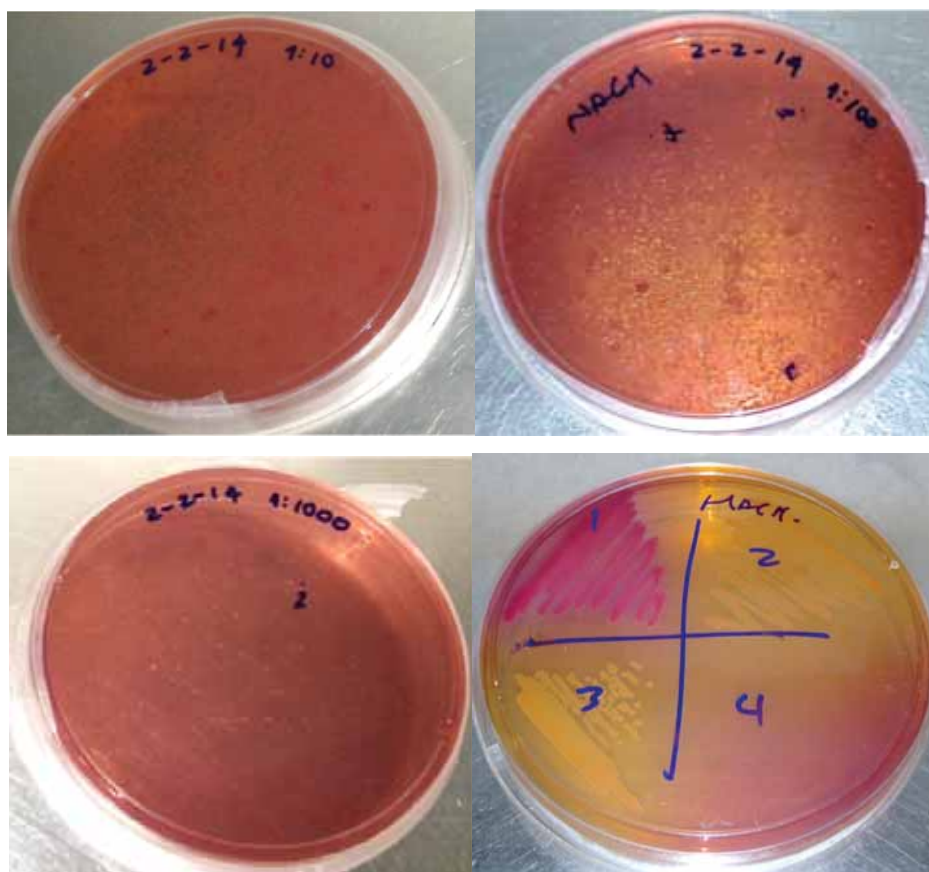


Figura 9. Placas contendo meio seletivo ágar MacConkey mostrando isolamento das diferentes espécies bacterianas



Figura 10. Resultados de API 20E (BioMérieux) mostrando perfil bioquímico de bactérias coliformes e ambientais e apresentando ausência total de *Salmonella* nas amostras analisadas.

O uso de uma estratégia de PCR direta usando marcadores para a detecção de genes que codificam para a toxina shiga 1 e 2 (stx_1 e stx_2) e o gene *eae* que codificam para a intimina, revelou a ausência de *E. coli* produtoras de ESTEC, EPEC e EHEC nas amostras de composto analisadas. Para demonstrar que a composição da amostra analisada não tem efeito inibitório na amplificação da PCR nos genes alvo, o DNA da amostra analisada foi misturado com DNA controle positivo para cada gene alvo e a amplificação foi feita sob mesmas condições anteriormente mencionadas. (Figura 11).

A PCR tem provado ser o método amplamente utilizado para a detecção rápida de STEC e EPEC a partir de amostras clínicas, permitindo a detecção de genes *stx* e *eae* a partir de amostras que são microbiologicamente complexas (VICENTE et al., 2005). Entre os genes *stx1* e *stx2*, *stx2* é considerado o mais importante fator de

virulência associado com doença humana, pois a toxina shiga é aproximadamente 400 vezes mais tóxica para os camundongos que *stx1* (ISLAM et al., 2008). O grupo das *E. coli* STEC é sorologicamente diverso e já foram relatados mais de 200 sorotipos diferentes, em que mais de 100 estão ligadas a infecções humanas (RAMMURTHY, 2008), porém a detecção sorológica baseada unicamente no sorotipo O157:H7 exclui a detecção de um grande número de outros sorotipos patogênicos. A inativação de microrganismos patogênicos depende diretamente de fatores químicos e ambientais, os resultados observados nesse trabalho, baseados na ausência dos genes *stx1* y *stx2* e *eae* mostraram que uma relação C/N entorno de 20 (FONSECA et al., 2013), evidenciam a inativação de *E. coli* STEC mantendo a fase termofílica por mais de uma semana a temperaturas entre 55 e 68 °C, concordando com o observado em estudos de sobrevivência do patógeno após inoculação em amostras de composto fresco. (SINGH ET AL., 2011)

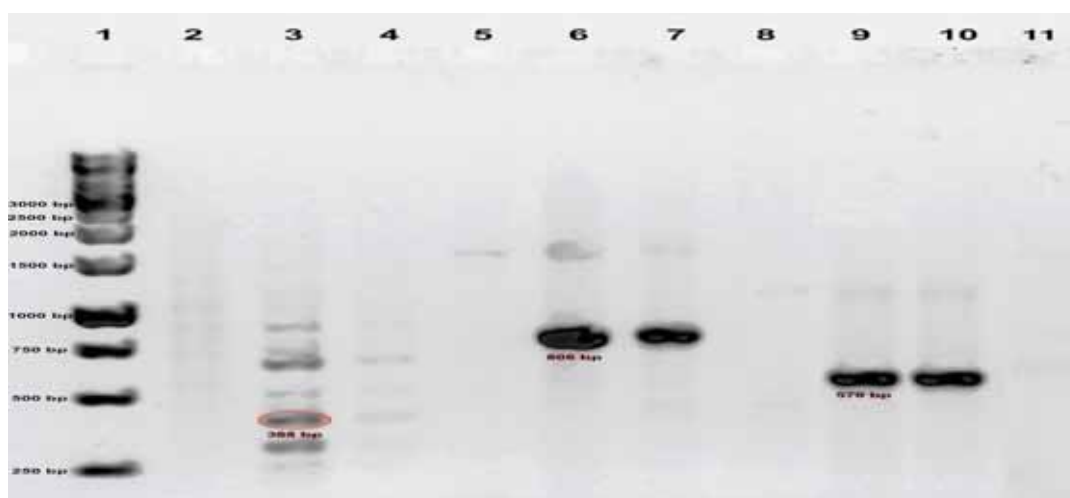


Figura 11. Gel agarose 1.3 % com brometo de etídio mostrando produtos de PCR genes *stx1*, *stx2* e *eae*. 1. Marcador de tamanho molecular 1kb 2. Amostra composto gene alvo *stx1* 3. Controle positivo gene *stx1* 4. Controle positivo *stx1* + amostra composto 5. Amostra gene alvo *stx2* 6. Controle positivo *stx2* 7. Controle positivo *stx2* + amostra composto 8. Amostra gene alvo *eae* 9. Controle positivo *eae* 10. Controle positivo *eae* + amostra composto 11. Controle negativo

O gado bovino é o principal reservatório de *E. coli* O157:H7 e a transmissão dessa bactéria do gado para os seres humanos ocorre por via alimentar e hídrica. Embora possa ser observado linhagens de *E. coli* O157:H7 em outros animais, o gado bovino tem a maior prevalência conhecida, isto devido a que o receptor para *stx*, conhecido como Globotriacil - ceramida Gb₃, está presente só em bezerros recém-nascidos no intestino e desaparecem com a idade (PRUIMBOOM-BREES et al. 2000); por outro lado os humanos expressam este receptor no endotélio e no epitélio renal constantemente.

Estudos demonstraram que se *E. coli* atingem o solo, via estrume, ou por escoamento de uma fonte pontual, a bactéria poderia sobreviver, reproduzir e se mover até dois meses, ameaçando desta forma ambientes não-alvo (GAGLIARDI; KARNIS, 2000). Uma preocupação crescente é a interiorização potencial de *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 nos diversos vegetais frescos, pois recentes estudos evidenciaram que bactérias patogênicas podem ser introduzidas nos vegetais por vias diferentes durante o processo de crescimento e distribuição (GOLDENBER et al., 2011; HORA et al., 2005). A menos que o esterco seja devidamente compostado, a prática cotidiana de aplicação do estrume bruto no solo é um potencial risco biológico capaz de transmitir agentes infecciosos, incluindo a *E. coli* O157:H7, para seres humanos e animais.

VI. CONCLUSÕES

- Agências de biossegurança na Austrália, Nova Zelândia, EUA e Canadá têm reconhecido os benefícios potenciais do uso de compostagem de carcaças quanto para mortalidade cotidiana como para os diversos surtos e identificou este como um método preferencial na disposição final para carcaças. (DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FORESTRY, 2005).

- A destruição de patógenos e o controle de vetores que podem transmitir patógenos são fundamentais para uma operação de compostagem bem sucedida. Entretanto de composto proveniente de plantas de compostagem de carcaças animais está restrito, devido a o temor de contaminação e recontaminação por agentes patogênicos.

- O uso de composto oriundo de carcaças animais tem sido limitando a solos cujos cultivos não são destinados para o consumo humano e/ou animal.

- Para poder garantir a inocuidade, e o uso da amostra analisada nos cultivos de vegetais frescos destinados a o consumo direto humanos, devem ser feitas determinações microbiológicas e moleculares no composto, solo e plantas que evidenciem a ausência de patógenos virais como o vírus de influenza aviária, e de bactérias formadoras de endósporos como *Bacillus anthracis*,. Além disso, no seu preparo e não devem ser incluídos animais mortos com doenças neurológicas ou suspeita estes.

Os resultados dos estudos realizados nesse trabalho mostraram que:

- A composição química do composto analisado mostra que ele esta dentro dos parâmetros exigidos pela lei brasileira que regulamentam a qualidade de adubos orgânicos e de lodos de esgoto para serem usados como insumos agrícolas.

- Os valores de maturidade obtidos em nosso estudo evidenciaram que foi atingida a maturidade e a estabilidade do composto, o índice de germinação foi superior, indicando que o composto não apresenta toxicidade que possa inibir a germinação.

- A ausência de fungos fitopatogênicos do solo na amostra estudada apoiou as afirmações, de que a maioria dos fungos fitopatogênicos são sensíveis a temperaturas acima de 50 ° C quando é mantida durante mais de 72 horas.

- Os resultados em contagem achados neste experimento, de coliformes fecais e *Salmonella* spp. podem contribuir para a determinação dos valores máximos permitidos na criação da regulamentação para compostagem de carcaças de animais no Brasil.

- Portanto baseados nas determinações químicas e microbiológicas feitas o composto produzido na planta experimental da FCAV tem segurança microbiológica e qualidade, entretanto sua aplicação deve ser restrita a culturas de pastagens ou jardins, culturas para produtos destinados ao consumo humano que exigem de cozimento e para alimentar novas pilhas de compostagem de carcaças.

- É necessário efetuar análises para a detecção de vírus e outras bactérias com grande potencial patogênico, com a finalidade de aumentar o espectro de uso deste processo e de seu produto final.

VI. REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. **Fitopatologia**. 3. ed. México: Limusa. México.1998. p. 31-32.

AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, BB. J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A.; ONUMA, D. L.; SILVEIRA, W. D.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 115, n. 3, p. 297-306, 2007.

ALBERTA. Agriculture, Food and Rural Development. **Manure composting manual**. 2005. Livestock Engineering Unit & Environmental Practices Unit Technical Services Division. Disponível em: <[http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/agdex8875](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/agdex8875)>. Acesso em: 20 nov. 2013.

AMIR, S.; HAFIDI, M.; MERLINA, G.; REVEL, J. C. Sequential extraction of heavy metals during composting of sewage sludge. **Chemosphere**, Oxford, v. 59, n. 6, p. 801–810, 2005.

AVILÉS, M.; BORRERO, C.; TRILLAS, M. I. Review on compost as an inducer of disease suppression in plant grown in soilless culture. **Dyn. Soil Dyn. Plant**, Middlesex, v.5, sp. is., p. 1-11, 2011.

ATWILL, E. R.; HOAR, B.; DAS GRACAS CABRAL PEREIRA, M.; TATE, K. W.; RULOFSON, F.; NADER, G.; DAS, G. C. P. M. Improved quantitative estimates of low environmental loading and sporadic periparturient shedding of *Cryptosporidium parvum* in adult beef cattle. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, n. 8, p. 4604–4610, 2003.

BAH, O.S. **Establishment of Planning and Design Principle of Waste Composting System for Low Developing Country – Cases of Composting System Design for Banjul City and Kanifing in The Gambia** (Master's Thesis) -National Central University , Taiwan, 2011

BARAK, J. D.; LIANG, A.; NARM, K-E. Differential attachment and subsequent contamination of agricultural crops by *Salmonella enterica*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 74, n. 17, p. 5568–5570, 2008.

BENCH, M. L.; WOODARD, R.; HARDER, M. K.; STANTZOS, N. Waste minimisation: home digestion trials of biodegradable waste. **Resour, Conserv. Recycl.**, Orlando, v. 45, n. 1, p. 84-94, 2005.

BORGES, C. A.; BERALDO, L. G.; MALUTA, R. P.; CARDOZO, M. V.; CABILIOGUTH, B. E.; RIGOBELLO, E. C.; ÁVILA, F. A. de. **Foodborne**

Pathog. Dis., Larchmond, 1119-1125, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2012.1206>>.

BOTHA, A.; DENMAN, S.; LAMPRECHT, S. C.; MAZ- ZOLA, M.; CROUS, P. W. Characterisation and pathogenicity of Rhizoctonia isolates associated with black root rot of strawberries in the Western Cape province of South Africa. **Aust. Plant Pathol.**, Dordrecht, v. 32, n. 2, p. 195-201, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa 27/2006**. Disponível em: <<http://www.agrolab.com.br/documento/13>>. Acesso em: 20 nov. 2013a.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução 375 de 29 de agosto de 2006**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2013b.

CAMPITELLI, P. **Calidad de compost y vermicompuestos para su uso como enmiendas orgánicas en suelos agrícolas**. p. 231. Tesis (Doctoral) - Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, 2010.

CASTALDI, P.; GARAU, G.; MELIS, P. Maturity assessment of compost from municipal solid waste through the study of enzyme activities and

water-soluble fractions. **Waste Manage.**, Kidlington, v. 28, n. 3, p. 534-540, 2008.

Castro, R. A.; Fernández, P. S. P.; Osuna, A. P. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum*- *Phytophthora capsici*. **Rev. Mex. Fitopatol.**, Obredon, v. 30, n. 1, p. 49-65, 2012.

CDC. Centers for Disease Control. **Foodborne illnesses**. Washington: Department of Health and Human Services, 2005. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections_g.htm>. Acesso em: 20 jan. 2014.

CHEN, W. Pythium root rot and feeder root necrosis. In: WHITE, D. G. (Ed.). **Compendium of corn diseases**. 3rd. St. Paul: American Phytopathological Society, 1999. p. 11-12.

COCHRAN, B. J.; CARNEY, W. A. **Basic principles of composting**. Baton Rouge: Louisiana State University Agricultural Center, 2005. Disponível em: <<http://www.lsuagcenter.com/NR/rdonlyres/1A247D4F-4E94-4021-B09E-2DF1043E179E/2908/pub2622compost.pdf>>. Acesso em: 14 sept. 2006.

DIAZ, L.F.; DE BERTOLDI, M.; BIDLINGMAIER, M. and STENTIFORD, E. **Compost science and technology**. Elsevier first edition. 2007.

COPPERBAND, L. **The art and science of composting, a resource for farmers and compost producers.** Madison: University of Wisconsin-Madison, Center for Integrated Agricultural Systems, 2002. 17 p.

CRONJE, A.; TURNER, C.; WILLIAMS, A. Composting under controlled conditions. **Environ. Technol.**, Abingdon, v. 24, n. 10, p. 1221-1234, 2003.

DE BERTOLLI, M.; VALLINI, G.; PERA, A.; ZUCCONI, F. Comparison of three windrow composting system. **BioCycle**, Emmaus, v. 23, p. 45-50, 1985.

DE BERTOLLI, M.; CITERNESI, U.; GRISELLI, M. Bulking agents in sludge composting. **Compost Sci. Land Util.**, Emmaus, v. 21, p. 32-35, 1980.

DEBBIE, D. P. Bacterial pathogens in animal manure. In: BOWMAN, D. D. (Ed.). **Manure pathogens: manure management, regulations, and water quality protection.** Alexandria, VA: WEF Press and McGraw Hill, 2009.

DEEP, I. W.; LIPPS, P. E. Recovery of *Pythium arrhenomanes* and its virulence to corn. **Crop Prot.**, Des Moines, v. 15, p. 85-90, 1996.

DEERING, A. J.; PRUITT, R. E.; MAUER, L. J.; REUHS, B. L. Identification of the cellular location of internalized *Escherichia coli*

O157:H7 in mung bean, *Vignaradiata*, by immunocytochemical techniques. **J. Food Prot.**, Des Moines, v. 74, p. 1224-1230, 2011.

DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FORESTRY. Quads - emergency management working group. In: CARCASS DISPOSAL WORKSHOP REPORT, 2005, Canberra, Australia.

DUDKA, S.; MILLER, W. P. Accumulation of potentially toxic elements in plants and their transfer to human food chain. **J. Environ. Sci. Health B**, Philadelphia, v. 34, p. 681–708, 1999.

EKINCI, K.; KEENER; H. M. ; MICHEL, F. C.; D. L. ELWELL JR., D. L. Modeling composting rate as a function of temperature and initial moisture content. **Compost Sci. Util.**, Emmaus, v. 12, n. 4, p. 356-364, 2004.

DUNKLEY. C. S.; CUNNINGHAM, D. L.; RITZ, C. W.; DUNKLEY, K. D.; HINTON, A. Using mortality compost in vegetable production: a comparison between summer and winter composting and its use in cabbage production. **Agric. Food Anal. Bacteriol.**, v. 1, n. 1, p. 6-14, 2011

EFSA. European Food Safety Authority. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 outbreaks in Europe: taking stock. **EFSA J.**, Parma, v. 9, n. 10, p. 2390, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2390>>.

EPSTEIN, E. **The science of composting**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1997.

ERWIN, D. C.; RIBIERO, O. K. **Phytophthora diseases worldwide**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1996.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos**. Rome, 2004.

FRANZ, E.; SEMENOV, A. V.; TERMORSHUIZEN, A. J.; DE VOS, O. J.; BOKHORST, J. G.; BRUGGEN, A. H. C. van. Manure amended soil characteristics affecting the survival of E. coli O157:H7 in 36 Dutch soils. **Environ. Microbiol.**, Chichester, v. 10, p. 313–327, 2008.

GAGLIARDI, J. V.; KARNS, J. S. Leaching of Escherichia coli O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 66, p.877–883, 2000.

Garber, L.; Wells, S.; Schroeder-Tucker, L.; Ferris, K. Factors associated with fecal shedding of verotoxin-producing Escherichia coli O157:H7 on dairy farms. **J. Food Prot.**, Des Moines, v. 62, n. 4, p. 307–312, 1999.

GARDNER, J. M.; NELSON, M. M.; HEFFERNAN, M. P. Chronic cutaneous fusariosis. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v.141, p. 794-795, 2005.

González, L. C. **Introducción a la fitopatología. Colección de libros y materiales educativos.** San José, Costa Rica: IICA, 1986.

GONZÁLEZ GARCÍA, V.; PORTAL ONCO, M. A.; RUBIO SUSAN, V. Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Span. J. Agric. Res.**, Madrid, v. 4, n. 1, p. 55-79, 2006.

GOLBERG, D.; KROUPITSKI, Y.; BELAUSOV, E.; PINTO, R.; SELA, S. Salmonella Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 250–257, 2011.

GREWAL, S.; SREEVATSAN, S.; MICHEL Jr., F. C. Listeria and Salmonella during swine manure management. **Compost Sci. Util.**, Emmaus, v. 15, p. 53–62, 2007.

GOLUEKE, G. G.; CARD, B. J.; MCGAUHEY, P. H. A critical evaluation of inoculums in composting. **Appl. Microbiol.**, Washington, v. 2, n. 1, p. 45-53, 1954.

GUAN, T. Y.; HOLLEY, R. A. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illnesses—A review. **J. Environ. Qual.**, Madison, v. 32, p. 383–392, 2003.

GRAY, K. R.; SHERMAN, K.; BIDDLESTONE, A. J. A review of composting - part 1. **Process Biochem.**, London, v. 6, p. 32-36, 1971.

GUARRO, J.; NUCCI, M.; AKITI, T.; GENE, J.; BARREIRO, M. D. C.; GONCALVES, R. T. Fungemia due to *Fusarium sacchari* in an immunosuppressed patient. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 38, p. 419-421, 2000.

GUZMAN-COTTRILL, J. A.; ZHENG, X. Y.; CHADWICK, E. G. *Fusarium solani* endocarditis successfully treated with liposomal amphotericin B and voriconazole. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, Philadelphia, v. 23, p. 1059-1061, 2004.

HAO, J.J.; SUBBARAO, K. V.; DUNIWAY, J. M. Germination of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* sclerotia under various soil moisture and temperature combinations. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, p. 443-450, 2003.

HASS, C. N.; ROSE, J. B.; GERBA, C. P. (Ed.). **Quantified microbial risk assessment**. New York: John Wiley & Sons, 1999.

HAUG, R. T. **The practical handbook of compost engineering**, [S. l.]: CRC Press Company, 1993. p. 248.

INSAM, H.; DE BERTOLDI, M. **Compost science and technology**. Amsterdam: Elsevier, 2007. chap. 3, p. 29.

HORA, R.; WARRINER, K.; SHELP, B. J.; GRIFFITHS, M. W. 2005. Internalization of *Escherichia coli* O157:H7 following biological and mechanical disruption of growing spinach plants. **J. Food Prot.**, Des Moines, v. 68, suppl., p. 2506–2509s, 2005.

ICHIDA, J. M.; KRIZOVA, L.; LEFEVRE, C. A.; KEENER, H. M.; ELWELL, D. L.; BURTT JR., E. H. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v. 47, p. 199-208, 2001.

PRUIMBOOM-BREES, I. M.; MORGAN, T. W.; ACKERMANN, M. R.; NYSTROM, E. D.; SAMUEL, J. E.; CORNICK, N. A.; MOON, H. W. 2000. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A.**, Washington, v. 97, n. 19, 10325-10329, 2000.

ISHII, S.; MEYER, K. P.; SADOWSKY, M. J. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 73, p. 5703-5710, 2007.

ISLAM, M. A.; MONDOL, A. S.; DE BOER, E.; BEUMER, R. R.; ZWIETERING, M. H.; TALUKDAR, K. A.; HEUVELINK, A. E. Prevalence and genetic characterization of shiga toxin producing *Escherichia coli* isolates from slaughtered animals in Bangladesh. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 74, p. 5414-5421, 2008.

HOITINK, H. A. J. Trends in treatment and utilization of solid wastes through composting in the United States. In: THE INTERNATIONAL COMPOSTING SYMPOSIUM, 1., 2000, 1-13. Nueva Escocia, Canadá. **Proceedings...**p. 1-13.

HUERTA, O.; LÓPEZ, M.; SOLIVA, M.; ZALOÑA, M. **Compostaje de residuos municipales: control del proceso, rendimiento y calidad del producto:** documento resumen del trabajo del Grupo de Caracterización, tratamiento y diagnóstico de residuos orgánicos de la Escuela Superior de Agricultura de Barcelona de la Universidad Politécnica de Catalunya. Barcelona, Espana, 2008. 330 p.

JANOVICEK, K. J.; VYN, T. J.; VORONEY, R. P.; ALLEN, O. B. Early corn seedling growth response to phenolic acids. **Can. J. Plant Sci.**, Ottawa, v. 77, p. 391–393, 1997.

FONSECA, J .C .L.; MARCHI, M .R .R.; BRAZ, L. T.; CECÍLIO, A. A.; SACRAMENTO, L. V. S. **Green design, materials and manufacturing processes.** [S. I.]: CRC Press, 2013. p. 413–416

JONES, P. W. Health hazards associated with the handling of animal wastes. **Vet. Rec.**, London, v. 106, p. 4-7, 1980.

KALBASI, S.; MUKHTAR, S. E.; HAWKINS, E.; AUVERMANN, B. W. Carcass composting for management of farm mortalities: a review. **Compost Sci. Util.**, Emmaus, v. 13, n. 3, p. 180-193, 2005.

KLERKS, M. M.; PELZER, M. G.; FRANZ, E.; ZIJLSTRA, C.; BRUGGEN, A. H. C. van. Physiological and molecular responses of *Lactuca sativa* to colonization by *Salmonella enterica* Serovar Dublin. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 73, p. 4905–4914, 2007.

KO, W. H.; HORA, F. K. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, p. 707-710, 1971.

LOGRIECO, A.; BOTTALICO, A.; MULÉ, G.; MORETTI, A.; PERRONE, G. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 645-667, 2003.

MARTÍNEZ-BLANCO, J.; COLÓN, J.; GABARRELL, X.; FONT, X.; SÁNCHEZ, A.; ARTOLA, A.; RIERADEVALL, J. The use of life cycle

assessment for the comparison of biowaste composting at home and full scale. **Waste Manage.**, Kidlington, v. 30, p. 983–994, 2010.

MARTIN, F. N.; TOOLEY, P. W. Phylogenetic relationships of *Phytophthora ramorum*, *P. nemorosa*, and *P. pseudosyringae*, three species recovered from areas in California with sudden oak death. **Mycol. Res.**, Manchester, v. 107, p. 1379-1391, 2003.

MCLAUCHIN, J.; MITCHELL, R. T.; SMERDON, W. J.; JEWELL, W. J. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: A review of hazard characteristics for use in microbiological risk assessment of foods. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 92, p. 15–33, 2004.

Mircetich, S. M.; Kraft, J. M. Efficiency of various selective media in determining *Pythium* population in soil. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 50, p. 151-161, 1973.

MISRA, R. V.; ROY, R. N.; HIRAOKA, H. **On-farm composting methods**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003. 51 pp.

MORENO CASCO, J. *Compostaje*. Madrid: Mundi-Prensa Libros, 2008. p. 570.

MURPHY, D. W.; HANDWERKER, T. S. Preliminary investigations of composting as a method of dead bird disposal. In: THE NATIONAL POULTRY WASTE MANAGEMENT SYMPOSIUM, 1988, Ohio. **Proceedings...** p. 65-67.

MURRAY, M. J. How should clients manage horses that have diarrhea and cultured positive for Salmonella to minimize exposure to other horses? **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.**, Yardley, v. 20, n. 12, p. 1352, 1998.

NAKASAKI, K., NAG, K. KARITA, S. Microbial succession associated with organic matter decomposition during thermophilic composting of organic waste. **Waste Manag. Res.**, Kidlington, v. 23, n. 1, p. 48-56, 2005.

NASTASIJEVIC, I. STEC O157 in the beef chain – risk assessment and management. **CAB Reviews: perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources**, v. 6, n. 61, p. 1-19, 2011.

NASH, S. M.; SNYDER, W. C. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. **Phytopathology**, St. Paul, v. 52, p. 567-572, 1962.

O'DONNELL, K.; SARVER, B. A. J.; BRANDT, M.; CHANG, D. C.; NOBLE-WANG, J.; PARK, B. J.; SUTTON, D. A.; BENJAMIN, L.; LINDSLEY, M.; PADHYE, A.; GEISER, D. M.; WARD, T. J. Phylogenetic

diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusarium*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 45, p. 2235–2248, 2007.

NJAMBERE, E. N.; CHEN, W.; C. FRATE, C.; WU, B-M.; TEMPLE, S. R.; MUEHLBAUER, F. J. Stem and crown rot of chickpea in California caused by *Sclerotinia trifoliorum*. **Plant Dis.**, St. Paul, v. 92, p. 917-922, 2008.

OWEN-GOING, T. N. **Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) in commercial-scale and small-scale hydroponic systems.** 2002. Thesis (MSc) - University of Guelph, Guelph, Ontario, 2002.

PELL, A. N. Manure and microbes; public and animal health problem. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 89, p. 2673–2681, 1997.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Med. Mycol.**, Oxford, v. 38, p. 17-22, 2000.

QUESADA, O. L. M.; HAUSBECK, M. K. Resistance in tomato and wild relatives to crown and root rot caused by *Phytophthora capsici*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, p. 619-627, 2010.

RAMMURTHY, T. Shiga toxin producing escherichia coli (STEC): the bug in our backyard. **Ind. J. Med. Res.**, New Delhi, v. 128, p. 233-236, 2008.

RANDHIR, S.; JINKYUNG, K.; MARION, W.; SHEPHERD JR., F. XIUPING, J. Determining Thermal Inactivation of Escherichia coli O157:H7 in Fresh Compost by Simulating Early Phases of the Composting Process. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 77, n. 12, p. 4126-4135, 2011.

SCHIKORA, A.; CARRERI, A.; CHARPENTIER, E.; HIRT, H. The dark side of the salad: Salmonella typhimurium overcomes the innate immune response of Arabidopsis thaliana and shows an endopathogenic lifestyle. **PLoS ONE**, v. 3, p. e2279, 2008.

Schena, L.; Cooke, D. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a “molecular tool box” for the detection and characterization of Phytophthora species. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v. 67, p. 70-85, 2006.

SEOÁNEZ CALVO, M. **Tratado de reciclado y recuperación de productos de los residuos**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2000. 605 p.

SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. **Rhizoctonia species**: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996.

TANG, Q.; CUIL, L-K.; DELONG, L.; DAL, T-T.; YIN, W.; DONG, S.; XING, H.; ZHENG, X.; WANG, Y. Resistance evaluation of soybean germplasm from Huanghuai region to Phytophthora root rot. **Agric. Sci. China**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 246-251, 2011.

TAORMINA, P. J.; BEUCHAT, L. R.; SLUTSKER, L. Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 5, p. 626–634, 1999.

TCHAPTCHET, S.; HANSEN, J. The Yin and Yang of host-commensal mutualism. **Gut Microbes**, Austin, v. 2, p. 347–352, 2011.

TIO, M.; BURGESS, L. W.; NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A. Techniques for the isolation, culture and preservation of the Fusarium **Aust. Plant Pathol. Soc. Newsl.**, Dordrecht, v. 6, p. 11, 1977.

TIQUIA, S. M. Microbiological parameters as indicators of compost maturity. **J. Appl. Microbiol.**, Washington, v. 99, p. 816–828, 2005.

TRUONG, N.; LIEW, E.; BURGESS, L. Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from black pepper in Vietnam. **Fungal Biology**, London, v. 114, p.160-170, 2010.

VICENTE, H. I. G.; DO AMARAL, L. A.; DE MELLO, A.; CERQUEIRA, F. Shiga toxigenic *Escherichia coli* serogroups O157, O111 and O113 in feces, water and milk samples of dairy farm. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 36, p. 217-222, 2005.

WANI, S. A.; HUSSAIN, I.; NABI, A. FAYAZ, L.; NISHIKAWA, Y. Variants of *eae* and *stx* genes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from calves. **Lett. Appl. Microbiol.**, Chichester, v. 45, p. 610-615, 2007.

WIDMER, T. *Phytophthora kernoviae* oospore maturity, germination and infection. **Fungal Biol.**, London, v. 114, p. 661-668, 2010.

WILKINSON, K. G. The biosecurity of on-farm mortality composting. **J. Appl. Microbiol.**, Washington, v. 102, p. 609-618, 2007.

WOODARD, R.; BENCH, M.; HARDER, M. K.; SANTOS, N. The optimisation of household waste recycling centres for increased recycling a case study in Sussex, UK. **Res. Conserv. Recycling**, Amsterdam, v. 43, p. 75-93, 2004.

WU, L.; MA, L. Q.; MARTINEZ, G. A. Comparison of methods for evaluating stability and maturity of biosolids compost. **J. Environ. Qual.**, Madison, v. 29, p. 424–429, 2000.

ZHANG, B. Q.; YANG, X. B. Pathogenicity of Pythium populations from corn-soybean rotation fields. **Plant Dis.**, St. Paul, v. 84, p. 94-99, 2000.

ZUCCONI, F., MONACO, A., FORTE, M., DE BERTOLDI, M., Phytotoxins during the stabilization of organic matter. In De Bertoldi, M., M.P. Ferranti, P. L´Hermite, F. Zucconi (eds.) **Composting of Agricultural and Other Wastes**. Elsevier, London, UK, pp. 73–86. 1985.