

MICROBIOLOGIA DE COMPOSTAGEM: NOVAS ABORDAGENS

NEW APPROACHES ON COMPOST MICROBIOLOGY

Keila Maria Roncato DUARTE¹; Alexandre Antonio PASQUALINI²

RESUMO

O uso de dejetos de origem animal na biodigestão contribui de diferentes formas para a sustentabilidade do sistema agropecuário. Primeiro, porque resolve o problema das grandes quantidades destes dejetos gerados e que depois de biodigeridos, podendo ser utilizados de diferentes maneiras. Outra é o aproveitamento dos gases gerados na obtenção de energia. A detecção dos agentes patogênicos, principalmente bactérias, protozoários e vírus, em uma amostra de água ou de dejetos líquidos ou sólidos é extremamente difícil, em razão de suas baixas concentrações e da difícil manipulação da matriz biológica. Portanto, a determinação da potencialidade de dejetos para uso agrícola pode ser feita de forma indireta, através dos organismos indicadores de contaminação fecal do grupo dos Coliformes, principalmente. Neste trabalho, todas as amostras biodigeridas de cama de frango e dos dejetos de bovinos e suínos do experimento foram testadas pelo kit COLItest®. O composto de suínos não apresentou coliformes totais e por consequência, ausência de *E. coli*. Uma das 5 amostras do biocomposto de cama de frango e 3 das 5 amostras de biocompostos bovinos apresentaram resultados positivos para Coliformes Totais e presença de *E. coli*. Desta forma, tirando os dejetos de suíno, estes biocompostos devem ser utilizados em pastagens ou culturas perenes. É de extrema importância sanitária a execução de um simples teste de presença de *E. coli* para resíduos de dejetos animais para garantir a qualidade do alimento onde estes compostos serão utilizados.

Palavras chave: Bactérias entéricas, Biodigestão, Dejetos de origem animal.

ABSTRACT

The use of animal manure or poultry litter for biodigestion contributes in different ways for the sustainability of agriculture and livestock production systems. First, because it leads with the problem of big amounts of animal manure, which, once biodigested, can be used for other purposes; and second, due to the use of gas generated as energy source. The identification of pathogenic agents on the compost as bacteria, virus, protozoa, etc in a sample of water or in an animal waste as liquid or solid is extremely difficult due to low concentration and handling of biological matrix. Therefore, to determine the potentiality of the compost for agriculture use, true indicative microorganisms as Coliforms and *E. coli*, can be done as a signal of quality and food safety. In this work, all compost where tested using COLItest Kit. The manure compost from pigs did not show any contamination with coliforms or *E. coli*. One of the five samples from poultry litter was positive for total coliforms and for *E. coli*. Three from five of the bovine manure bio digested samples were also positive for total coliforms and for *E. coli*. In this way, bovine and poultry composts must be used only for pastures and perennial cultures, not for market garden and it is extremely important the enforcement of this or a similar kit for the presence or absence of *E. coli* before decide the destination of compost from animal residues, to assure the food quality from those agriculture fields fertilized with the compost.

Keywords: Biodigestion, Enteric bacteria, Animal manure.

¹ Engenheira Agrônoma pela USP, mestrado e doutorado em Microbiologia Agrícola pela USP. Atualmente é Pesquisadora Científica VI da APTA- UPD Tietê (Polo Regional Centro Sul- Piracicaba), onde é Chefe de Seção Técnica - SP, Brasil.

² Veterinário formado pela UNIPINHAL / SP. Especialização em Produção de Ruminantes, UFLA / MG. Mestrado em Produção Animal Sustentável, APTA / IZ / SP, Brasil.

1. Introdução

A biodigestão anaeróbica representa um sistema de tratamento acessível ao meio rural para reciclagem de dejetos e resíduos agropecuários com consequente obtenção de energia pela queima do biogás e, obtenção de biofertilizante, que é o efluente da saída do biodigestor. Espera-se também com o tratamento de efluentes rurais mitigar o impacto ambiental decorrente da contaminação da elevada carga biológica e mineral das digestas dos animais e consequentemente, a eutrofização de mananciais, que torna a água não potável, malcheirosa e indisponível para o consumo, devido a concentração de bactérias patogênicas como os coliformes e *Escherichia coli* (*E. Coli*). O presente trabalho buscou analisar a eficiência do tratamento de dejetos agropecuários como cama de frango, dejetos de bovinos e suínos quanto ao controle de coliforme totais e *E. coli*, ratificando assim a aplicabilidade dos biodigestores no meio rural.

2. Revisão de Literatura

O ciclo hidrológico que se repete continuamente. Embora contínuo nesse processo, de toda chuva que chega ao solo em nossa região, apenas algo em torno de 15% escoam aos rios, sendo a água disponível para o nosso uso (ROMERA; SILVA, 2012).

A importância do ciclo hidrológico no meio rural se dá por diversas razões:

manter por mais tempo a umidade no solo, favorecendo o crescimento das plantas que melhora a eficiência produtiva, minimiza custo com energia em processo de irrigação, evita impacto da chuva no solo e assim se evita lixiviação, erosão e assoreamento de rios. Dentre outras tantas vantagens já citadas e estudadas fato é que quase 50% da população rural no Brasil utiliza a água captada diretamente dos mananciais, minas e rios de suas imediações para sobreviverem (IBGE, 2012).

Infelizmente, essa população ainda despeja seu esgoto doméstico e os dejetos das atividades rurais nestes mesmos leitos d'água. Tem-se então a necessidade de difundir conhecimentos a essa população que para obterem melhor qualidade de vida, promovendo inclusão do uso de tecnologias que garantam sistemas de produção sustentável, eficiente e de baixo custo.

Furlong e Padilha (1996) avaliaram a eficiência de um biodigestor no controle de ovos de nematóides de bovinos (*Cooperia*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus* spp) em diferentes Tempos de Retenção Hidráulica (TRH) em condições mesofílicas (21 a 26°C) e concluíram ser necessário em período mínimo de 30 dias de TRH para atestar que o uso de biodigestores é um meio eficiente no controle desses parasitas gastrointestinais de bovinos.

Angonese *et al.* (2005) apresentaram valores compreendidos entre 5,7 e 7,6 L dia⁻¹ de dejetos por suíno, com peso vivo entre 57 a 97 kg,

afirmando o elevado potencial de poluição desta atividade mas, por outro lado, podem ser uma alternativa energética como fertilizante e, também, como alimento para outras espécies (OLIVEIRA, 1993) e que se bem conduzido, o manejo adotado permite o aproveitamento integral dos dejetos, dentro das condições estabelecidas em cada propriedade, minimizando impactos ambientais.

Amaral *et al.* (2000) testaram a eficiência dos biodigestores de cama de frango de postura para estabelecer referências de controle e contaminação ambiental com bactérias potencialmente patogênicas, através do uso de biodigestores, com e sem inóculos e em diferentes tempos de retenção hidráulica e acabaram por concluir que ocorreram reduções de bactérias dos grupos coliformes totais e fecais acima de 99,0%.

Lucas Junior e Santos (2000) atestaram a importância do uso de biodigestores no tratamento de dejetos de aves e cama de aviários para o saneamento ambiental e demonstraram a redução desse impacto não somente pela redução dos sólidos presentes nos biodigestores, mas também pela redução de microrganismos patogênicos indesejáveis nos efluentes. A redução de microrganismos patogênicos tem sido relatada como efeito da sequência bioquímica do processo de biodigestão

anaeróbia e de variações nos fatores que interferem neste processo.

Carrington *et al.* (1982) estudaram a inativação de salmonela em lodo de esgoto durante a biodigestão anaeróbia em 35 e 48 °C com tempos de retenção hidráulica entre 10 e 20 dias. Os autores observaram que o decaimento da população bacteriana foi maior com 48 °C que a 35 °C para o mesmo tempo de retenção hidráulica, e similares para tempos de retenção maiores que 15 dias. Shih (1984) analisou a presença de salmonela e coliformes fecais no afluente e efluente de biodigestor operado com resíduos de aves em condição termofílica (50 °C) e mesofílica (35 °C) e observou que em condição termofílica tanto salmonela e coliformes fecais foram completamente destruídos e parcialmente reduzidos em condição mesofílica.

Para o monitoramento da qualidade das águas são realizados em laboratório 33 parâmetros físicos, químicos e microbiológicos. Desses 33 parâmetros, nove compõem o Índice da Qualidade das Águas (IQA). São eles: 1- Oxigênio dissolvido (OD); 2- demanda bioquímica de oxigênio (DQO) ; 3 - coliformes fecais ; 4 -temperatura da água ; 5- pH da água; 6- nitrogênio total; 7 - fósforo total; 8- sólidos totais; 9 – turbidez (Quadro 1).

Quadro 1. Especificações dos parâmetros adotados pela SABESP (2009) para análise e qualidade da água.

Parâmetros	Especificação
Oxigênio dissolvido (OD)	Quantidade de gás oxigênio contido na água ou no esgoto, geralmente expressa em parte por milhão numa temperatura e numa pressão atmosférica específica. É uma medida da capacidade de água para sustentar organismos aquáticos. A água com conteúdo de oxigênio dissolvido muito baixo, que é geralmente causada por lixos em excesso ou imprópriamente tratados, que não sustentam peixes e organismos similares
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	- É a quantidade de oxigênio necessária para oxidação da matéria orgânica através de um agente químico. Um valor de DQO alto indica uma grande concentração de matéria orgânica e baixo teor de oxigênio. O aumento da concentração de DQO num corpo d'água se deve principalmente a despejos de origem industrial.
Ph	Medida da concentração relativa dos íons de hidrogênio numa solução; esse valor indica a acidez ou alcalinidade da solução. É calculado como o logaritmo negativo de base 10 da concentração de íons de hidrogênio em moles por litro. Um valor de pH 7 indica uma solução neutra: índice de pH maiores de 7 são básicos, e os abaixo de 7 são ácidos.
Nitrogênio Amoniacal (amônia)	É uma substância tóxica não persistente e não cumulativa e sua concentração, que normalmente é baixa, não causa nenhum dano fisiológico aos seres humanos e animais. Grandes quantidades de amônia podem causar sufocamento de peixes. Ela é formada no processo de decomposição de matéria orgânica (ureia- amônia). Em locais poluídos seu teor costuma ser alto. O caminho de decomposição das substâncias orgânicas nitrogenadas é chegar ao nitrato, passando primeiro pelo estágio de amônia, por isso, a presença desta substância indica uma poluição recente.
Fosfato (PO 4)	Os fosfatos são muito importantes para os seres vivos entrando na composição de muitas moléculas orgânicas essenciais. Pode provir de adubos, da decomposição de matérias orgânicas, de detergentes, de material particulado presente na atmosfera ou da solubilização de rochas. É o principal responsável pela eutrofização artificial. A liberação de fosfato na coluna d'água ocorre mais facilmente em baixas quantidades de oxigênio. O fosfato é indispensável para o crescimento de algas, pois faz parte da composição dos compostos celulares. O zooplâncton e os peixes excretam fezes ricas em fosfato. Seu aumento na coluna d'água aumenta a floração de algas e fitoplâncton
Temperatura	- Determinada espécie animal ou cultura vegetal cresce melhor dentro de uma faixa de temperatura. O mesmo para animais aquáticos e geralmente, reconhecemos três grupos de temperatura: água fria, água morna e água quente. Espécies de peixes água quente crescem melhor a temperatura de 25°C, mas se a temperatura ultrapassar os 32-35° C, o crescimento pode ser prejudicado. Bactérias, fitoplâncton, plantas com raízes, processos químicos e físicos que influenciam a qualidade do solo e da água também respondem favoravelmente ao aumento de temperatura. Microrganismos decompõem a matéria orgânica mais rápido a 30°C que a 25°C. A taxa da maioria dos processos que afetam a qualidade da água e do solo dobram a cada aumento de 10°C na temperatura.
Coliformes Totais	As bactérias do grupo coliforme são consideradas os principais indicadores de contaminação fecal. O grupo coliforme é formado por um número de bactérias que inclui os gêneros Klebsiella, Escherichia, Serratia, Erwenia e Enterobactéria. Todas as bactérias coliformes são gram-negativas manchadas, de hastes não esporuladas que estão associadas com as fezes de animais de sangue quente e com o solo. As bactérias coliformes fecais reproduzem-se ativamente a 44,5°C e são capazes de fermentar o açúcar. O uso da bactéria coliforme fecal para indicar poluição sanitária mostra-se mais significativo que o uso da bactéria coliforme "total", porque as bactérias fecais estão restritas ao trato intestinal de animais de sangue quente. A determinação da concentração dos coliformes assume importância como parâmetro indicador da possibilidade da existência de microrganismos patogênicos, responsáveis pela transmissão de doenças de veiculação hídrica, tais como febre tifoide, febre paratifoide, disenteria bacilar e cólera.
Índice de Qualidade	De acordo com os padrões da CETESB podem variar entre: Ótima 80 a 100, Boa 52 a 79, Aceitável 37 a 51, Ruim 20 a 36, Péssima 0 a 19. Tais índices são realizados através de análises laboratoriais. Para realizar o controle da poluição das águas dos rios e reservatórios, utilizam-se os padrões de qualidade, que definem os limites de concentração a que cada substância presente na água. Esses padrões dependem da classificação que é estabelecida por legislação específica, variando da Classe Especial, a mais nobre, até a Classe 4, a menos nobre.

Fonte: SABESP (2009).

Na determinação de Coliformes Totais e Fecais na água (CETESB, L5.531), por muitos anos, o grupo de coliformes foi a ferramenta utilizadas pelos sanitaristas na detecção de contaminação fecal no ambiente aquático, pois a elevada densidade dessas bactérias nas fezes e a frequente associação a presença de patógenos, acabou por se tornar um indicador de contaminação fecal.

No entanto, a generalidade de definição proposta em 1917 para esse grupo, englobando todos os bacilos Gram-negativos, não-esporulados, anaeróbios facultativos e que fermentam a lactose com produção de gás dentro de 48 horas a 35°C, comprometeu a utilização destas bactérias como indicador específico de contaminação fecal e acabou por incluir coliformes do gênero *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiela*, cuja origem não é exclusivamente fecal.

Tal fato levou ao desenvolvimento de métodos para enumerar novo subgrupo de coliforme, tendo na base para sua diferenciação a verificação da capacidade de fermentação da lactose em temperatura elevada (44,5°C), contudo, essa diferenciação em um novo subgrupo, coliformes termotolerantes, ainda compreendia o gênero *Klebsiela*, que comprometia a especificidade pretendida.

Assim, buscou-se detectar a especificidade da *E. coli*, que é o único componente do grupo coliforme e de origem fecal. Então, em 1982, Feng e Hartman mostraram que o substrato MUG (4- metilumbeliferil β -D Glucoronideo)

poderia ser adaptado a uma metodologia de detecção de *E. coli*, pois esta é a única do seu grupo capaz de produzir a enzima β -D Glucoronidase (GUR), que no substrato desenvolvido por Feng e Hartman, libera a substância 4-metilumbeliferona, a qual, sob luz ultravioleta (365 nm) produz uma fluorescência azul brilhante.

Assim foi possível se estabelecer uma metodologia quase fidedigna na detecção da contaminação das águas com material fecal, pois determinadas cepas de *E. coli*, do sorotipo O157:H7, responsável pela Colite Hemorrágica, não produz a enzima reativa ao substrato descrito, ocasionando falso negativo nos testes. Neste caso a Instrução Normativa 62 do MAPA descreve metodologia apropriada para os laboratórios de referência aprimorarem seus testes, em padronização mundial com a ALPHA.

Na Instrução Normativa no 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Secretaria de Defesa Agropecuária, de 26 de agosto de 2003, no Capítulo IX estão descritos os procedimentos para determinação do Número Mais Provável de Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes em amostras de água e gelo a serem usados em estabelecimentos produtores de alimentos. Estabelece:

- Prova Presuntiva, que se baseia na inoculação da amostra em caldo laurel-sulfato de sódio, que a presença de coliformes é evidenciada pela formação de gás nos tubos de Durhan, produzido

pela fermentação da lactose contida no meio;

- Prova Confirmativa para Coliformes Totais que é feita por meio da inoculação dos tubos positivos para a fermentação de lactose, na prova presuntiva, em caldo verde brilhante bile 2% lactose, e posterior incubação a 36 ± 1 °C, onde na presença de gás nos tubos de Durham do caldo verde brilhante evidencia a fermentação da lactose presente no meio; e ainda, de uma Prova Confirmativa para Coliformes Termotolerantes que é feita por meio da inoculação em caldo EC, com incubação em temperatura seletiva de $45 \pm 0,2$ °C a partir dos tubos positivos obtidos na prova presuntiva. A presença de gás nos tubos de Durham evidencia a fermentação da lactose presente no meio. O caldo EC apresenta em sua composição uma mistura de fosfatos que lhe confere um poder tamponante, impedindo a sua acidificação. A seletividade do meio se deve à presença de sais biliares, responsáveis pela inibição dos microrganismos Gram positivos.

Outro meio de se analisar a qualidade da água seria a utilização de “kits” comerciais já disponíveis no mercado. Pontelo e Aguiar (2012), realizaram um trabalho para validar o kit COLItest[®] para detecção de Coliformes Totais e E. coli na água avaliando os parâmetros de validação de métodos qualitativos através da repetição sistemática, precisão intermediária, robustez, limite de detecção e especificidade e por fim concluíram que o

Kit COLItest[®] atendeu a todos os requisitos avaliados.

3. Materiais e Métodos

Amostras do biocomposto de dejetos de suínos, bovinos e da cama de frango foram coletadas no dia zero e após 53 dias de biodigestão anaeróbia. Amostras de cerca de 5 g do composto foram coletadas com espátula e acondicionadas em tubo tipo Falcon, esterilizados, de 15 mL. Tal procedimento, como trata da coleta de excretas, não precisou ser submetido Comitê de Ética e Experimentação Animal do Instituto de Zootecnia, de acordo com as normas internas deste Comitê (<http://iz.sp.gov.br/pagina.php?id=62>).

Alíquotas de 0,1 mg foram pesadas, dissolvidas em 10 mL de água destilada, filtradas para retirada de debris mais grosseiros e novamente uma alíquota de 100 microlitros foi pipetada no frasco do Kit Colitest[®].

O teste se baseou na adição da amostra, completando-se o volume para 100 mL com água destilada, e a ele foi adicionado o meio de cultura COLItest[®] e homogeneizado até sua dissolução completa. As amostras, incluindo o controle (com água destilada) foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37 °C. A partir de 18 horas pode-se interpretar os resultados dos frascos positivos, devendo-se aguardar até 48h de incubação para os frascos negativos. No caso de resultado positivo, a presença de E. coli foi confirmada pela transferência de

5 mL, do frasco positivo, para um tubo de ensaio. O tubo de ensaio foi exposto a luz ultravioleta (365 nm), em transiluminador de UV. O ensaio será considerado positivo para *E. coli* se houver formação de fluorescência azul e, como ensaio confirmatório, após a leitura da fluorescência, foi adicionado no mesmo tubo 0,2 mL do revelador de Indol. O teste foi considerado positivo (presença de *E. coli*) se houve a formação de anel vermelho

4. Resultados e Discussão

Neste experimento, o período total que o material ficou acondicionado nos biodigestores foi de 53 dias e mostrou-se

insuficiente para adequado controle de Coliforme Totais e *E. coli* em 3 (três) biodigestores de bovinos (B1, B3 e B5) e um biocomposto da cama de frango (A3). Segundo Hahn *et al.* (2012), a cama de frango deve ser compostada por mais de 90 dias para garantir a morte de microrganismos entéricos como *E. coli*. O teste foi considerado negativo (ausência de coliformes totais) quando não houve alteração na coloração do meio (mantêm-se púrpura – figura 25) após o período de incubação e positivo o meio apresentou-se amarelado, com crescimento bacteriano. A prova de crescimento de *E. coli* foi realizada (figura 2 e 3) e todas as amostras com Coliformes totais apresentaram *E. coli*.

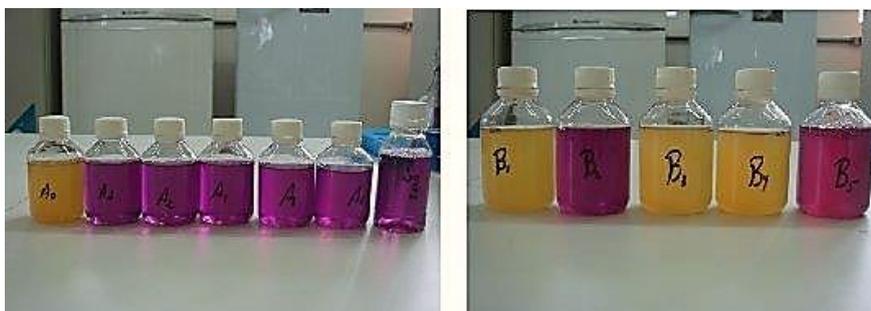


Figura 1. Teste das Amostras da Cama de Frango (A1, A2...A5) após 53 dias de biodigestão, onde A0 é a primeira coleta antes da compostagem por biodigestão e as amostragens A1 a A5 depois dos 53 dias. A amostra controle é a qualidade do ensaio. A direita, teste de amostras de dejetos de Bovinos (B1, B2...B5) após 53 dias de biodigestão. Observe a presença POSITIVA de Coliforme Totais nos frascos Amarelos (B1, B3 e B4).



Figura 2. Colitest® POSITIVOS em ensaio de exposição a luz ultravioleta (365nm), realizados com os Controle (A0, B0 e S0) e os POSITIVOS das amostras de bovinos B1, B3 e B4.

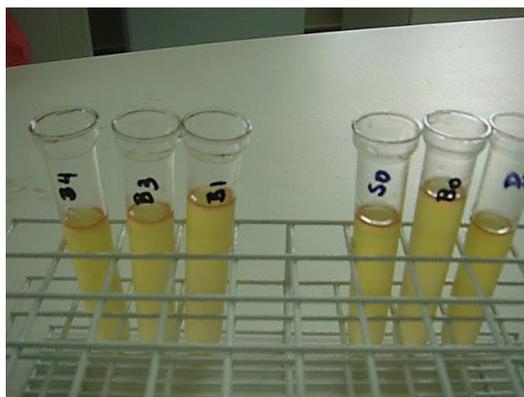


Figura 3. COLItest® confirmatório para a formação do anel vermelho nos tubos de ensaio positivos das amostras Controle (Ao, Bo, So) e B1, B3 e B4.

Embora a Instrução Normativa 357 do CONAM (2005) estabeleça contagem máxima de coliformes fecais em amostras, o simples fato de haver *E. coli* na amostra deve ser observado com cautela, principalmente quando se trata de biofertilizantes, que são na maioria das vezes destinados à hortas orgânicas.

Uma vez que o ciclo da *E. coli* é de apenas 20 minutos, o simples fato de a amostra ser positiva, compromete a qualidade do composto para este fim contudo, não descarta sua utilização em pastagem, como foi comprovado nos trabalhos acima citados nesta dissertação, bem como seu uso em culturas perenes, como café, laranja, manga etc.

Neste trabalho, 60 % das amostras de composto bovino apresentaram coliformes totais e *E. coli*. Este composto é o mais comum de ser reutilizado, uma vez que é produzido em grande quantidade.

O teste do tipo COLItest® é de baixo custo e com resultados em no máximo dois dias e pode evitar que *E. coli* seja espalhada em alimentos orgânicos que geralmente são ingeridos crus, fato muito comum em nossa sociedade (ARBOS *et al.*, 2010) e que deveria ter um cuidado mais especial dos Órgãos de Saúde Pública. A presença ou ausência de coliformes totais nas 15 amostras diferentes dos biodigestores pode ser observada na tabela 12.

Tabela 12. Resultados dos testes de Coliformes totais e E. coli, das amostras de composto após 53 dias de biodigestão, onde (a) refere-se a composto de dejetos de cama de frango; (b) a dejetos de bovinos e, (s) a dejetos de suínos. Fonte: elaborada pelos autores

amostras	coliforme total	E. coli
a1	n	n
a2	n	n
a3	(+)	(+)
a4	n	n
a5	n	n
b1	(+)	(+)
b2	n	n
b3	(+)	(+)
b4	n	n
b5	(+)	(+)
s1	n	n
s2	n	n
s3	n	n
s4	n	n
s5	n	n
controle	n	n

n= resultado negativo

(+) = positivo

5. Conclusões

O composto de dejetos suínos não apresentou coliformes totais ou E. coli nos ensaios microbiológicos, podendo ser indicado para uso em quaisquer atividades agrícolas. Os compostos de dejetos bovinos e de aves, apesar da presença de coliformes em algumas amostras, podem ser utilizados em pastagens ou culturas perenes, contribuindo para sustentabilidade da

atividade agropecuária, aproveitando resíduos altamente nutritivos e substituindo adubações químicas.

6. Referências

AMARAL, L.A., *et al.*; Redução de bactérias indicadoras de poluição fecal em estrume de aves de postura tratados por biodigestão anaeróbia. Rev. Bras. Cienc. Avic. v.2, n.1, 2000.

ANGONESE, A.R. et al;. Eficiência energética de sistema de produção de suínos com tratamento os resíduos em biodigestor . R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental, v.10, n.3, p.745–750, 2006.

ARBOS, K.A.; Freitas, R.J.S.; Stertz, S.C.; Carvalho, L.A. Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 30, 215-220, 2010.

CARRINGTON, *et al.*; Inactivation of Salmonella during anaerobic digestion of sewage sludge. Journal of Applied Bacteriology, v.53, p.331-4, 1982.

CETESB. Norma Técnica L5.531. Cia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <www.cetesb.sp.gov.br>. Acesso em: 09 jun.2013.

FURLONG, J. e PADILHA, T. Viabilidade de ovos de nematóides gastrointestinais de bovinos após passagem em biodigestor anaeróbico. Rev. Ciência Rural, Sta Maria, V.26, no2, p.269-271, 1996. LUCAS JR.e SANTOS, J. Avaliação do uso de inóculo no desempenho de biodigestores abastecidos com estrume de frangos de corte com cama de maravalha. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA

AGRÍCOLA,22, 1993. Ilhéus, BA. Anais... Ilhéus, BA:SBEA, CEPLAC, 1993 p.915-30.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa no 62 de 26 de agosto de 2003, para Oficializar os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água, capítulo IX.

PONTELO, K.T e AGUIAR, M.M.G. Validação de método alternativo para pesquisa de Coliformes Totais e Escherichia coli na água. Pós em Revista, 6. ed., [s.]: Núcleo de Publicações Acadêmicas do Centro Universitário Newton Paiva, 2012. Disponível em: <<http://npa.newtonpaiva.br/npa>>. Acesso em: 03 set. 2013.

ROMERA e SILVA, P.A. Aspectos do uso da água no meio rural-Manual hídrico e Sustentabilidade ambiental. Manual CETEC Capacitações, p.33-40, 2012. 33-40 SABESP Padrões de lançamento para Estações de Tratamento de Esgotos (ETE) domésticos. Reunião AESBE 10/02/09 .

SHIH, J.C.H.; Destruction of enteric pathogens in the thermophilic poultry wast digester. Poultry Science, v.63, p.181-2, supl., 1984. (abstracts)