

Comparação de três metodologias para quantificação de *Salmonella* sp. em efluentes de sistemas de tratamento de dejetos

Comparison of three methods for *Salmonella* sp. quantification in wastewater

Cinthia Alt Cavada¹, Fernanda Moraes Cardoso¹ & Verônica Schmidt²

RESUMO

O aumento da produção animal trouxe como consequência a geração de grande quantidade de dejetos os quais são destinados, após tratamento, à agricultura ou coleções de superfície. Entre os microrganismos presentes nos dejetos encontram-se as salmonelas. No meio ambiente esta bactéria torna-se uma importante fonte de transmissão e, conseqüentemente, potencial risco à produção animal e à saúde pública sendo que seu monitoramento se faz necessário. Neste sentido, compararam-se três metodologias para a quantificação de *Salmonella* sp. a fim de determinar a melhor técnica de estimativa do Número Mais Provável (NMP) a ser aplicado em efluentes de sistemas de tratamento de dejetos. Em cinco amostras de efluente, inocularam-se 10^5 a 10^6 UFC de *Salmonella* Typhimurium e determinou-se o NMP por três diferentes metodologias (A, B e C). Comparado às contagens bacterianas do inóculo de *Salmonella* Typhimurium, verificou-se que o NMP médio (4,441 UFC) no método A é bastante próximo a estas ($P > 0,05$). Por outro lado, o NMP médio observado nos métodos B (1,380 UFC) e C (3,204 UFC) diferem estatisticamente daquelas ($P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente). Como o método A foi aquele que demonstrou valores mais próximos de NMP às quantidades inoculadas, sugere-se a utilização desta metodologia para análise de efluentes.

Descritores: *Salmonella* sp., NMP, efluente.

ABSTRACT

The increase in animal production has increased the amount of effluents destined, most of times, to agriculture and aquatic resources. As the same of others enteric microorganisms, *Salmonella* is present in feces. In the environment *Salmonella* sp. become an important source of transmission and, consequently, a risk to animal production and public health. In this experiment, three methodologies for quantifying *Salmonella* sp. were compared, so as to determine the best estimation technique of the Most Probable Number (MPN) to be applied in liquid waste from effluent treatment systems. In this study, were used five water samples from an aquaculture tank. Compared to the bacterial count of the *Salmonella* Typhimurium's inoculum (10^5 a 10^6 CFU), it was verified that the average MPN (4.441 CFU) in method A is very similar to those counts ($P > 0.05$). On the other hand, the average MNP observed in method B (1.380 CFU) and C (3.204 CFU) are statistically different from them ($P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively). Considering that method A was the one to present MPN values closest to the inoculated amounts, the employment of this methodology is suggested for the analysis of effluents.

Keywords: *Salmonella* sp., MPN, wastewater.

INTRODUÇÃO

A percepção de que o meio ambiente é fundamental para a sobrevivência humana e de outros seres vivos é importante para que haja qualidade de vida e sustentabilidade ambiental e econômica. Este fato torna-se evidente quando falamos em produção agroindustrial. O Brasil possui o terceiro maior rebanho mundial de suínos e esta é uma atividade com grande impacto no meio ambiente, gerando alta carga poluidora e de grande geração de resíduos [24], os quais, normalmente, são utilizados como fertilizantes no solo. Entretanto, se mal manejados e não tratados adequadamente podem acabar comprometendo o solo e os reservatórios de águas superficiais e profundas, devido à alta concentração de matéria orgânica e nutriente existentes nestes dejetos [20].

O destino dos dejetos gerados nas granjas de suínos é importante na cadeia de transmissão da *Salmonella* sp. para humanos e animais, devido ao alto número desta bactéria encontrada nas fezes de suínos [13].

Estudos relatam uma alta prevalência de salmonela em suínos, mesmo naqueles aparentemente saudáveis. Nos EUA há registros de 40.000 a 60.000 casos de salmonelose humana anualmente, podendo chegar a 3 milhões [16].

Os dejetos provenientes da suinocultura são constituídos basicamente por fezes, urina, restos de ração e água sendo estes os resíduos que representam maior impacto nos recursos hídricos. Como consequência, eles acarretarão redução da disponibilidade de água, com limitação no desenvolvimento da agropecuária, aumento na concentração de elementos à água (cálcio, ferro, nitrato, fósforo...), potencialização da eutroficação, alterações da biodiversidade aquática, elevação do custo de produção e de vida da população [26].

Propor medidas ambientais através de políticas concretas de utilização dos nossos recursos hídricos, assim como a conscientização e capacitação dos produtores, é essencial para que não haja desperdício e sim preservação e conservação destes recursos, além do crescimento sustentável da suinocultura. Torna-se fundamental a necessidade de estudos que venham dar suporte para a definição de parâmetros técnicos que subsidiem as legislações ambientais para melhor identificar regiões que possam comportar limites de população animal sem agredir o agroecossistema [20].

O controle da salmonela nos rebanhos de suínos em todos os seus pontos críticos de produção, assim como o tratamento dos dejetos, é necessário para diminuir o impacto ambiental e o risco sanitário [32].

O objetivo deste estudo foi a comparar três diferentes metodologias para a quantificação de *Salmonella* sp., a fim de determinar o melhor método de Número Mais Provável – NMP a ser aplicado em efluentes de sistemas de tratamento de dejetos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizaram-se cinco amostras do efluente do Tanque para manutenção de estoque de peixes do Setor de Aquicultura da Universidade, onde foi determinada ausência de salmonelas [19]. Estas foram, então, contaminadas artificialmente com uma amostra de *Salmonella* Typhimurium, previamente isolada [30], utilizando-se 200 µL da suspensão bacteriana em caldo BHI em 200 mL da amostra do efluente, resultando em 10^5 a 10^6 UFC de salmonela inoculada por mililitro de efluente [29].

As amostras inoculadas foram submetidas a três metodologias, descritas a seguir, para determinação do Número Mais Provável (NMP) de salmonelas, as quais foram previamente utilizadas na determinação do NMP de salmonelas em alimento [8], em águas servidas [17] e em lagoa de tratamento de efluentes [29].

Método A [8]: Foram realizadas 5 diluições em triplicata. Para a primeira diluição, 10mL do efluente já inoculados com uma amostra de *Salmonella* Typhimurium foram adicionados à 90 mL de Água Peptonada 0,1%, obtendo-se a diluição 10^{-1} ; a partir desta, as diluições seguintes foram preparadas retirando-se 10mL da amostra já diluída e acrescentando à 90 mL de Água Peptonada 0,1%, até a diluição 10^{-5} . Estas foram incubadas a $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$; de cada diluição 0,1mL foi semeado em tubo contendo 9,9 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV – Merk®), os quais foram incubados a $42\pm 0,2^{\circ}\text{C}/18\text{h}$; de cada tubo, com auxílio de uma alça de platina, foi semeada uma alíquota em uma placa contendo Ágar Xilose-Lisina-Desoxicicolato (XLD-Merck®), a qual foi incubada à $37^{\circ}\text{C}/24$ horas.

Método B [17]: As diluições foram realizadas em triplicata. 0,1mL, 1mL e 10mL do efluente foram inoculados em 10mL, 99mL e 90mL de Água Peptonada Tamponada; estas foram incubadas a $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$; de cada diluição 0,1mL foi transferido para 9,9 mL de caldo RV e incubados a $42^{\circ}\text{C}/18$; de cada

tubo, com auxílio de uma alça de platina, uma alíquota foi semeada em placa de Ágar XLD, a qual foi incubada a 37°C/24h.

Método C [29]: Foram realizadas três diluições com cinco repetições. As diluições foram obtidas semeando-se 10 mL do efluente em 10mL do caldo RV em dupla concentração; 1mL e 0,1 mL do efluente em 10 mL de RV em concentração simples, incubadas à 42°C/24h. De cada tubo de RV, com auxílio de uma alça de platina, uma alíquota foi semeada em placa de Ágar XLD, as quais foram incubadas a 37°C/24h.

Nas três metodologias, de cada placa de XLD, pelo menos uma colônia com características morfológicas de salmonela foi repicada para confirmação de gênero [19].

Para interpretação dos resultados, as placas de XLD com confirmação de crescimento de *Salmonella* foram relacionadas às respectivas diluições em caldo Rappaport Vassiliadis (RV) ou Água Peptonada e organizadas segundo o número de tubos positivos em cada diluição, para determinação do NMP correspondente [8,17,29].

Frascos com amostras de efluente (1000mL) foram, ainda, encaminhados para análises de pH, condutividade elétrica, fósforo total, fosfato, DQO, alcalinidade total, amônio, nitrato, nitrito e sólidos totais [1].

Na análise estatística, a comparação entre a concordância dos resultados obtidos nas três técnicas de NMP e o inóculo foi realizada pelo teste de

Dunnett's para comparações múltiplas, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0., aplicando um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Em nenhuma das amostras retiradas do tanque de piscicultura foi identificada a presença de *Salmonella* sp.

As amostras contaminadas artificialmente com *Salmonella* Typhimurium resultaram num inóculo que, comparado às metodologias empregadas, foi diferente significativamente nos métodos B (P<0,001) e C (P<0,01). O método A, por outro lado, apresentou, consultando a tabela do NMP, maior proximidade de resultados comparados aos valores inoculados. Desta forma, pelo método A foi possível inferir quantitativamente a presença de salmonelas nos materiais analisados, apresentando uma contagem bastante próxima ao inoculado (P>0,05) (Tabela 1).

Os métodos A e B empregados neste experimento, dependem de um dia a mais do que o método C para obtenção dos resultados. Entretanto, o método C foi o mais dispendioso, devido à utilização de RV em dupla concentração, tendo um custo 9,2% e 32,0% maior que os métodos A e B, respectivamente (Figura 1).

Os resultados físico-químicos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Número de unidades formadoras de colônias (Log₁₀) de *Salmonella* Typhimurium inoculadas e recuperadas (NMP) em meio líquido, segundo o método utilizado.

Amostra	Inóculo	Métodos		
		A	B	C
1	3,954	5,380	1,380	3,204
2	5,204	1,362	1,380	3,204
3	5,982	5,041	1,380	3,204
4	6,000	5,041	1,380	3,204
5	6,292	5,380	1,380	3,204
Média ± dp ¹	5,487 ^a ± 0,95	4,441 ^a ± 1,73	1,380 ^b ± 0,0	3,204 ^c ± 0,0

dp = desvio padrão; letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,001).

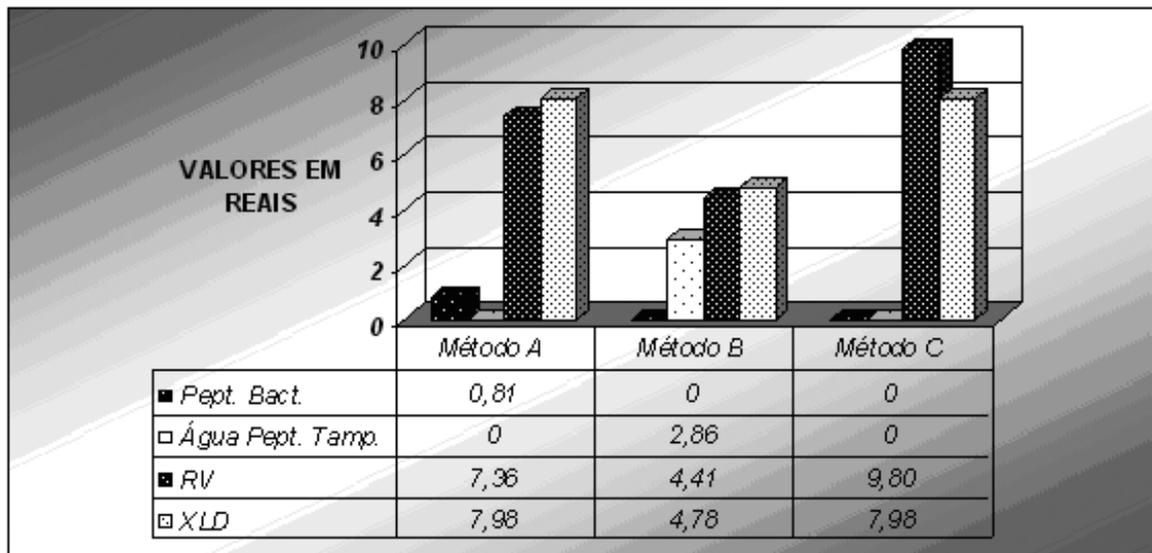


Figura 1. Análises de custo dos Métodos A (Escartín *et al.*, 2000), Método B (Koivunen *et al.*, 2003) e Método C (Sanguinetti *et al.*, 2005) para determinação do NMP de salmonelas.

Tabela 2. Resultados físico-químicos da água de um tanque de piscicultura e parâmetros para Água Doce Classe 2 (CONAMA) .

DETERMINAÇÕES	Amostras				CONAMA 357/2005
	01	02	03	04	
pH	4,8	6,2	5,8	5,5	6,0 a 9,0
Condutividade Elétrica – µS/cm	279	259	264	251	nr
Fósforo Total – mg/L	2,1	2,1	3,4	3,1	0,030 mg/L
P-PO ₄ ⁻³ (Fosfato) – mg/L	1,9	1,9	3,4	3,1	nr
DQO – mg O ₂ /L	18	30	41	68	nr
Alcanilidade Total – mg CaCO ₃ /L	1,7	1,9	4,5	3,1	nr
N-NH ₄ ⁺ (Amônio) – mg/L	1	1,3	2,2	2,3	3,7 mg/L N
N-NO ₃ ⁻ (Nitrato) – mg/L	9,4	8,2	12	12	10,0 mg/L
N-NO ₂ ⁻ (Nitrito) – µg/L	74	36	1030	55	1,0 mg/L
Sólidos Totais – mg/L	205	224	286	259	500 mg/L
Temperatura	21°C	23°C	21°C	26°C	

nr = não referido

DISCUSSÃO

A ausência de isolamento de salmonelas nas amostras do tanque de piscicultura pode indicar ausência ou um volume de células viáveis/culturáveis abaixo do limite de detecção do método (até 3 NMP/100 mL) [1] não interferindo, portanto, nos resultados dos métodos de quantificação pelo NMP.

A diferença entre a quantidade de UFC do inóculo e o NMP determinado pelos métodos B e C, pode ser devido ao fato de que nestes não houve discriminação nos valores obtidos, uma vez que as estimativas de contagem, segundo a tabela do NMP, resultaram sempre em valores ≥ 24 e ≥ 1600 UFC, respectivamente. Já pelo método A foi possível inferir

quantitativamente a presença de salmonelas nos materiais analisados, apresentando uma contagem bastante próxima ao inoculado. Esta metodologia foi igualmente a melhor identificada em embutidos de carne suína, onde este método foi aquele que demonstrou valores médios de NMP mais próximo das quantidades inoculadas [2].

Nos métodos B e C a quantidade de inóculo foi superior à capacidade de detecção dos métodos. Nestes casos, consideram-se que com quantidades menores de inóculo os métodos responderiam melhor à discriminação dos valores de salmonelas a serem detectadas por estas metodologias. Entretanto, concentrações elevadas deste microrganismo são esperadas tanto em efluentes de origem animal [16] quanto humana [17].

Estudos comparativos entre metodologias alternativas para quantificação de salmonelas têm sido amplamente divulgados, onde, por vezes, não é observada eficiência dos métodos [7]. Entretanto, em muitos trabalhos são descritas metodologias que parecem adequar-se à quantificação de salmonelas [10, 11,28] apresentando, inclusive, baixo custo e menor tempo para análises possibilitando, assim, a análise de várias amostras simultaneamente.

Entretanto, as metodologias clássicas de NMP utilizadas são dispendiosas e demandam tempo e recursos financeiros dos laboratórios [5,15], não sendo apropriados para extensas análises. Este fato pode ser constatado no presente estudo comparando o tempo (em dias) necessário para a realização dos métodos, tanto quanto a diferença de custo entre estes.

Uma preocupação crescente quanto à eliminação de salmonelas no ambiente deve-se ao fato de que este microrganismo pode manter-se viável em sedimentos por muito tempo e a resistência de linhagens de *Salmonella* aos antimicrobianos e sua multiresistência representa um risco à saúde pública [17,30]. Neste caso, o tratamento de efluentes minimiza a descarga de patógenos no meio ambiente. Porém, um tratamento de efluentes convencional ainda contém um grande número de bactérias entéricas, sendo necessário um tratamento terciário para que estes microrganismos sejam eficientemente removidos [31].

A presença de elevado número de suínos portadores de salmonelas tem sido demonstrada sendo que estes possuem uma excreta intermitente do agente e, conseqüentemente, apresentam baixa contagem

bacteriana nas fezes sendo que um percentual baixo de positividade para *Salmonella* sp. em efluentes corresponde a lotes com alta contaminação [10].

Considerando-se a legislação brasileira [4], para ser lançado em um corpo hídrico o efluente deverá possuir características qualitativas iguais ou melhores que este. Os resultados físico-químicos observados demonstram que as amostras de efluente utilizadas encontrava-se em desacordo com os parâmetros de águas de classe 2, destinadas à aquicultura e à atividade de pesca.

Entre os parâmetros analisados, o pH e a temperatura são considerados fatores essenciais na redução/eliminação de coliformes e salmonela [31], sendo que a combinação destes dois parâmetros é a chave para o controle do risco de disseminação de salmonela [10]. A temperatura elevada dos dejetos aumenta a atividade biológica e tem como resultado a eliminação de microorganismos [17]. No caso deste estudo, a segunda amostra foi aquela que apresentou um pH maior e dentro do esperado pela legislação [4] e, coincidentemente, foi aquela que menos recuperou a *Salmonella* Typhimurium quando analisado pelo método A. Durante este estudo, a temperatura da água do tanque (Tabela 2) variou de 21°C a 26°C, fator que provavelmente tenha sido prejudicial ao crescimento microbiano.

A DQO tem sido apontada como uma variável associada à presença de salmonela [14]. Entretanto, este fato não foi constatado no presente trabalho, uma vez que as amostras 1 e 4 foram aquelas nas quais se recuperaram uma quantidade similar ao inóculo utilizado (método A), independente de a DQO ter sido maior na amostra 4 (tabela 2). Outros estudos têm demonstrado que a redução na concentração de DQO, DBO, os sólidos suspensos e o fósforo total estão relacionados com a diminuição de bactérias entéricas [17].

Embora os parâmetros analisados indiquem que a água do tanque analisado não causariam dano à sobrevivência de peixes, se lançada no ambiente aquático, este efluente não seria considerado passível de ser liberado nos corpos d'água sem tratamento prévio [4]. De um modo geral, os efluentes de piscicultura não são tratados [23] e, considerado os resultados obtidos, comprova-se a necessidade da utilização de sistemas de tratamento de efluentes também na piscicultura.

O tratamento de dejetos é uma ferramenta utilizada para minimizar os riscos de infecções por microrganismos patogênicos [17]. Entretanto, vários estudos indicam que o tratamento de dejetos não é uma garantia de eliminação completa dos microrganismos. No caso da presença de *Salmonella* sp., existe a possibilidade de seleção de linhagens mais virulentas e, portanto, medidas de controle devem ser adotadas nos rebanhos para atenuar os riscos de transmissão de salmonelose [9], seja para a espécie humana ou animal. *Salmonella* tem sido observada em sistemas de tratamento de água [14] e no efluente de sistemas de tratamento de dejetos [5,29,30].

Medidas como o tratamento de efluentes juntamente com controles microbiológicos e físi-

co-químicos irão amenizar os riscos de distribuição e consequente consumo de água contaminada às comunidades urbanas e rurais (humanas ou animais).

Enquanto os dejetos de origem animal forem tratados à parte do processo de criação, sem a devida compreensão dos riscos iminentes à degradação do meio ambiente, as perdas futuras tanto econômicas quanto sociais serão imensas [25].

O monitoramento de sistemas para o tratamento de dejetos é uma importante ferramenta à gestão ambiental e a quantificação de salmonelas apresenta-se como um possível indicador bacteriano ao monitoramento destes sistemas, especialmente na cadeia suínica.

REFERÊNCIAS

- 1 American Public Health Association. 1991.** Standart methods for the examination of water and wastewater. 18th edn. Washington: Apha, 702p.
- 2 Borowsky L.M. 2005.** Comparação de dois métodos de quantificação de *Salmonella* sp. em embutidos suínos. 57f. Porto Alegre. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 3 Borowsky L.M., Schmidt V. & Cardoso M. 2007.** Estimation of most probable number of *Salmonella* in minced pork samples. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38(3): 544-546.
- 4 Brasil. 2005.** Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. *Diário Oficial da União*, Seção 1: 58-63.
- 5 Chinivasagan H.N., Thomas R.J., McGahan E., Gardner E.A. & Blackall P.J. 2004.** Microbiological status of piggery effluent from 13 piggeries in the south east Queensland region of Australia. *Journal of Applied Microbiology*. 97(5): 883-891.
- 6 Davies P.R., Turkson P.K., Funk J.A., Nichols M.A., Ladely S.R. & Fedorka-Cray P.J. 2000.** Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from feces of naturally infected pigs. *Journal of Applied Microbiology*. 89(1): 169-177.
- 7 Drca M., Philipp W. & Böhm R. 2005.** A comparison of three methods for isolation of *Salmonella* from biological waste. Boxter, The Netherlands: ISAH. Disponível em: <http://www.isah-soc.org/documents/2005/sections/61_vol_2.pdf>. Acessado em: 08/2008.
- 8 Escartín E.F., Lozano J.S. & Garcia O.R. 2000.** Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. *International Journal of Food Microbiology*. 54(1-2): 19-25.
- 9 Espigares E., Bueno A., Espigares M. & Gálvez R. 2006.** Isolation of *Salmonella* serotypes in wastewater and effluent: effect of treatment and potential risk. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 209(1): 103-107.
- 10 Fablet C.H., Robiault C., Jolly J.P., Collet M., Chemaly M., Labbé A., Madec F. & Fravallo. 2006.** *Salmonella enterica* level in French pig farms effluents: experimental and field data. *Livestock Science*. 102(3): 216-225.
- 11 Fravallo P., Hascoet Y., Le Iellic M., Queguiner S., Petton J. & Salvat G. 2003.** Convenient method for rapid and quantitative assessment of *Salmonella enterica* contamination: the mini-MSRV-MPN technique. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 11(2): 81– 88.
- 12 Harvey R.W.S. & Price T.H. 1980.** *Salmonella* isolation with Rappaport's medium after pre-enrichment in buffered peptone water using a series of inoculum ratios. *Journal of Hygiene*. 85(1):125-128.
- 13 Heinonen-Tanski H., Niskanen E.M., Salmela P. & Lanki E. 1998.** *Salmonella* in animal slurry can be destroyed by aeration at low temperatures. *Journal of Applied Microbiology*. 85(2): 277–281.
- 14 Howard I., Espigares E., Lardelli P., Martin J.L. & Espigares M. 2004.** Evaluation of microbiological and physicochemical indicators for wastewater treatment. *Environmental Toxicology*. 19(3): 241-249.

- 15 **Hussong D., Enkiri N.K. & Burge W.D. 1984.** Modified agar medium for detecting environmental salmonellae by the most-probable-number method. *Applied and Environmental Microbiology*. 48(5): 1026-1030.
- 16 **Kich J.D. & Cardoso M. 2004.** *Salmonella* em suínos: segurança alimentar e situação do Brasil. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=artigos&cod_artigo=30>. Acessado em: 08/2008.
- 17 **Koivunen J., Siitonen A. & Heinonen-Tanski H. 2003.** Elimination of enteric bacteria in biological-chemical wastewater treatment and tertiary filtration units. *Water Research*. 37(3): 690-698.
- 18 **McKay A.M. 1992.** Viable but non-culturable forms of potentially pathogenic bacteria in water. *Letters in Applied Microbiology*. 14(4): 129-135.
- 19 **Michael G.B., Simoneti R., Cardoso M.R.I. & Costa M. 2002.** Sorotipos de *Salmonella* isolados em uma propriedade de suínos de terminação no sul do Brasil. *Ciência Rural*. 32(3): 525-527.
- 20 **Miranda C.R. 2007.** Aspectos ambientais da suinocultura brasileira. In: Seganfredo, M. A. (Coord.). *Gestão Ambiental na Suinocultura*. Brasília: Embrapa, pp.15-35.
- 21 **Neder R.N. 1992.** *Microbiologia: manual de laboratório*. São Paulo: Nobel, 138p.
- 22 **Nollet N., Houf K., Dewulf J., DeKruif A., DeZutter L. & Maes D. 2005.** *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. *Veterinary Research*. 36(4): 645-656.
- 23 **Palhares J.C.P. 2006.** Criação integrada entre piscicultura e suinocultura. In: *Anais do V Seminário Internacional de Aves e Suínos* (Florianópolis, Brasil). pp.15-26.
- 24 **Palhares J.C.P. & Calijuri M.C. 2007.** Impacto de sistemas de produção suinícola na qualidade dos recursos hídricos. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. Disponível em: <<http://www.porkworld.com.br/index.php?documento=1037>>. Acessado em: 07/2007.
- 25 **Palhares J.C.P. & Calijuri M.C. 2007.** Caracterização dos afluentes e efluentes suinícolas em sistemas de crescimento terminação e qualificação de seu impacto ambiental. *Ciência Rural*. 37(2): 502-509.
- 26 **Palhares J.C.P. & Jacob A.D. 2007.** Impacto ambiental da suinocultura nos recursos hídricos. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. Disponível em: <<http://www.porkworld.com.br/index.php?documento=1032>>. Acessado em: 04/2008.
- 27 **Pundsack J.W., Hicks R.E. & Axler R.P. 2005.** Effect of alternative on-site wastewater treatment on the viability and culturability of *Salmonella choleraesuis*. *Journal of Water Health*. 3(1): 1-14.
- 28 **Robinault C., Chemaly M., Flabet C., Labbé A., Jolly J.P., Madec F. & Fravallo P. 2005.** Influence and interaction of different parameters on the survival of two strains of *Salmonella enterica* in pig slurry. Warsaw, Poland: ISAH., p.314-316. Disponível em: <http://www.isah-soc.org/documents/2005/sections/73_vol_2.pdf>. Acessado em: 09/2009.
- 29 **Sanguinetti G.S., Tortul C., Garcia M.C., Ferrer V., Montagero A & Strauss M. 2005.** Investigating helminth eggs and *Salmonella* sp. In stabilization ponds treating septage. *Water Science & technology*. 51(12): 239-247.
- 30 **Schmidt V. & Cardoso M.R.I. 2003.** Sobrevivência e perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* sp. isoladas em um sistema de tratamento de dejetos de suínos. *Ciência Rural*. 33(5): 881-888.
- 31 **Schmidt V., Gottardi C.P.T., Santos M.A.A. & Cardoso M.R.I. 2002.** Perfil físico-químico e microbiológico de uma estação de tratamento de dejetos de suínos. *ARS Veterinária*. 18(3): 287-293.
- 32 **Strauch D. 1991.** Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. *Revue Scientifique et Technique*. 10(3): 813-846.