

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**COMPARAÇÃO DE TRÊS METODOLOGIAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE
Salmonella sp. EM EFLUENTES DE SISTEMAS DE TRATAMENTO DE
DEJETOS.**

Cinthia Alt Cavada

PORTO ALEGRE

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**COMPARAÇÃO DE TRÊS METODOLOGIAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE
Salmonella sp. EM EFLUENTES DE SISTEMAS DE TRATAMENTO DE
DEJETOS**

Cinthia Alt Cavada

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, na especialidade de Epidemiologia, Saneamento e Profilaxia.

Orientador: Prof. Dra. Verônica Schmidt

PORTO ALEGRE

2008

C376c Cavada, Cinthia Alt

Comparação de três metodologias para quantificação de *Salmonella* sp. Em efluentes de sistemas de tratamento de dejetos. / Cinthia Alt Cavada. – Porto Alegre: UFRGS, 2008.

68 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2008. Verônica Schmidt, Orient.

1. Bacteriologia 2. *Salmonella*: aplicações da epidemiologia
3. *Salmonella* sp.: suínos 4. *Salmonella*: controle sanitário I. Schmidt, Verônica, Orient. II. Título.

CDD 619.4

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Cinthia Alt Cavada

Dissertação “Comparação de três metodologias para quantificação de *Salmonella* sp. em efluentes de sistemas de tratamento de dejetos”, aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovada em

APROVADA POR:

Prof^ª. Dra. Verônica Schmidt
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof^ª. Dra. Andrea Troller Pinto
Membro da Comissão

Prof^ª. Dra. Luciana Ruschel dos Santos
Membro da Comissão

Prof. Dr. Guiomar Pedro Bergmann
Membro da Comissão

Aos meus filhos Eugênio e Arthur, pelos dias sem almoço.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por terem acreditado e investido em mim.

Ao Fábio, pelo companheirismo e apoio.

À amiga e companheira de trabalho Solange Longaray, pelo apoio e colaboração.

À amiga e companheira de luta Rosaura Heck, pelo incentivo e apoio.

À amiga Jane Mari Corrêa Both, pelo incentivo e colaboração.

À Prof^ª Verônica, pela confiança e orientação acadêmica.

Aos colegas do Setor de Medicina Veterinária Preventiva, pela colaboração, apoio técnico e incentivo oferecidos durante a realização deste trabalho.

À bibliotecária Ana Vera Finardi Rodrigues, pela paciência e apoio.

À Coordenação da EVSPIS, pelo incentivo e apoio.

RESUMO

O aumento da produção suinícola trouxe consigo uma grande quantidade de dejetos que, muitas vezes, são destinados à agricultura ou piscicultura. Sendo os suínos, na maioria das vezes, portadores assintomáticos de *Salmonella* sp., excretam a bactéria nas fezes. Desta forma, no meio ambiente torna-se uma importante fonte de transmissão e, conseqüentemente, fonte de risco à produção animal e à saúde pública. A contaminação das bacias hidrográficas e do ambiente, de maneira geral, tem provocado cada vez mais preocupação nas comunidades rurais e urbanas. Neste experimento, compararam-se três metodologias para a quantificação de *Salmonella* sp. a fim de determinar a melhor técnica da estimativa do Número Mais Provável (NMP) a ser aplicado em efluentes de sistemas de tratamento de dejetos. Na primeira fase deste estudo, utilizaram-se quatro amostras de água de um tanque de piscicultura da Faculdade de Agronomia da UFRGS e uma de água peptonada tamponada, todas artificialmente contaminadas. Também foram realizadas análises físico-químicas (pH, condutividade, fósforo total, fosfato, DQO, alcalinidade total, amônio, nitratos, nitrito, sólidos totais e temperatura) das amostras do tanque de piscicultura. Na segunda fase, utilizaram-se as três metodologias de NMP em três amostras de intestino de suínos coletadas em um frigorífico do Estado do Rio Grande do Sul. Comparado às contagens bacterianas do inoculo de *Salmonella* Typhimurium (10^5 a 10^6 UFC), 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). Na segunda fase do experimento não houve crescimento de *Salmonella* sp. nas três amostras analisadas. Como o método A foi aquele que demonstrou valores mais próximos de NMP das quantidades inoculadas, sugere-se a utilização desta metodologia para análise de efluentes.

Palavras-chave: *Salmonella* sp., NMP, dejetos suínos, piscicultura

ABSTRACT

The increase in swine production has increased the amount of effluents destined, most of times, to agriculture or aquaculture. Given the fact swine are very often asymptomatic hosts of *Salmonella* sp., they excrete this bacterium in their faeces, which, once in the environment, become an important source of transmission and, consequently, a risk to animal production and public health. The contamination of hydrographic basins and the environment has become an increasing cause for concern in rural and urban communities. 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 the first stage of this study, four water samples from an aquaculture tank from the Faculty of Agronomy of UFRGS and one sample of buffered peptone water were used, all of them artificially contaminated. Physical-chemical analyses of samples from the aquaculture tank were also performed (pH, conductivity, total phosphorus, phosphate, COD, total alkalinity, ammonia, nitrates, nitrites, total solids and temperature). In the second stage, three MPN methodologies were used in samples from three swine intestines, collected from a slaughterhouse in the Rio Grande do Sul State. 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). In the second stage of the experiment, no *Salmonella* sp. growth was observed in the three analysed samples. Considering that method A was the one to present MNP values closest to the inoculated amounts, the employment of this methodology is suggested for the analysis of effluents.

Key words: *Salmonella* sp., MNP, swine effluents, aquaculture

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Gráfico comparativo das análises de custos dos métodos A, B e C	47
----------	---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Número de unidades formadoras de colônias (Log_{10}) de <i>Salmonella</i> Typhimurium inoculadas e recuperadas (NMP) em meio líquido, segundo o método utilizado.....	45
TABELA 2	Resultados físico-químicos da água do tanque de piscicultura 2E e parâmetros para Água Doce Classe 2.....	49

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Suinocultura no Brasil	14
2.2 Piscicultura no Brasil	15
2.3 Consórcio Suíno-Peixe	16
2.4 Aspectos Físico-Químicos e Microbiológicos dos Dejetos de Suínos	17
2.4.1 Aspectos Físico-Químicos dos Dejetos de Suínos	17
2.4.1.1 Volume Produzido pelos Dejetos de Suínos	19
2.4.2 Características Microbiológicas dos Dejetos de Suínos	20
2.5 Impacto Ambiental	21
2.6 Legislação Brasileira	24
2.7 Tratamento de Dejetos	27
2.7.1 Sistemas de tratamento de dejetos suínos	29
2.7.2 Monitoramento	30
2.7.2.1 Indicadores	32
2.7.2.2 <i>Salmonella</i> sp	33
2.7.2.2.1 <i>Salmonella</i> sp. em Humanos e Animais	34
2.7.2.3 Metodologia para Identificação Qualitativa e Quantitativa de <i>Salmonella</i> sp	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Comparação entre três metodologias para determinação do NMP de <i>Salmonella</i> sp	39
3.2 Reativação da Amostra de <i>Salmonella</i> Typhimurium - S607	40
3.3 Preparo do Inoculo	40
3.4 Contagem de <i>Salmonella</i> sp. em Salinas	40
3.5 Determinação qualitativa de <i>Salmonella</i> sp	41
3.6 Métodos de determinação quantitativa de <i>Salmonella</i> sp. (NMP)	41
3.7 Estimativa do Número Mais Provável de <i>Salmonella</i> sp. em amostras	

de intestino de suínos.....	42
3.8 Provas Bioquímicas.....	43
3.8.1 Teste de TSI.....	43
3.8.2 Teste de LIA.....	43
3.8.3 Teste de Uréia.....	43
3.9 Controle de Qualidade.....	44
3.10 Análise Estatística.....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
APÊNDICES	
APÊNDICE A.....	66
APÊNDICE B.....	67
APÊNDICE C.....	68

1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso imprescindível à civilização humana, de domínio público, qualitativamente limitado e dotado de grande valor econômico. O seu uso de maneira inadequada tende ao desperdício e à contaminação. Conforme Palhares (2007c), o monitoramento da água é essencial para que a sua disponibilidade em quantidade e qualidade não seja uma preocupação para as sociedades.

Segundo Telles (2002 apud TIAGO e GIANESELLA, 2003), a água é utilizada na agricultura (70%), indústria (20%) e higiene e consumo direto da população (10%).

No Brasil, a gestão dos recursos hídricos, durante muito tempo, ficou reduzida à avaliação quantitativa das reservas, especialmente a produção de energia (BRASIL, 1997). A partir da década de 1990, com a Política Nacional de Recursos Hídricos (PNRH), instituída pela Lei 9.433 de 08 de janeiro de 1997 (BRASIL, 1997), houve a opção brasileira pelo princípio do aproveitamento múltiplo e integrado dos recursos hídricos com um modelo de gestão de águas que contemplasse, simultaneamente, aspectos quantitativos e qualitativos (LIBÂNIO; CHERNICHARO; NASCIMENTO, 2005).

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, sustentabilidade ambiental e econômica. Este fato torna-se evidente quando falamos em produção agroindustrial. A produção de suínos no Brasil, que segundo Palhares e Calijuri (2007b) é o terceiro maior rebanho mundial, é uma atividade com grande impacto no meio ambiente, gerando alta carga poluidora e de grande geração de resíduos. Normalmente eles são utilizados como fertilizantes que mal manejados e tratados 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 (MIRANDA, 2007).

No Estado de Santa Catarina é realizada a integração piscicultura/suínocultura, técnica utilizada pelos chineses há mais de mil anos e validada pela FAO/ONU por sua inserção social. A utilização de dejetos de suínos no cultivo de peixes é o principal sistema na criação de diversas espécies de peixes. Embora esta cadeia produtiva seja reconhecida em todas as partes do mundo e do Brasil, ainda é contestada do ponto de vista ambiental (PALHARES, 2006).

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 (HEINONEN-TANSKI *et al.*, 1998).

Estudos relatam a 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 alcançar a 3 milhões (KICH; CARDOSO, 2004). Portanto, a salmonela destaca-se como um microorganismo com potencialidade de causar toxinfecções de origem alimentar (BESSA; COSTA; CARDOSO, 2004).

Os dejetos provenientes da suinocultura são constituídos basicamente por fezes, urina, restos de ração e água. Estes resíduos são os que representam maior impacto nos recursos hídricos. Como conseqüência, 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 (PALHARES; JACOB, 2007).

Embora a questão da poluição do ambiente tenha cada vez mais espaço na mídia, a utilização dos nossos recursos hídricos, principalmente relacionados à produção animal, ainda não está entendida pela população que pouca ou nenhuma importância dá ao fato.

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 a 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 (MIRANDA, 2007).

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 (STRAUCH, 1991).

Avaliar este impacto através da quantificação de *Salmonella* sp. passa ser um importante indicador de possível contaminação.

O objetivo deste estudo foi a comparação de 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.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Suinocultura no Brasil

A suinocultura é uma atividade importante para a economia brasileira, pois gera emprego e renda e o setor fatura mais de R\$ 12 bilhões por ano (PERDOMO; LIMA; SCOLARI, 2006).

O Brasil, tendo o quarto maior plantel suíno do mundo, possui um rebanho superior a 37 milhões de cabeças e produziu no ano passado 3 milhões de toneladas (DAL BOSCO, 2008). A Região Sul possui 45,4% do rebanho de suínos e Santa Catarina lidera o ranking nacional com 20,4% dos animais (ROCHA; PINTO, 2008), aproximadamente 8,6 milhões de cabeças, seguido por Rio Grande do Sul com 6,1 milhões e do Paraná com 5,1 milhões, segundo a Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (DAL BOSCO, 2008).

O Brasil exporta atualmente para 76 países (ROCHA; PINTO, 2008). Segundo a ABIPECS, o Brasil exportou em junho deste ano 51.731 toneladas de carne suína, 2,77% a mais do que no mesmo período do ano passado (ROCHA, 2008).

Apesar da carne suína apresentar um alto valor protéico, no Brasil o seu consumo está em terceiro lugar, atrás da carne de frango (1º lugar) e da bovina (2º lugar) (TALAMINI, 2005). No ano passado, o Brasil teve um consumo per capita de apenas 13 Kg, grande parte (70%) em embutidos ou de produtos industrializados (TALAMINI, 2005), enquanto que na Áustria o consumo foi de 73,1 kg por habitante, na Espanha de 66 kg e no Paraguai de 26 Kg (ROCHA; PINTO, 2008).

Na ausência de consumidores brasileiros, o país mantém um comércio internacional com grandes potências consumidoras, faturando no ano passado US\$ 1,23 bilhão o que o faz também o quarto maior exportador do globo (DAL BOSCO, 2008).

Os principais importadores são o Japão (32%), Rússia (16,7%), Estados Unidos (15,6%), México (9,3%) e Hong Kong (7,8%) absorvendo, juntos, 82% das importações (TALAMINI, 2005).

Há dois anos, existe um movimento da Associação Brasileira de Criadores de Suínos (ABCS) que tem por objetivo descobrir porque a população brasileira não segue as estatísticas internacionais no consumo de carne suína para que se possa assim, reverter esta situação (ROCHA; PINTO, 2008). Segundo Santos Filho, Chiuchetta e Talamini (2000), devem-se considerar o valor alto dos produtos industrializados, inacessíveis à maior parte da população brasileira, e a visão cultural de certas populações, como no caso do povo nordestino, que acreditam ser a carne suína maléfica à saúde (carne remosa).

Com um mercado mundial crescente, a suinocultura tem passado, nas últimas décadas, por profundas alterações tecnológicas, cujos objetivos são o aumento da produtividade e a redução dos custos de produção. Segundo Mores e Zanella (2005), o rebanho suíno brasileiro tem uma situação sanitária muito boa apresentando índices produtivos semelhantes aos países onde a suinocultura é desenvolvida.

Porém, devido ao aumento da produtividade da suinocultura, passou-se a produzir grandes quantidades de dejetos em pequenas extensões de terra (sistemas confinados), com conseqüentes problemas com o mau cheiro, oriundo das criações e do destino dos efluentes (PERDOMO; LIMA; SCOLARI, 2006).

A necessidade de produzir mais e com rentabilidade melhor, sem abrir mão da qualidade dos produtos e da preocupação com o meio ambiente, passa pelo uso racional dos recursos hídricos e também pela redução do volume, do destino e do tratamento a serem dados aos dejetos gerados por esta produção. Ou seja, o manejo adequado dos dejetos irá influenciar diretamente na diminuição dos riscos de doenças de veiculação hídrica.

2.2 Piscicultura no Brasil

Pelas suas excelentes condições hidrográficas e climáticas, o Brasil tem um enorme potencial para a aquíicultura, sendo a piscicultura uma alternativa para o meio rural com grande potencial de produção (BARCELLOS, 2006). Todavia, sem manejo e/ou utilização adequada dos recursos aquíferos, a demanda crescente da aquíicultura pode levar à deterioração da qualidade e quantidade de água e conseqüente degradação do ambiente e das atividades sócio-econômicas.

A melhor maneira de controlar os impactos decorrentes da emissão dos efluentes da aqüicultura é o emprego de práticas de manejo adequadas, com o aproveitamento racional da água e a eliminação de resíduos sem maiores danos ao meio ambiente. A exigência de água de boa qualidade é essencial, pois se poluída, irá comprometer a continuidade do cultivo.

Os dejetos de suínos são utilizados como fertilizante em sistemas de criação em piscicultura na produção de organismos planctônicos, ricos em proteína bruta, que servirão de alimentação aos peixes. Por outro lado, o cultivo de peixe, devido aos seus efluentes, também é uma atividade com um elevado potencial poluidor. Isto por que, a atividade produz um ambiente rico em nutrientes com presença de compostos nitrogenados (amônia), fósforo, matéria orgânica, restos de ração e demais produtos utilizados na produção de peixes ou resultados do metabolismo dos mesmos (SOUZA, 2007).

A eutroficação, fenômeno causado pelo excesso de nutrientes (fósforo e nitrato), leva à proliferação excessiva de algas, com conseqüente esgotamento de oxigênio na água resultando na asfixia dos peixes (LUDKE; LUDKE, 2003).

Mesmo assim, a piscicultura é considerada uma atividade de futuro que pode ser, além da suinocultura, consorciada com produções de outros animais. Tem como vantagem manter o homem no campo e a produção de proteína de alta qualidade e baixo custo. Porém, ainda é necessária a existência de um sistema de tratamento para os viveiros, Boas Práticas de Produção e, devido às contestações sanitárias, a aceitação do consumidor (PALHARES, 2006).

Segundo Palhares (2006), no caso do Estado de Santa Catarina, que é o maior produtor de suínos do Brasil, a realização de um Termo de Ajustamento de Conduta (TAC) para a suinocultura e piscicultura prevê a possibilidade da integração destas produções e tem por objetivo licenciar as propriedades.

2.3 Consórcio Suíno-Peixe

A importância da produção de suínos justifica-se pelo alto consumo de sua carne, no Brasil e no mundo. Esta produção, por ser extremamente poluidora, é contestada do ponto de vista ambiental. O seu potencial poluidor equivale à poluição de

3,5 pessoas, sendo que seus dejetos possuem uma demanda bioquímica de oxigênio mil vezes maior que um efluente doméstico tratado. O aproveitamento destes resíduos para a agricultura vem sendo comprometido, pois não estão sendo respeitados os limites ambientais (PALHARES, 2006).

Uma forma de minimizar o impacto decorrente do grande volume de dejetos suínos gerados é sua utilização como substrato à produção da piscicultura. Segundo Palhares (2006), este sistema visa, ainda, baratear o custo de produção de peixes. Neste sistema, os peixes não se alimentam diretamente dos dejetos e sim das algas que utilizam os nutrientes neles contidos. Existem trabalhos demonstrando que não há riscos à saúde humana na ingestão de carne de peixes criados neste sistema. Entretanto, já foi observada alta prevalência de suínos portadores assintomáticos de salmonelas (BESSA; COSTA; CARDOSO, 2004), inclusive de sorovares de interesse em saúde humana (MICHAEL *et al.*, 2002) e com perfil de multirresistência a antimicrobianos (SCHMIDT; CARDOSO, 2003; CASTAGNA *et al.*, 2001) o que poderia comprometer a inocuidade do pescado.

A piscicultura integrada é altamente desenvolvida no oeste do Estado de Santa Catarina, principalmente com relação ao consórcio suíno-peixe. Como a suinocultura gera grande quantidade de resíduos orgânicos, a utilização destes dejetos na piscicultura passou a ser uma opção economicamente viável. Nesta região, o modelo básico para criação de peixes é o policultivo (PILARSKI *et al.*, 2004).

O policultivo de peixes, associado à produção de suínos, é o cultivo simultâneo de diferentes espécies de peixes, com hábitos alimentares e comportamentos diferentes, ocupando diferentes espaços na coluna d'água. O objetivo é o melhor aproveitamento dos nutrientes existentes, sem competição entre as espécies. Existem espécies que tem um desempenho melhorado na presença de outras, ou seja, existe um melhor aproveitamento dos níveis tróficos, criando-se novas fontes alimentares a serem aproveitadas (PILARSKI *et al.*, 2004).

Todavia, o uso excessivo ou continuado destes dejetos pode causar danos ambientais com poluição do solo, das águas e do ar, além de perdas de produtividade e qualidade da produção (SEGANFREDO, 2004).

2.4 Aspectos Físico-Químicos e Microbiológicos dos Dejetos de Suínos

2.4.1 Características Físico-Químicas dos Dejetos de Suínos

Escolher um manejo adequado aos dejetos líquidos de suínos é um desafio para a sobrevivência das zonas de produção intensiva, pois existe o risco de poluição das águas superficiais e subterrâneas por elementos minerais ou orgânicos e do ar pelas emissões de NH_3 , CO_2 , N_2O e H_2S (OLIVEIRA, 2000).

A alimentação administrada aos suínos é essencial ao manejo dos dejetos, pois os níveis de elementos contidos nas rações exercem uma influência muito grande na qualidade e quantidade de rejeitos produzidos (LIMA, 2007). Segundo Oliveira (2000), pesquisas têm apontado que o nitrogênio e o fósforo são considerados como os principais elementos poluidores de recursos hídricos e do solo, sendo que dois terços destes elementos consumidos pelos animais são encontrados nos seus excrementos.

O esterco líquido dos suínos contém matéria orgânica, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, sódio, magnésio, manganês, ferro, zinco, cobre e outros elementos incluídos nas dietas dos animais (PERDOMO, 2001). Os suínos consomem alimentos de alto valor protéico, no entanto, são ineficientes transformadores e desperdiçam uma alta porcentagem das proteínas e micronutrientes que fazem parte das dietas nutricionais na suinocultura (LIMA, 2007).

O nitrogênio é um dos elementos mais preocupantes, pois está presente em altas concentrações nos dejetos de suínos na forma de nitrogênio orgânico e particulado, o nitrogênio amoniacal (NH_3/NH_4), o nitrito (NO_2) e o nitrato (NO_3). O nitrogênio amoniacal é tóxico aos peixes e apresenta uma alta demanda de oxigênio (1 mg de NH_3 necessita de 4,6 mg de O_2). O nitrato pode produzir metahemoglobinemia, fruto da redução de nitrato a nitrito e conseqüente oxidação do Fe_2 a Fe_3 da hemoglobina, formando metahemoglobina que é incapaz de se ligar ao O_2 , impedindo as trocas gasosas no organismo humano. O nitrito ainda apresenta poder mutagênico e carcinogênico formando nitrosaminas ao combinar-se com aminas secundárias provenientes da dieta alimentar (KUNZ, 2005a).

Conforme Jones (1980), o pH dos dejetos suínos varia de 6,2 a 8,0 (média de 7,4) e pode influenciar na sobrevivência dos patógenos. Dependendo da diluição e da maneira como são manuseados e armazenados, podem apresentar grandes variações na concentração de seus componentes [75-85% de umidade e DBO_5 (Demanda Bioquímica

de Oxigênio) de 0,20-0,25 mg/L] e uma composição química de 0,60% de Nitrogênio, 0,25% de Fósforo e 0,12% de Potássio (OLIVEIRA, 1993).

Estando as características físico-químicas dos dejetos associadas ao sistema de manejo adotado e aos aspectos nutricionais, é necessário definir exigências, fontes e disponibilidade dos nutrientes para os animais de maneira a disponibilizar a produção e minimizar a excreção de elementos químicos poluentes (LIMA, 2007).

O pH dos dejetos é um fator que influencia a sobrevivência das salmonelas, poucas vivem mais que 150 dias, sendo que 90% morrem durante as primeiras 2 a 4 semanas enquanto o pH decresce (Jones, 1980). As salmonelas podem ser encontradas nos dejetos de sistemas de produção animal, excretadas através das fezes, urinas e outras secreções, e sua sobrevivência é influenciada pela temperatura, pH, quantidade inicial, sorotipo existente nos dejetos e conteúdo sólidos dos resíduos, além dos demais microorganismos competidores (STRAUCH, 1991).

2.4.1.1 Volume Produzido pelos Dejetos de Suínos

A intensificação da produção suinícola trouxe o aumento de volume de resíduos produzidos por unidade de área, o que tem gerado problemas de manejo, armazenamento, distribuição, tratamento ou disposição no solo, aumentando, com isto, os custos operacionais da atividade (BRANDÃO *et al.*, 2000).

O volume de dejetos produzidos depende dos processos produtivos utilizados, ou seja, estimando sua produção pode-se reduzir o desperdício. Com um programa de manejo, armazenamento, tratamento, distribuição e utilização dos dejetos podem-se controlar a poluição pela redução do volume e da concentração com conseqüente preservação da saúde e do meio ambiente (PERDOMO; LIMA; NONES, 2001).

Deve-se considerar o número de suínos presentes nas diferentes fases da criação para que se possa fazer uma estimativa do volume dos dejetos produzidos (OLIVEIRA; SILVA; PERDOMO, 2007).

Suínos com peso entre 16 a 100 Kg de peso vivo, produzem diariamente entre 8,5 a 4,9% de seu peso corporal em urina + fezes (JELINECK, 1997 apud PERDOMO, 2001). Segundo Perdomo, Lima e Nones (2001), uma granja em ciclo completo com 80 matrizes pode gerar 8.000 L/dia de dejetos “pouco diluídos”, 12.000 L/dia com uma “diluição média” e 16.000 L/dia com uma “diluição alta”.

Um suíno pode produzir 8,6 L/dia/animal de dejetos e consumir 15 L/dia de água, equivalendo no ano de 2001 a um consumo de água semelhante a 1,5% da população brasileira, maior que muitos Estados (PALHARES; CALIJURI, 2007b).

Formular dietas com maior precisão também influencia diretamente na produtividade da suinocultura, pois está relacionada diretamente com a redução da quantidade de dejetos produzidos. Uma formulação reduzida de sal, além de reduzir a excreção de sódio, promove a redução no consumo e excreção de água e no volume dos dejetos produzidos (LIMA, 2000).

Portanto, conhecer o volume, a composição química dos dejetos e qualificar seus efluentes passam a ser crucial para o controle da poluição e a valorização agrônômica.

2.4.2 Características Microbiológicas dos Dejetos Suínos

Muitas bactérias patogênicas estão presentes em dejetos de animais. Microorganismos patogênicos são capazes de sobreviver nesse meio e se disseminar através do solo e serem inseridos na cadeia alimentar humana. Existem trabalhos referindo a transferência de patógenos através de alimentos contaminados por dejetos de animais aplicados ao solo como fertilizantes (ISLAM *et al.*, 2004). Doenças causadas por coliformes, salmonela, assim como a peste suína clássica podem advir de manejos inadequados dos resíduos líquidos aplicados ao solo ou despejados em efluentes (MORÉS; ZANELLA, 2005).

Hutchison *et al.* (2005a) estimam que embora haja um decréscimo das gastroenterites nos últimos cinco anos no Reino Unido, ainda existem 1,5 milhões de casos anualmente na Inglaterra e País de Gales. Estes mesmos autores referem que pode haver risco se fezes contaminadas forem utilizadas como fertilizante na agricultura para posterior fonte de alimentação aos animais (HUTCHISON *et al.* 2005b). Um estudo realizado por Islam *et al.* (2004) demonstrou que água de irrigação ou esterco contaminado pode ser uma importante fonte de contaminação para o solo e, conseqüentemente, para vegetais e frutas.

O despejo de dejetos sem tratamento lançado nos corpos d'água resulta num rápido crescimento populacional das bactérias e na conseqüente escassez do oxigênio dissolvido para o seu crescimento. Esta população pode dobrar simultaneamente a cada divisão podendo, quando seu tempo de multiplicação for de 30 minutos, chegar a uma

população de 16.777.216 novas bactérias em apenas 12 horas de vida (KRUEGER; TAYLOR; FERRIER, 1995 apud PERDOMO; LIMA; NONES, 2001).

A *Salmonella* sp. é uma das bactérias mais predominantes em efluentes, pois estão distribuídas no meio ambiente. Estima-se que pelo menos 0,1% da população animal excreta *Salmonella* sp. em algum momento (VENGLOVSKY; MARTINEZ; PLACHA, 2006).

Garcia-Feliz *et al.* (2007), em seu estudo conduzido em granjas de suínos na Espanha, determinaram a prevalência de *Salmonella enterica*, uma das principais causas de gastroenterite humana, observando que entre os 24 sorovares identificados, Typhimurium foi aquele mais comumente detectado.

Jones (1986 apud HUTCHISON *et al.*, 2005b), refere que é possível a sobrevivência de salmonelas em esterco secos entre 2 e 36 semanas, quando aplicados em pastagens.

Dietas contendo antimicrobianos podem vir a causar a multirresistência das salmonelas e representar um risco à saúde pública (SCHMIDT; GOTTARDI; NADVORNY, 2007). Por outro lado, os animais que recebem antimicrobianos na ração consomem menos água e produzem menores quantidades de dejetos e gases (LIMA, 2007).

O problema pode ser exacerbado pelo aumento da resistência antimicrobiana dentre os sorotipos de *Salmonella* sp., aumentando o risco de infecções, pois os demais organismos competidores não são capazes de se desenvolver (PELL, 1997).

Os dejetos produzidos pelos suínos, assim como de qualquer outro animal, é resultado do seu manejo. O correto manejo e a adoção de instalações adequadas são essenciais para prevenir a ocorrência e disseminação de doenças (MORÉS; ZANELLA, 2005). Sendo assim, tratá-los é uma maneira de minimizar os riscos de contaminação ambiental. Os sistemas de tratamento eliminam entre 90-99% dos microorganismos presentes nos dejetos. Porém, a redução pode ser menor (KOIVUNEN; SIITONEN; HEINONEN-TANSKI, 2003), razão pela qual é importante conhecer a potencialidade de sobrevivência destes no ambiente e o destino do efluente de sistemas, no intuito de minimizar os riscos potencial à saúde humana e animal (SCHMIDT; GOTTARDI; NADVORNY, 2007).

2.5 Impacto Ambiental

Segundo Bellaver e Figueiredo (2007), a China lidera a produção de carne suína, seguida pela União Européia, Estados Unidos, Brasil, Canadá, Rússia e Japão. No entanto, o Brasil apresenta uma produtividade de criação de 14,8 (leitões/matriz/ano) superada pelo Canadá (20,1), Japão (18,7), Estados Unidos (17,5) e União Européia (17,0). Este índice de produtividade sobe quando são referidas as regiões sul e sudeste do Brasil, com 16,1 e 16,5 respectivamente.

Nas últimas décadas houve um aumento de rebanho de suínos, embora tenha havido uma redução do número de produtores. Esta mudança de perfil da suinocultura só foi possível devido ao aumento do nível econômico e tecnológico empregado nas criações, que passou da subsistência para uma atividade empresarial (SEGANFREDO, 2002).

A suinocultura, por ser uma atividade de grande potencial poluidor, devido aos contaminantes gerados por seus efluentes, pode representar uma importante fonte de degradação do ar, dos recursos hídricos e do solo (PERDOMO; LIMA; NONES, 2001).

O lançamento de dejetos na natureza, sem tratamento prévio, pode causar desequilíbrios ambientais e comprometer a saúde humana e a criação de suínos. Na região oeste de Santa Catarina, estima-se que a produção diária de dejetos na suinocultura seja de aproximadamente 30 mil m³ (MIRANDA, 2005). A capacidade poluidora dos suínos é superior a de outras espécies. Comparada à humana, a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) de um suíno de 85 Kg de peso vivo varia de 189 a 208 g/dia, enquanto que a humana varia de 45 a 75 g/habitante/dia (ASAE, 1993 apud PERDOMO; LIMA; NONES, 2001).

O odor desagradável dos excrementos é também um problema relacionado à criação de suínos e ocorre devido à evaporação dos compostos voláteis. Os contaminantes do ar mais comuns nos dejetos são: amônia, metano, ácidos graxos voláteis, H₂S, N₂O, etanol, propanol, dimetil sulfidro e carbono sulfidro. As emissões destes gases podem causar graves prejuízos nas vias respiratórias do homem e animais, bem como a formação de chuva ácida, através de descargas de amônia na atmosfera, além de contribuírem para o aquecimento global da terra (PERDOMO, 1999; LUCAS *et al*, 1999 apud DIESEL; MIRANDA; PERDOMO, 2002). Muitos criadores apresentam

problemas de saúde ficando, inclusive, incapacitados ao trabalho quando expostos a um sistema confinado de criação de suínos (PERDOMO; LIMA; NONES, 2001).

O consumo de água varia com a dieta alimentar dos suínos, alimentos com alta concentração de aminoácidos aumentam o consumo de água, assim como também influencia o regime de alimentação, tipo de piso e temperatura ambiente (OLIVEIRA, 2007). Por conseqüência, quanto mais água for ingerida maior será o volume de dejetos produzidos (PERDOMO; LIMA; NONES, 2001).

Conforme Perdomo (2001), reduzir as perdas e o desperdício de água na granja diminuirá o volume de efluentes produzidos que, por sua vez, diminuirá o problema de poluição e os custos de armazenamento, transporte e distribuição dos dejetos. Ainda, segundo este autor, a estimativa da produção de dejetos é na ordem de 100L/matriz/dia em ciclo completo, 60L/matriz/dia para unidades de produção de leitões e 7,5L/dia para os terminados.

Segundo Seganfredo (2007), os dejetos de suínos possuem vários nutrientes em quantidades desproporcionais em relação à capacidade de extração das plantas nos diferentes tipos de solo. Isto significa que adubações em excesso podem causar um impacto ambiental importante, como desequilíbrios físicos, químicos e biológicos no solo, além da poluição das águas, da perda da produtividade e da qualidade dos produtos agropecuários. Este autor refere que estes dejetos devem ser usados segundo o tipo e a capacidade do solo e cultura específica, ou então, passar por um processo de tratamento.

Segundo Perdomo, Lima e Nones (2001), todos os sistemas de criação de suínos são potencialmente poluidores, mas com nível de impacto ambiental diferenciados. O autor exemplifica que no sistema confinado, os dejetos de suínos são armazenados para posterior tratamento e utilização, enquanto que no sistema SISCAL há a geração e distribuição dos efluentes no próprio local. Neste caso, os recursos naturais, integridade do solo e a contaminação das águas superficiais e subterrâneas, são mais facilmente comprometidos.

Estudos realizados relatam que áreas aptas à aplicação de dejetos como fertilizantes nas regiões suinícolas do sul do Brasil são insuficientes para a quantidade de resíduos nela produzidos. As estimativas geralmente não levam em consideração a superposição dos rejeitos de outros animais além daqueles gerados pelos suínos (SEGANFREDO, 2002).

A produção destes dejetos em áreas insuficientes para esta demanda tem causado lixiviação e percolação destes, aumentando a contaminação dos recursos hídricos (KUNZ, 2005a).

Estima-se, por exemplo, que apenas 15% das propriedades de Santa Catarina possuem manejo e tratamento adequado dos dejetos, o restante destina estes resíduos ao meio ambiente. Como resultado ocorre a contaminação das águas superficiais e subterrâneas, a poluição orgânica pelo nitrogênio, a presença de microorganismos patogênicos e alterações de solos e poluição do ar (BELLI FILHO *et al.*, 2001).

O despejo dos dejetos brutos de suínos direta ou indiretamente no solo e nos cursos d'água sem receberem tratamento, pode causar um sério risco de contaminação ambiental, visto que a existência de um grande número de patógenos pode levar a ocorrência de gastroenterites e outras doenças (PERDOMO, 2001).

A escolha do manejo dos rejeitos muitas vezes é dificultada pelo nível de conhecimento dos produtores (OLIVEIRA, 2000), que além da necessidade de melhora da qualidade de seu rebanho também enfrentam a pressão da sociedade para a busca de sistemas que tenham sustentabilidade ambiental. Avaliações econômicas sob o ponto de vista da legislação ambiental, concluem que o uso de tecnologias limpas não inviabiliza a atividade suinícola (SEGANFREDO, 2002).

De acordo com Seganfredo e Perin Júnior (2005), é importante que haja uma mudança de pensamento e de atitude por parte dos agricultores, pois estes não entendem que a utilização de dejetos de suínos pode ser um fator de risco ao meio ambiente.

Outro problema importante em termos de saúde pública que pode atingir aos produtores, animais e propriedades vizinhas é o acúmulo de insetos, vetores de doenças, devido ao manejo errado dos esterco (PAIVA, 2007).

Portanto, utilizar corretamente os dejetos e tratá-los conforme determina a legislação ambiental passa a ser um desafio, devido ao alto investimento requerido.

Conforme Palhares (2003), não existe mágica para resolver os problemas relacionados à produção de suínos. Com um passível ambiental elevado, mas pensando nas questões sócio-econômicas, deve-se evitar o desequilíbrio do ambiente e buscar mudanças de conceitos que considere a implementação de programas de gestão ambiental de acordo com as características dos sistemas produtivos e das bacias hidrográficas.

2.6 Legislação Brasileira

Apesar do alto nível tecnológico empregado no manejo de suínos, o modelo de gestão dos seus dejetos pouco tem contribuído para atender a legislação ambiental vigente e à sustentabilidade ambiental (PILLON, 2000).

A Lei Federal 6938 de 31 de agosto de 1981 (BRASIL, 1981), modificada em alguns artigos posteriormente pela Lei Federal 7804 de 18 de julho de 1989 (BRASIL, 1989), dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente. Segundo o artigo 2º, a Política Nacional do Meio Ambiente tem por objetivo a preservação, a melhoria e a recuperação da qualidade ambiental que propicia a vida, visando assegurar, no País, condições ao desenvolvimento sócio-econômico, aos interesses da segurança nacional e a proteção da dignidade da vida humana.

A Lei Federal 9433 de janeiro de 1997 (BRASIL, 1997), institui a Política Nacional de Recursos Hídricos e cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos. A lei tem o objetivo de assegurar, à atual e às futuras gerações, a necessária disponibilidade de água, em padrões de qualidade adequados, a utilização racional e integrada dos recursos hídricos, com vistas ao desenvolvimento sustentável e a prevenção e a defesa contra eventos hidrológicos críticos de origem natural ou de correntes do uso inadequado dos recursos naturais. Esta legislação prevê a gestão descentralizada e integrada das águas, através da criação do Conselho Nacional de Recursos Hídricos/CNRH e dos Comitês de Bacia Hidrográficas.

No Estado do Rio Grande do Sul, em 03 de agosto de 2000 foi publicada a Lei nº 11520 instituindo o Código Estadual do Meio Ambiente que, dentre seus vários artigos, proíbe a disposição direta de poluentes e resíduos de qualquer natureza em condições de contato direto com corpos d'água naturais superficiais ou subterrâneas (RIO GRANDE DO SUL, 2000).

A Fundação de Meio Ambiente do Estado de Santa Catarina (FATMA), segundo a Portaria nº 002/03, define que para ser aplicado no solo, o dejetos de suíno deve permanecer armazenado por um período de no mínimo 120 dias. Este armazenamento é importante ao garantir, por anaerobiose, a decomposição do material carbonáceo, a transformação de compostos nitrogenados, a adsorção do fósforo e a redução dos microorganismos patogênicos (SANTA CATARINA, 2003).

Em março de 2005 o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), publicou a Resolução 357 (BRASIL, 2005), em substituição à Resolução 20/86 (BRASIL, 1986), que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências. Em 2006 houve a publicação da Resolução 375 que regulamenta a aplicação de lodo no solo (BRASIL, 2006).

A Resolução 357/05 do CONAMA (BRASIL, 2005) classifica em quatro classes a qualidade requerida para águas doces e, conforme o artigo 3º, em treze classes de qualidade as águas doces, salobras e salinas. Segundo o parágrafo único deste artigo, “as águas de melhor qualidade podem ser aproveitadas em uso menos exigente, desde que este não prejudique a qualidade da água, entendidos outros requisitos pertinentes”. Na prática, fica proibido o despejo de dejetos de suínos diretamente nos corpos d’água sem tratamento devido ao seu alto poder poluidor. Segundo ainda esta resolução, os efluentes de qualquer fonte poluidora só poderão ser lançados, direta ou indiretamente nos corpos de água desde que obedeçam as condições previstas nesta legislação ou em outras normas aplicáveis.

Esta legislação determina que a água destinada à aquicultura deva estar classificada como de Classe 2 e define vários parâmetros físico-químicos e microbiológicos que devem ser seguidos.

No capítulo V, esta resolução determina que nas bacias hidrográficas em desacordo com as condições de qualidade exigidas, devam ser estabelecidas metas obrigatórias, intermediária e final de melhoria da qualidade da água. A cobrança pelo uso da água, o licenciamento ambiental, termo de ajustamento de conduta e o controle da poluição devem seguir metas que deverão ser aprovadas pelo órgão competente.

Estes regulamentos vêm ao encontro da necessária normatização citada por autores como Tiago e Giancesella (2003), que referiam a inexistência de instrumentos específicos que viabilizem o licenciamento ambiental, criando regimentos que auxiliem e assegurem um desenvolvimento sustentável e promovam a proteção ambiental.

A suinocultura é considerada uma atividade de alto impacto ambiental, devido à possibilidade de vir a contaminar uma grande quantidade de recursos hídricos. O conhecimento destas legislações é crucial para que haja o entendimento e aplicação adequada destes recursos naturais. Segundo Palhares (2005), muitos produtores não tem

conhecimento das técnicas ideais de uso dos dejetos de suínos como adubo e, com isso, transgridem a legislação.

Senganfredo (2002) cita a ISO 14.000 que considera como tecnologia limpa o sistema que não causa danos ambientais em nenhuma fase do processo de produção até o destino final dos resíduos.

Mas, de quem será a responsabilidade do ônus de resolver o problema da poluição causada pelos dejetos de suínos? Do poder público ou dos produtores? Os produtores alegam problemas financeiros. Entretanto, é incoerente o discurso que o ambiente deve ser preservado e, ao mesmo tempo, manter o mesmo sistema produtivo vigente.

No sul do Brasil não existem áreas agriculturáveis compatíveis com a escala de produção da suinocultura (MIELE; KUNZ, 2007), embora, conforme tem acontecido nos últimos anos, a mesma continue a crescer. Para solucionar este problema, foi realizado um Termo de Ajustamento de Conduta (TAC) no Estado de Santa Catarina, mas em 2006 este ainda não havia sido cumprido (PALHARES, 2006).

Palhares (2007b) analisa que o afrouxamento da legislação não é a solução, pois trará como principal reflexo a degradação dos nossos recursos naturais e a inviabilização da atividade suinícola.

Alternativas devem ser buscadas, como a reciclagem dos resíduos que não tenham como única finalidade o seu uso como fertilizante. O fato é que se não houver um consenso que nos permita achar um caminho, dentro de muito pouco tempo teremos nossos recursos hídricos exauridos.

2.7 Tratamento dos Dejetos

Tratar dejetos reduz a concentração de patógenos. Dependendo do sistema de tratamento poderá ser maior ou menor a redução de bactérias. No entanto, esta redução é influenciada pela temperatura, conteúdo sólido, pH, composição físico-química do material, competição microbiológica, entre outros (GUAN; HOOLEY, 2003; HILL; SOBSEY, 2001 apud GREWAL; SREEVATSAN; FREDERICK, 2005).

Oliveira (2000) recomenda tratar os resíduos líquidos armazenando-os e tratando-os em esterqueiras, bioesterqueiras ou lagoas para posterior uso como fertilizante.

Armazená-los e depois depositá-lo no solo, devido à facilidade e baixo custo, é a forma de manejo mais comumente empregada (MIELE; KUNZ, 2007), embora segundo Perdomo, Lima e Nones (2001), não seja considerada um tratamento de resíduos.

No estudo apresentado por Hutchison *et al.* (2005a), embora esteja claro que exista um decréscimo de microorganismos durante o armazenamento, isto não se comprova na realidade, pois a constante adição de dejetos implica no contínuo aumento de patógenos. Portanto, sem um correto manejo, o tempo de permanência de armazenamento dos dejetos não indica necessariamente o baixo nível ou ausência de agentes zoonóticos.

Silva *et al.* (2007) verificaram que o dejetos suíno armazenado por 120 dias em esterqueiras possui quantidade elevada de coliformes fecais encontrando, em alguns casos, presença de *Salmonella* sp..

Para que haja o tratamento de resíduos é necessário passar por processos físicos, químicos e biológicos capazes de reduzir o potencial poluidor dos dejetos, transformando-os em subprodutos como o biogás e adubos orgânicos. Tecnologias como sistemas de lagoas, a compostagem, os biodigestores e os sistemas compactos como a Estação de Tratamento de Dejetos de Suínos (ETDS) apresentam vantagens e desvantagens. A melhor escolha será aquela compatível com a disponibilidade de recursos, sejam eles financeiros, técnicos ou relacionado à legislação ambiental (MIELE; KUNZ, 2007).

A biodigestão anaeróbica oferece o retorno financeiro através da venda de créditos de carbono, mas tem como fator limitante a necessidade de um tratamento complementar do efluente do sistema (KUNZ, 2005b).

Seganfredo (2004) recomenda a compostagem no caso de dejetos sólidos e fermentação no caso de líquidos, porque além de evitarem a proliferação de insetos, eles promovem a mineralização de vários compostos.

Belli Filho (2001) estudou os sistemas de lagoas naturais e as indica como tecnologia potencial para o tratamento dos dejetos de suínos para o sul do Brasil. Mas, explica que apesar da elevada eficiência deste sistema, o mesmo necessita de um pós-tratamento para atender aos padrões de efluentes líquidos.

Segundo Kunz (2005b), as lagoas de tratamento, quando corretamente dimensionadas e manejadas, fornecem um efluente de qualidade, porém, tem como desvantagem sofrerem influência das condições climáticas e ocuparem áreas que poderiam ser agricultáveis. Santos *et al.* (2007), citam a existência de trabalhos

apontando para uma perda de eficiência das lagoas durante o inverno, devido à redução do metabolismo microbiano nesta época do ano, causada pelo frio, que reduz a velocidade de decomposição da matéria orgânica.

As ETDS são uma alternativa em estudo. Segundo Miele e Kunz (2007), este tipo de sistema melhora a controlabilidade do processo e produz um efluente de melhor qualidade. Por outro lado, exige maiores recursos e mão de obra especializada.

Higarashi, Kunz e Oliveira (2007) avaliam que sistemas de tratamento diferem significativamente entre si e a remoção de 99% da DQO nem sempre significa que o efluente final possa ser lançado no meio ambiente sem causar impacto. Refere ainda, que embora haja altas reduções de carga poluente do efluente suínico, em nenhum dos sistemas avaliados no Brasil se atingiu os níveis que permitissem seu descarte diretamente nos rios conforme determina a legislação (CONAMA 357/05).

2.7.1 Sistemas de Tratamento de Dejetos Suínos

Os métodos físicos para tratamentos de dejetos dividem-se segundo Higarashi, Kunz e Oliveira (2007), em separação de fase sólida, adsorção, separação por *stripping* (amônia), concentração via evaporação e filtração por membrana de osmose reversa. Os processos químicos, por floculação e precipitação e os biológicos, por anaeróbios (com produção de metano), aeróbio (com aumento de temperatura) e desinfecção e nitrificação /desnitrificação, para remoção de nutrientes.

Os métodos para tratamento de dejetos mais utilizados são o físico e o biológico (SCHMIDT; GOTTARDI; NADVORNY, 2007). A fim de aumentar a eficiência dos processos, após a separação física das frações sólida e líquida, eles são encaminhados para tratamentos complementares. A compostagem é utilizada para a fase sólida e as lagoas de estabilização para o tratamento de efluentes.

A maior parte dos sistemas utiliza os processos biológicos (anaeróbio e aeróbio) para o tratamento de efluentes. Segundo Day e Funk (2002), na degradação biológica as bactérias realizam a decomposição da matéria orgânica, desdobrando substâncias orgânicas complexas em substâncias simples como metano, dióxido de carbono e água. Desta forma, extraem energia e compostos necessários para o seu próprio crescimento e eliminando total ou parcialmente os microorganismos potencialmente patogênicos.

Ainda segundo estes autores, a velocidade de degradação nos sistemas biológicos, são afetados pela temperatura, sendo que abaixo de 4,5°C a decomposição bacteriana é muito reduzida. No entanto, Schmidt *et al.* (2002) consideram que em regiões subtropicais, por não haver temperaturas máximas e mínimas extremas, não há uma interferência no metabolismo microbiano que possam afetar a sobrevivência do mesmo.

Howard *et al.* (2004) sugerem um tratamento primário, através de decantação, seguido por um secundário, envolvendo o processo aeróbico para tratar efluente. Mesmo assim, esclarecem que após uma redução do conteúdo orgânico, o efluente ainda contém microorganismos de relevância sanitária, sendo insuficiente a utilização destes dois processos.

O processo de digestão anaeróbica, além de oferecer vantagens como a estabilização da matéria orgânica, pouca produção de lodo e baixo requerimento de energia (CHEN, 2007 apud MICHAELSEN *et al.*, 2008), pode colaborar significativamente na redução de patógenos em sistemas de tratamento de dejetos, o que pode ser monitorado através da quantificação de coliformes (MICHAELSEN *et al.*, 2008). Este processo, fora de controle, pode produzir odores e gases (DAY; FUNK, 2002).

Segundo estudo realizado por Schmidt *et al.* (2002), o tratamento anaeróbio é o mais eficaz na redução dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados. O tipo de microorganismos presentes, mais adaptados ao ambiente de lagoas, leva vantagem por serem eficientes degradadores de matéria orgânica e competidores por nutrientes. Ainda segundo estes autores, tal fato resultaria na seleção negativa de microorganismos patogênicos, mais adaptados à multiplicação no organismo animal.

2.7.2 Monitoramento

O monitoramento e a avaliação do efluente de sistemas de tratamento de dejetos tornam-se essenciais para manter a qualidade dos recursos hídricos (PALHARES, 2007c), prevenindo assim, doenças transmissíveis.

A contaminação dos mananciais por microorganismos e minerais devido à distribuição contínua de dejetos animais empregados como fertilizante agrícola tem como consequência acúmulo no solo e lixiviação aos recursos hídricos (LIMA, 2000).

Não tratá-los corretamente podem carrear para o meio ambiente microorganismos como *Salmonella* sp., *E. coli* O157:H7, *Campilobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Cryptosporidium parvum* que podem sobreviver por meses em dejetos liquefeitos estocados constituindo, assim, um risco à saúde humana e animal (PELL, 1997). Ajariyakhajorn *et al.* (1997 apud Watabe *et al.*, 2003) demonstraram que *Salmonella* Anatum pode sobreviver em dejetos de suínos por 56 dias (pH 7,0/4°C). Watabe *et al.* (2003) identificaram que a fração líquida dos dejetos de suínos possui uma prevalência maior de patógenos (seis sorovares de *Salmonella* sp.) em comparação com a fração sólida estudada. Estes autores chamam a atenção às implicações para a saúde humana e animal da utilização destes dejetos como fertilizante de solo e para o problema da contaminação da água (eutroficação) afetando à saúde pública, além das perdas econômicas.

Verifica-se a redução de patógenos em um processo de tratamento, a partir da taxa de redução das bactérias (SMITH, 2005 apud MICHAELSEN, 2007). Em ambientes aquáticos usam-se coliformes fecais como indicadores de poluição (CEBALLOS *et al.*, 1995) e podem ser utilizados no monitoramento da redução do número de patógenos nos sistemas de tratamento de dejetos animais (LARSEN *et al.*, 1994 apud MICHAELSEN, 2008).

Sayler *et al.* (1976 apud PERALES; AUDICANA, 1989) referem que, algumas vezes, não existe correlação entre o número de organismos indicadores (coliforme) e bactérias enteropatogênicas, sendo que a *Salmonella* sp. tem sido encontrada como uma sobrevivente melhor do que a *E. coli* em estuário (RHODES; KUTOR, 1988 apud PERALES; AUDICANA 1989). Estas observações levam alguns autores a sugerir a detecção de *Salmonella* sp. como complemento à determinação de indicadores (DUTKA; BELL, 1973 apud PERALES; AUDICANA, 1989). Em razão disto, fazem-se necessárias técnicas sensíveis capazes de detectar *Salmonella* sp. em águas servidas (PERALES; AUDICANA, 1989). Complementando, Howard *et al.* (2004) verificaram em efluentes urbanos tratados elevado conteúdo de *Salmonella* sp., demonstrando o alto risco de transmissão de salmoneloses. Um conteúdo alto de salmonela em dejetos municipais também foi evidenciado por Kovuinen, Siitonen e Heinonen-Tanski (2003)

os quais relatam, ainda, a freqüente resistência de linhagens desta bactéria aos agentes antimicrobianos (multirresistência), representando um risco à saúde pública.

Considerando que a produção de alimentos e as fontes hídricas consumidas pela população encontram-se localizadas nas zonas rurais, fica evidente a necessidade de avaliar a qualidade da água que está sendo utilizada, pois esta irá interferir na saúde da população rural e urbana. Monitorar a qualidade da água consumida por humanos e animais, tendo como base a legislação, possibilita a tomada de decisões a fim de melhorar a qualidade desta água (RELATÓRIO..., 2006).

Bettega *et al.* (2006), em um estudo de métodos analíticos no controle biológico da água para consumo humano, avaliaram a presença de organismos patogênicos na água através da presença ou ausência de um organismo indicador e sua respectiva população, os quais exigem uma metodologia diferente para sua identificação e isolamento. Entretanto, segundo estes autores, a presença ou ausência de um patógeno não exclui a presença de outros. Segundo Leitão *et al.* (1988 apud BETTEGA *et al.*, 2006), não existe um indicador ideal para avaliar a qualidade sanitária da água e sim alguns microorganismos que mais se aproximam das exigências referidas.

2.7.2.1 Indicadores

As águas de abastecimento apresentam o risco de serem poluídas por águas residuárias e excretas de origem humana ou animal podendo, desta forma, conter organismos patogênicos e tornando-se, portanto, um veículo de transmissão de doenças.

Um bom indicador biológico deve ter algumas características que são difíceis de reunir num único microorganismo como: estar presente em todos os tipos de água, aparecer e desaparecer no mesmo momento que os microorganismos patogênicos, serem de fácil detecção e recuperação laboratorial, ter uma densidade populacional representativa do grau de contaminação, ser de manipulação segura e entre outros, ser detectado por uma metodologia simples e barata (BETTEGA *et al.*, 2006).

Para avaliar as condições sanitárias da água, utilizaram-se bactérias do grupo Coliforme que atuam como indicadores de contaminação de origem fecal. Estas apesar

de não serem patogênicas em sua maioria, ocorrem em grande número na flora intestinal humana e de animais e indicam que o ecossistema foi contaminado. A ausência de coliformes é evidência de uma água bacteriologicamente potável, uma vez que são mais resistentes na água que as bactérias patogênicas de origem intestinal.

Os Coliformes totais são bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de fermentar a glicose com produção de aldeído, ácido e gás a 35°C, em 24-48 horas. O grupo inclui os seguintes gêneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (HOLT *et al.*, 1993).

Os Coliformes fecais ou termotolerantes são coliformes capazes de se desenvolver e fermentar a lactose com produção de ácido e gás à temperatura de $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ em 24 horas. O principal componente deste grupo é *Escherichia coli*, sendo que alguns coliformes do gênero *Klebsiella* também apresentam essa capacidade (HOLT *et al.*, 1993).

E. coli, descoberta por Theodor Escherich em 1885, tem sido usada como indicador na avaliação da contaminação fecal da água, sendo até hoje o parâmetro microbiológico básico incluído nas legislações relativas a águas para consumo humano (BRASIL, 2004; BRASIL, 2005).

A legislação brasileira de classificação de águas potáveis determina a ausência em 100 mL de Coliformes totais e *E. coli* (ou coliformes termotolerantes) para água de consumo humano (BRASIL, 2004). A Resolução do CONAMA (BRASIL, 2005), determina para águas doces de Classe 2 o limite de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 (seis) amostras coletadas durante o período de um ano com uma frequência bimestral. Sendo que a *E. coli* poderá ser determinada em substituição aos coliformes termotolerantes, de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

A bactéria *Salmonella* sp. embora não estando relacionada pela legislação como indicador de poluição ambiental, encontra-se usualmente presente nas fezes de suínos. Estes em condições de estresse, podem vir a excretá-las tendo como consequência a ativação ou reativação da infecção, além de causar toxinfecção alimentar em humanos. Alguns suínos podem permanecer como portadores ou excretadores intermitentes por meses, com perdas econômicas para a granja e aumento do custo de produção (SILVA, 2004).

2.7.2.2 *Salmonella* sp.

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*. São bastonetes gram-negativos, não esporulados, fermentam a glicose produzindo ácido e gás, porém, são incapazes de metabolizar a lactose e a sacarose, mas utilizam o citrato como única fonte de carbono. A maioria é móvel, através de flagelos peritríquios. São anaeróbios facultativos, possuindo metabolismo respiratório e fermentativo (HOLT *et al.*, 1993). São microorganismos mesófilos, com ótimo crescimento entre 35 a 37 °C e em pH 6,5 a 7,5, não competindo bem com outros microorganismos contaminantes. Tem sido descrito amostras adaptadas que crescem na faixa de 5 a 45°C e em pH de 4,5 a 9,5 (D'AOUST, 1997 apud KICH; CARDOSO, 2004). Apresentam crescimento reduzido abaixo de 10°C e são termossensíveis, podendo ser destruídas à 60°C, por 15 a 20 minutos (FORSYTHE, 2002).

Este microrganismo é oxidase negativo, catalase positivo, indol e Voges-Proskauer negativo, lisina e ornitina descarboxilase positiva. Produz H₂S e não hidrolisa a uréia. Usualmente, fermenta carboidratos como a l-arabinose, maltose, D-manose e D-xilose, entre outros (HOLT *et al.*, 1993) e pode ser encontrado no solo, água e plantas, assim como no trato gastrointestinal de homens e animais, eliminado principalmente, pelas excreções fecais (QUINN, 1998). Pode contaminar alimentos ou águas e invadir um segundo ou subseqüente hospedeiro (PELCZAR; REID; CHAN, 1997).

O gênero *Salmonella* está dividido em *Salmonella enterica*, o qual é subdividido em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *hutnae* e *indica*), e *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, por sua vez, possui uma grande variedade de sorotipos ou sorovares, que são designados após a subespécie ou após o gênero, tais como: Enteritidis, Typhimurium, Typhi, e outros. Esta identificação é denominada esquema de Kauffmann & White, sendo classificados por seus antígenos somáticos ou flagelares. Dos aproximadamente 2400 sorovares existentes de salmonela, a maioria pertence à subespécie *enterica* contendo, aproximadamente 99,5% dos sorotipos mais comumente isolados. A sua identificação é realizada por meio de provas bioquímicas e sorológicas, sendo que esta última somente pode ser feita em laboratórios de referência (TRABULSI, 1999).

2.7.2.2.1 *Salmonella* sp. em Humanos e Animais

No Brasil, dos 5.504 municípios, apenas 33,5% possuem rede de esgotos, sendo que 79,8% o lançam diretamente nos cursos d'água (BRASIL, 2002). A ausência de saneamento básico na maioria dos municípios brasileiros torna-se determinante para o aumento de doenças ligadas a contaminação através da água.

A sobrevivência de bactérias nos dejetos, como o gênero *Salmonella* sp., pode vir a contaminar o solo e a água e causar doenças no homem assim como nos animais, que, por sua vez, também necessitam de água de boa qualidade para sua sobrevivência.

O tratamento de dejetos, sejam eles provenientes dos resíduos humanos ou animais, tem demonstrado ser essencial para diminuir o risco sanitário e o impacto que a deposição de matérias orgânicas e nutrientes causa ao meio ambiente (STRAUCH, 1991).

O gênero *Salmonella* sp. inclui várias espécies patogênicas para o homem e os animais, podendo causar febre tifóide e paratifóide (PELCZAR; REID; CHAN, 1996).

O sorovar Enteritidis é o de maior prevalência nos surtos do Rio Grande do Sul (KICH; CARDOSO, 2004 apud GEIMBA, 2004), enquanto que o Typhimurium é o mais isolado de suínos e o segundo nos isolados humanos no mundo (HUMPHREY, 2000 apud KICH; CARDOSO, 2004).

Trabalhos realizados por Rostagno *et al.* (2003 apud SILVA *et al.*, 2006), demonstram a possibilidade de contaminação cruzada entre animais negativos e animais portadores que estão secretando *Salmonella* sp. nas fezes. Hurd (2001 apud SILVA *et al.*, 2006) identificou a presença de *Salmonella* sp. no ambiente das granjas de suínos e demonstrou que os suínos podem apresentar infecção após duas horas de exposição ao ambiente contaminado. Castagna *et al.* (2004) encontrou prevalência média de 83,33% dos suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate. Eles podem ser portadores assintomáticos de *Salmonella* sp., tanto no trato gastrointestinal como em linfonodos mandibulares e tonsilas (CASTAGNA *et al.* 2001) e podem contaminar os alimentos em condições sanitárias precárias (TORTORA, 2002).

Segundo Botteldoorn *et al.* (2003), estima-se que 15 a 20% das infecções humanas por *Salmonella* sp. estão associadas à ingestão de produtos de origem suína. De acordo com este autor, com exceção da *S.Choleraesuis* (septcemias) e alguns tipos de *S. Typhimurium* (enterites), as salmonelas não causam severas doenças aos suínos.

Segundo Kich (2004), o principal ciclo nestes animais é fecal-oral e o período de incubação é de 24-48h, alojando-se geralmente nos linfonodos. Os leitões apresentam diarreia aquosa, amarelada e fétida durante 3 a 7 dias. A doença apresenta uma mortalidade de 4 a 6% e os animais que se recuperam tornam-se portadores, excretando salmonela intermitentemente.

Segundo Schmidt e Cardoso (2003), foi possível identificar a presença de *Salmonella* sp. em 13/20 coletas realizadas em tanque de armazenamento, indicando a presença desta bactéria na granja durante o período do estudo. A constatação desta bactéria em sistemas de produção de suínos tem ocorrido mundialmente, desencadeando programas de controle (Dinamarca e União Européia) (FUNK, 2003) e pressionando os demais países produtores a tomar medidas semelhantes (KICH; CARDOSO, 2004).

Conforme Trabulsi (1999), a *Salmonella* Typhimurium é o segundo sorotipo mais freqüente em infecções alimentares humanas. Com exceção das crianças e idosos, os demais sorovares de salmonela causam, na maioria das vezes, apenas uma enterocolite no adulto que evolui sem complicações, desaparecendo em aproximadamente uma semana.

A salmonelose não tifóide tem um período de incubação em humanos de cerca de 12 a 72 horas (KICH, CARDOSO, 2004), apresentando sintomas como cefaléia, náusea, vômito, cólica abdominal, febre moderada e diarreia. De acordo com Tortora (2002), estes sintomas podem estar relacionados à endotoxinas liberadas pelas células lisadas. A fase aguda dura de 2 a 7 dias sendo que na maioria dos casos são de recuperação espontânea, porém, os imunodeprimidos, crianças e idosos são considerados população de risco (KICH, CARDOSO, 2004).

A salmonela geralmente invade a mucosa intestinal e se multiplica, porém, algumas vezes, passa através da mucosa intestinal para penetrar nos sistemas linfático e cardiovascular podendo se disseminar e afetar vários órgãos (TORTORA, 2002).

A recuperação completa pode ocorrer em alguns dias, mas alguns pacientes podem ser portadores assintomáticos e disseminar o microorganismo em suas fezes por até 6 meses. O diagnóstico geralmente depende de isolar o patógeno nas fezes do paciente ou no alimento, sendo necessário meio especializado seletivo e diferencial para esse fim (TORTORA, 2002).

2.7.2.3 Metodologia para Identificação Qualitativa e Quantitativa de *Salmonella* sp.

A identificação de *Salmonella* sp. em produtos de origem animal é conhecida e consagrada, porém, a sua quantificação não é rotineiramente empregada nos laboratórios de microbiologia alimentar (BOROWSKY; SCHMIDT; CARDOSO, 2007).

A salmonelose é particularmente relevante em saúde pública e tem como fonte de contaminação os alimentos de origem suína. Hald e Wegener (1999 apud GARCIA-FELIZ *et al.*, 2007) relatam casos de salmonelose, atribuídos aos suínos ou aos seus produtos, na Dinamarca, Holanda e Alemanha com 10-15%, 14-19%, 18-23%, respectivamente.

Existem diversas metodologias para isolamento de *Salmonella* sp., mais do que para qualquer outra bactéria (WALTMAN, 1998 apud DAVIES *et al.*, 2000). Há excesso de estudos comparando técnicas de metodologia de isolamento de *Salmonella* sp. em diversos materiais e muitos deles com resultados conflitantes (HARVEY; PRICE, 1981 apud DAVIES *et al.*, 2000). Vários trabalhos reportam a utilização de múltiplos meios de enriquecimento ou combinações destes meios considerando variações no tempo de incubação e temperatura do meio seletivo. A padronização de protocolos é essencial para a interpretação destes dados por diferentes laboratórios (DAVIES *et al.*, 2000).

No entanto, são poucas as metodologias descritas na literatura para quantificação de *Salmonella* sp. baseadas no Número Mais Provável (NMP), tanto em alimentos como em efluentes originado das fezes destes animais, os quais, muitas vezes, são utilizadas como fertilizantes na agricultura. Neste método, utilizam-se diluições de amostras seriadas em meios de cultura líquidos incubados a temperatura recomendada. Os tubos com crescimento positivo são submetidos a testes bioquímicos confirmatórios. O número de bactérias é determinado através de tabelas para estimativa de NMP, com um intervalo de 95% de confiança, e intervalos mínimos e máximos bastante amplos (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

É importante o entendimento de como ocorre a contaminação animal e como reduzir os possíveis focos existentes, principalmente relacionados à contaminação pelas fezes e conseqüente contaminação pelos efluentes produzidos. Portanto, metodologias de quantificação que possibilitem a identificação destes focos de maneira rápida e com

um custo relativamente baixo influenciariam significativamente numa produção animal mais segura e ambientalmente sustentável, com redução no impacto para a saúde pública.

Estudos realizados por Fablet *et al.* (2006), referem que podem ocorrer variações na quantidade de *Salmonella* sp. em fezes líquidas de suínos, devido às condições de armazenamento da amostra (temperatura e tempo de estocagem). Segundo Leitão (1988), uma redução de 10 a 100 vezes na população inicial de bactérias pode ocorrer em alimentos congelados. Este fato também é relatado por Escartin, Lozano e Garcia (2000), quando estudaram esta bactéria no armazenamento de carnes cruas de suíno congeladas. Nesta metodologia foram utilizadas três séries de tubos com cinco diluições para quantificação de *Salmonella* sp.

Sanguinetti *et al.* (2005) utilizaram uma série de cinco tubos de Rappaport-Vassiliadis (RV) em três diluições para avaliação de *Salmonella* sp. em efluentes, utilizando a tabela 9221.IV do Standart Methods (19^a edição). Este método permite o ganho de 24 h no resultado das análises.

Koivunen, Siitonen e Heinonen-Tanski (2003), em seu estudo comparativo e quantitativo sobre *Salmonella* sp., coliformes fecais e totais isolados de dejetos municipais, utilizaram uma série de três tubos com três diluições em água peptonada tamponada.

Flabet *et al.* (2006) compararam dois métodos quantitativos: 1) a técnica de NMP mini-Modified Semi Solid Rappaport Vassiliadis (MSRV), validada por Fravalo *et al.* (2003) e desenvolvida para quantificar *S. enterica* nas fezes de suíno; 2) método de isolamento direto utilizando Agar Verde Brillhante suplementado com rifampicina para estimar a concentração do mesmo microorganismo. Estes autores não acharam diferença entre os dois métodos e avaliam os altos custos necessários para os laboratórios utilizarem a metodologia de NMP clássica, além do tempo empregado para executá-la.

Não sendo a *Salmonella* sp. um bom competidor e estando, freqüentemente, acompanhada por outros microorganismos, torna-se essencial a utilização de meios para enriquecimento seletivos líquidos para seu isolamento e quantificação, o que determina ser a metodologia do NMP a mais adequada (BOROWSKY, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi elaborado em duas fases: 1) comparação e seleção de uma metodologia para determinação quantitativa de *Salmonella* sp., utilizando-se como amostra a água de um tanque de piscicultura da faculdade de Agronomia da UFRGS e água peptonada tamponada, todas artificialmente contaminadas; 2) aplicação de três metodologias a partir de três amostras de intestino de suínos coletada em um frigorífico do Estado do Rio Grande do Sul.

3.1 Comparação entre três metodologias para determinação do NMP de *Salmonella* sp.:

Nesta fase, utilizou-se como amostra a água do Tanque nº 2E da unidade de manutenção de estoque de peixes do Setor de Aqüicultura do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia da UFRGS, onde foi determinada ausência de salmonelas (MICHAEL *et al.*, 2002). Para a determinação metodológica de NMP de salmonelas foram coletadas quatro amostras de 500mL de água em frascos de vidro estéreis e levadas para análises no laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária – UFRGS.

Quatro amostras do efluente deste sistema, coletadas em frascos estéreis, e uma amostra de água peptonada tamponada estéril foram contaminadas artificialmente com uma amostra de *Salmonella* Typhimurium isolada por Schmidt e Cardoso (2003). As amostras inoculadas foram submetidas a três metodologias para determinação do Número Mais Provável (NMP) de salmonelas, as quais foram previamente utilizadas na determinação do NMP de salmonelas em alimento (ESCARTIN; LOZANO; GARCIA, 2000), em águas servidas (KOVUINEN; SIITONEN; HEINONEN-TANSKI, 2003) e em lagoa de tratamento de efluentes (SANGUINETTI, G.S. *et al.*, 2005).

Frascos com amostras de efluente (1000mL) foram, ainda, encaminhadas ao Laboratório de Análises da Faculdade de Agronomia - Departamento de Solos, para as análises de pH, condutividade elétrica, fósforo total, fosfato, DQO, alcalinidade total, amônio, nitrato, nitrito e sólidos totais, segundo a American Health Association (1991).

3.2 Reativação da Amostra de *Salmonella* Typhimurium - S607

Selecionou-se uma amostra de *Salmonella* Typhimurium, isolada de dejetos suínos e identificada como S607 por Schmidt e Cardoso (2003). Para a reativação bacteriana, uma alíquota de 0,2 mL foi retirada da cultura congelada em Infusão de Coração e Cérebro (BHI, DIFCO®) mantida à - 20°C, semeada em 5 mL de caldo de BHI e incubada a 37°C, por 24 horas. Alíquotas do caldo foram semeadas em placas com Agar Soja Triptona (TSA, OXOID®) e incubadas 24 horas a 37°C.

3.3 Preparo do Inoculo

Após reativação do microorganismo, procedeu-se à contaminação artificial de 200 mL de amostra do efluente, com 200 µL de uma suspensão de *Salmonella* Typhimurium em caldo BHI, resultando em 10^5 a 10^6 UFC de salmonela inoculada por mililitro.

Utilizou-se uma amostra de 200 mL de Água Peptonada Tamponada onde inocularam-se 100 µL da suspensão de *Salmonella* Typhimurium, resultando em 10^5 UFC de salmonela por mililitro.

3.4 Contagem de *Salmonella* sp. em Salinas

O microorganismo inoculado foi diluído em solução salina a 0,9% na mesma proporção da amostra e determinado o número de unidades formadoras de colônias da “cultura-teste” através do seguinte procedimento (NEDER, 1992): da diluição 10^{-1} UFC/mL (que corresponde a diluição 1:10) transferiu-se 0,1 mL para placa de Petri com TSA, que foi devidamente espalhado na superfície da placa com alça de Drigalsky. Da diluição 10^{-2} UFC/mL (que corresponde a diluição 1:100) igualmente transferiu-se 0,1 mL para outra placa de Petri com TSA. E assim sucessivamente nas diluições seguintes, que correspondem 1:1000, 1:10.000 até 1:1000.000.000. As placas foram incubadas a 37°C/24 horas. Do conjunto de placas, escolheu-se a diluição que apresentou contagens entre 30 e 300 UFC. O dado obtido na contagem corresponde ao

número de unidades formadoras da “cultura-teste”, as quais tiveram contagens entre 10^5 e 10^6 UFC/mL.

3.5 Determinação qualitativa de *Salmonella* sp.

Paralelamente às análises quantitativas, realizou-se a pesquisa de salmonelas como descrito por Michael *et al.* (2003), onde de cada amostra retiraram-se 25 mL os quais foram adicionados à 225 mL de um meio de pré-enriquecimento constituído por Água Peptonada Tamponada (AES®). A amostra foi homogeneizada e incubada a 37°C/24h. Após, 1,0 mL foi transferido para 9,0 mL de caldo Tetrionato Muller-Kauffmann (TT, Merck®) e 100 µL para 9,9 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV, Merck®), ambos incubados a 42°C/18h. Após incubação, alíquotas dos caldos foram semeadas em meios sólidos seletivos de Xilose-Lisina-Tergitol 4 (XLT₄, Merck®) e Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BPLS, Merck®), incubadas a 37°C/24h. Os isolados foram testados bioquimicamente com Ágar de Três Açúcares Ferro (TSI, Merck®) e Ágar Lisina-Ferro (LIA, Merck®), incubados a 37°C/24h.

3.6 Métodos de determinação quantitativa de *Salmonella* sp. (NMP):

Utilizaram-se três metodologias previamente descritas, nas quais se realizaram modificações ou adaptações, descritas a seguir:

a) Escartin, Lozano e Garcia (2000) modificado: Foram realizadas 5 diluições em triplicata. Para a primeira diluição, 10mL do efluente já inoculados com uma amostra de *Salmonella* Typhimurium foram adicionados a 90 mL de Água Peptonada 0,1%, obtendo-se a diluição 10^{-1} ; a partir desta, as diluições seguintes foram preparadas retirando-se 10 mL da amostra já diluída e acrescentando a 90 mL de Água Peptonada 0,1%, até a diluição 10^{-5} . Estas foram incubadas a 37°C/24h; de cada diluição 0,1mL foi semeado em tubo 9,9 mL de caldo RV, 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 a 37°C/24 a 48h. De cada placa, pelo menos uma colônia com características

morfológicas de salmonela foi repicada em TSI, LIA e Ágar Uréia (Laborclin®) para confirmação de gênero segundo Michael *et al.*(2000) (Apêndice 1).

b) Koivunen, Siitonen e Heinonen-Tanski, (2003), modificado: 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°C/24h; de cada diluição 0,1mL foi transferido para 9,9 mL de caldo RV e incubados a 42°C/18h; 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/24 a 48h. De cada placa, pelo menos uma colônia com características morfológicas de salmonela foi repicada para Ágar TSI, Ágar LIA e Ágar Uréia (Laborclin®) para confirmação do gênero (MICHAEL *et al.*, 2000) (Apêndice 2).

c) Sanguinetti *et al.* (2005), modificado: 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 e incubados a 42°C/18h. 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/24 a 48h. De cada placa, pelo menos uma colônia com características morfológicas de salmonela foi repicada para Ágar TSI, Ágar LIA e Ágar Uréia (Laborclin®) para confirmação do gênero (MICHAEL *et al.*,2000) (Apêndice 3).

Para interpretação dos resultados, as placas de XLD com confirmação de crescimento de salmonela foram relacionadas às respectivas diluições em RV ou Água Peptonada e organizadas segundo o número de tubos positivos em cada diluição, para determinação do NMP correspondente.

3.7 Estimativa do Número Mais Provável de *Salmonella* sp. em amostras de intestino de suínos

Foram coletadas 12 amostras de intestino de suínos em um frigorífico do Estado do Rio Grande do Sul. Destas, separaram-se três amostras suspeitas de contaminação por *Salmonella* sp. conforme análises preliminarmente realizadas em experimento da tese de Luis Eduardo da Silva. Elas foram submetidas aos três métodos de quantificação anteriormente descritos. As três amostras aliqüotadas para análise microbiológica foram armazenadas a -20°C por 15 dias e após mantidas entre 2°C e 8°C por 6 dias. Porções de

25g foram suspendidas em 225mL de Água Peptonada a 1%, homogeneizadas, sendo retiradas alíquotas necessárias para a realização das determinações qualitativas e quantitativas conforme descritas anteriormente. Neste experimento, nas análises quantitativas também foi utilizado o meio seletivo de Agar XLT₄.

3.8 Provas Bioquímicas

3.8.1 Teste de TSI

Com o auxílio de uma agulha de inoculação, retirou-se uma porção do centro de uma colônia típica e, por picada e estrias na rampa, inoculou-se em um tubo com meio contendo TSI inclinado e fundo de no mínimo 2,5 cm. Foram incubados a 37°C/24h, mantendo-se a tampa ligeiramente afrouxada, para obter as condições aeróbicas e prevenir o excesso de produção de H₂S. A reação típica de *Salmonella* sp. observada é aquela com rampa alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H₂S (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

3.8.2 Teste de LIA

Com a mesma agulha, sem flambar e sem necessidade de novo inóculo, procede-se da mesma maneira daquela realizada nos tubos de TSI (37°C/24h). Neste caso, a tampa foi mantida bem fechada, porque a reação de descarboxilação da lisina ocorre anaerobicamente. A reação típica de *Salmonella* sp observada é aquela com fundo e rampa alcalinos (púrpura) com ou sem produção de H₂S (SILVA, JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

3.8.3 Teste de Uréia

Transferiu-se uma alçada com um inóculo pesado da cultura de TSI para o tubo com ágar uréia inclinado e incubou-se a 37°C/24h. A reação típica de *Salmonella* sp. é

negativa, ou seja, sem alteração da cor original (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997). Neste caso, foram incubados paralelamente um controle positivo e outro negativo.

3.9 Controle de Qualidade

Anteriormente à realização do experimento, coletaram-se amostras de três tanques (1D, 2E e 9E) da unidade de manutenção de estoque de peixes do Setor de Aqüicultura do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia da UFRGS para determinação da presença de *Salmonella* sp., como anteriormente descrito.

Para todas as análises realizadas, inclusive as bioquímicas, e em cada repetição do experimento, foi realizado um controle positivo, através de cepa isolada e identificadas através de sorologia por Schmidt e Cardoso (2003).

Os equipamentos utilizados durante o experimento foram monitorados através de controle de temperatura, controle biológico no caso das autoclaves, e pipetas automáticas com certificação. Foram usados para sementeiras, alças de platinas calibradas.

3.10 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.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nenhuma das amostras retiradas do tanque de piscicultura 2E, para realizar a primeira fase do experimento, foi identificada a presença de *Salmonella* sp., sendo possível uma ausência ou um volume de células viáveis/culturáveis abaixo do limite de detecção do método (até 3 NMP/100 mL) (APHA, 1991).

As amostras contaminadas artificialmente com *Salmonella* Typhimurium na primeira fase do experimento resultaram num inóculo que, comparado às metodologias empregadas, foi diferente significativamente nos métodos B ($P < 0,001$) e C ($P < 0,01$). Isto porque, nestes métodos 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. 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). Esta metodologia foi igualmente a melhor identificada por Borowsky (2005), em seu estudo de comparação de duas metodologias para quantificação de *Salmonella* sp. em embutidos de carne suína. Em seu experimento, este método foi aquele que demonstrou valores médios de NMP mais próximo das quantidades inoculadas.

Tabela 1 – Número de unidades formadoras de colônias (Log_{10}) 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 \pm dp ¹	5,487 ^a \pm 0,95	4,441 ^a \pm 1,73	1,380 ^b \pm 0,0	3,204 ^c \pm 0,0

dp = desvio padrão; letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,001$). Amostras nº 1-4 (tanque de piscicultura); Amostra nº 5 (água peptonada).

Nos métodos B e C a quantidade de inóculo foi superior à capacidade de detecção dos métodos. Nestes casos, considera-se que com quantidades menores de inóculo os métodos responderiam melhor à discriminação dos valores de salmonelas a serem detectadas por estas metodologias. Entretanto, em se tratando de efluentes da suinocultura, esperam-se concentrações elevadas deste microrganismo (BAGGESEN *et al.*, 1996 apud KICH; CARDOSO, 2004). Koivunen, Siitonen e Heinonen-Tanski (2003) detectaram salmonela em todas as amostras de dejetos estudadas, sugerindo que estações de tratamento de dejetos de grandes cidades, contêm um número elevado desta bactéria.

Drca, Philipp e Böhm (2005) não encontraram diferença significativa quando compararam duas metodologias para quantificação de *Salmonella* Senftenberg inoculada artificialmente em dejetos biológicos, em relação aos inóculo realizados (10^1 , 10^2 , 10^3 UFC/g), obtendo uma reprodutibilidade de resultados.

Em estudo realizado por Flabet *et al.* (2006), utilizando a técnica de mini-Modified Semi-Solid Rappaport Vassiliadis (MSRV-MPN), publicada previamente por Fravalto *et al.* (2003), relatam que esta técnica parece ser um instrumento adequado para a quantificação de *Salmonella enterica* em efluentes de suínos. Estes autores encontraram nos dejetos de 12% (6/50 lotes) dos rebanhos de suínos com *S. enterica* acima de 110 bactérias mL⁻¹. Esta técnica de miniaturização baixa o custo e o tempo das análises possibilitando, portanto, analisar muitas amostras simultaneamente.

Quando Robinault *et al.* (2005) utilizaram a técnica de MSRV referiram ser esta uma metodologia adequada para quantificação de *Salmonella* sp. em dejetos de suínos, possibilitando uma contagem desta bactéria em concentração baixa, apresentando-se seguro, de fácil operação e baixo custo.

Entretanto, as metodologias clássicas de NMP utilizadas são dispendiosas e demandam tempo e recursos financeiros dos laboratórios (HUSSONG; ENKIRI; BURGE, 1984; CHINIVASAGAM *et al.*, 2004), não sendo apropriados para extensas análises. Os métodos A e B empregados neste experimento, dependem de um dia a mais do que o método C para obtenção dos resultados. Apesar disto, o método A foi o mais apropriado com relação ao inóculo utilizado. 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).

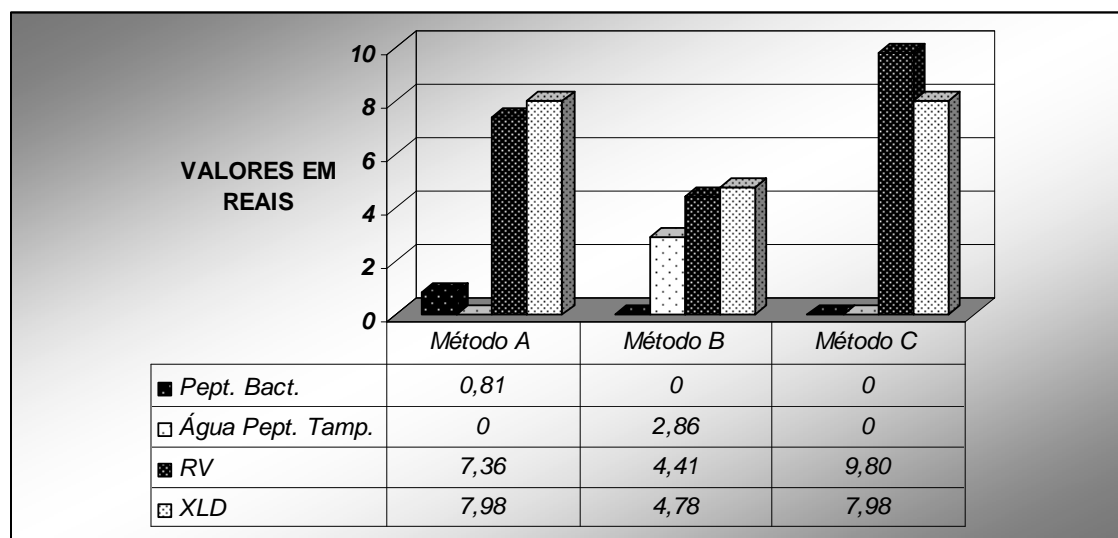


Figura 1 – Análises de custo dos Métodos A (ESCARTÍN; LOZANO; GARCIA, 2000), Método B (KOIVUNEN; SIITONEN; HEINONEN-TANSKI, 2003) e Método C (SANGUINETTI *et al.*, 2005) para determinação do NMP de salmonelas.

Na segunda fase do experimento, quando da utilização de fezes de suínos, a ausência de crescimento de *Salmonella* sp. pode ter sido causada pelo armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 14 dias, seguida de descongelamento em temperatura de $2\text{ a }8\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 6 dias. Borowsky (2007) refere a probabilidade de amostras congeladas causarem estresse e reduzir o número de células viáveis para um nível não detectável. Sinell *et al.* (1990) cita a redução da contagem de *Salmonella* sp. inoculada artificialmente em lingüiça de suíno após um período de 180 dias de congelamento. Escartin, Lozano e Garcia (2000) mostraram, em seus estudos, um claro decréscimo na contagem de *Salmonella* sp. durante o armazenamento de carne de suíno crua em freezer.

O número de células culturáveis, além da presença de microbiota de competição e do baixo número de *Salmonella* sp., pode ter sido fundamental para a ausência de crescimento (FABLET *et al.*, 2005). Apesar da técnica de NMP ser a de melhor escolha para detecção e enumeração de *Salmonella* sp. (RUSS; YANKO, 1981 apud HUSSONG; ENKIRI; BURGE, 1984), existem evidências de que algumas bactérias podem sobreviver longos períodos em estado viável, mas não culturável (PUNDSACK; HICKS; AXLER, 2005). Segundo McKay (1992), a habilidade das bactérias existirem na forma viável, mas não culturável, traz um significativo risco à saúde, pois permite que as bactérias sobrevivam sob condições adversas no meio ambiente e, por isso, a necessidade de métodos com sensibilidade e especificidade para identificá-las.

Apenas uma das amostras do experimento estudado por Silva (2007) obteve resultado positivo, tendo sido confirmada sorologicamente como *Salmonella Infantis*. O

fato de a amostra positiva ser uma daquelas utilizadas neste experimento reforça a possibilidade do tempo e temperatura de armazenamento terem influenciado na sobrevivência deste microorganismo. Nolett *et al.* (2005) estudaram a prevalência de excreção de *Salmonella* sp. em rebanho de suínos (fêmeas) em diferentes fases do ciclo reprodutivo. Os autores encontraram *Salmonella Infantis* em um dos rebanhos pesquisados, comprovando que é necessário reduzir a contaminação de salmonela não só na fase terminal, mas também nas diversas fases do ciclo reprodutivo dos suínos.

Koivunen, Siitonen e Heinonen-Tanski (2003), comprovaram que populações de salmonela podem manter-se viáveis em sedimentos por muito tempo. Em seus estudos, a resistência de linhagens de *Salmonella* aos antimicrobianos (44%) e sua multirresistência (20%) representa um risco à saúde pública. Neste caso, o tratamento de efluentes minimiza a descarga de patógenos no meio ambiente. Porém, estes autores referem que um tratamento de efluentes convencional ainda contém um grande número de bactérias entéricas, sendo necessário um tratamento terciário para que estes microorganismos sejam eficientemente removidos.

Em se tratando deste experimento, outra possibilidade de não ter havido crescimento de salmonela, pode ter sido devido à baixa quantidade desta bactéria no inoculo semeado e também pela presença de outras mais competitivas. Segundo Harvey e Price (1980 apud DAVIES, 2000), deve ser considerada a necessidade de haver um inóculo alto quando é usado um meio de pré-enriquecimento e esclarece que, no caso das fezes de suínos, existe uma dependência do mesmo. Aho (1992 apud DAVIES 2000) ao contrário, sugere que utilizar um meio pré-enriquecido em amostras de fezes com elevada contaminação pode não ser produtivo. A utilização de meios de pré-enriquecimento é uma prática comum, apesar da falta de estudos de sua eficácia (ANON, 1993; HOOFER; BAGGESSEN, 1988 apud DAVIES, 2000).

Segundo Flabet *et al.* (2006), amostras de suínos com infecção subclínicas possuem uma excreta intermitente de salmonela e, conseqüentemente, apresentam baixa contagem nas fezes. Em seus estudos, demonstraram que um percentual baixo de positividade para *Salmonella* sp. em efluentes correspondeu a lotes com alta contaminação.

Sanguinetti *et al.* (2005) não detectaram a presença de *Salmonella* sp. quando analisaram amostras de lagoas de estabilização de tratamento de efluentes.

Os resultados físico-químicos (Tabela 2) demonstram que o tanque de piscicultura (2E), onde foram retiradas amostras para este estudo, encontrava-se em

desacordo para alguns dos parâmetros de águas destinadas à aquicultura e à atividade de pesca (água doce de classe 2) (BRASIL, 2005).

Tabela 2 – Resultados físico-químicos da água do tanque de piscicultura 2E e parâmetros para Água Doce Classe 2.

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- $\mu\text{S}/\text{cm}$	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
Alcalinidade 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) - $\mu\text{g}/\text{L}$	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

Observando a tabela 2, apenas a quantidade de amônio e os sólidos totais das análises físico-químicas realizadas foram satisfatórios quando comparadas aos parâmetros da Resolução 357/05 CONAMA (BRASIL, 2005).

O pH e a temperatura são considerados fatores essenciais na redução/eliminação de coliformes e salmonela (Schmidt, 2002). Segundo Flabet *et al.* (2006) a combinação destes dois parâmetros é a chave para o controle do risco de disseminação de salmonela. A temperatura elevada dos dejetos aumenta a atividade biológica e tem como resultado a eliminação de microorganismos (KOIVUNEN; SIITONEN; HEINONEN-TANSKI, 2003). No caso deste estudo, a segunda amostra foi aquela que apresentou um pH maior e dentro do esperado pelo CONAMA, coincidentemente foi microbiologicamente 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 desta bactéria.

Neste estudo foram analisadas algumas das variáveis físico-químicas utilizadas por Howard *et al.* (2004), que correlacionadas demonstraram ser a DQO a variável mais associada à presença de salmonela. Este fato não pode ser constatado por este

experimento, pois a primeira e a última amostra recuperaram uma quantidade similar ao inoculo utilizado (método A), independente de a DQO ter sido maior na última amostra (tabela 2). Estes autores relatam que a condutividade embora seja uma análise simples e muito utilizada para determinação da qualidade da água é, no entanto, inadequada para monitoramento de efluentes.

Koivunen, Siitonen e Heinonen-Tanski (2003), fizeram uma correlação entre os parâmetros físico-químicos e qualidade microbiológica dos efluentes, tendo concluído que a redução na concentração de DQO, DBO, os sólidos suspensos e o fósforo total estão relacionados com a diminuição de bactérias entéricas.

Entre os principais fatores a serem considerados para a sobrevivência dos peixes estão o oxigênio, a amônia, a temperatura e o pH. Águas com pH entre 6,5 a 9,0 ao amanhecer são consideradas melhores para a produção de peixes. Embora as coletas deste estudo, ocorrido ao redor das 9h da manhã, não tenha atingido os valores ideais de pH, os mesmos não foram críticos para a sobrevivência da *Tilapia* spp cultivadas no tanque 2E. A temperatura interfere diretamente no metabolismo dos peixes, pois a velocidade das reações químicas e biológicas dobra ou triplica para cada 10°C. Neste caso, os tanques de cultivo estavam com manutenção de temperatura, não permitindo que variações pudessem interferir no cultivo dos mesmos. O amônio ionizado ($N-NH_4^+$) identificado, ao contrário do amônio não ionizado (NH_3), é inofensivo aos peixes, exceto em concentrações extremamente altas, não tendo, neste caso, influenciado na sobrevivência dos mesmos (SOUZA, 2007).

Os demais parâmetros indicam que embora a água do tanque analisado não tenham causado dano à sobrevivência dos peixes, este efluente não seria considerado, pela Resolução 357 do CONAMA (BRASIL, 2005), passível de ser liberado nos corpos d'água sem tratamento prévio. Segundo Palhares (2006), efluentes de piscicultura não são tratados, exemplificando no caso a piscicultura catarinense. Comprova-se, assim, em função dos resultados obtidos, a necessidade do cultivo de peixes passar por um monitoramento de sistemas de tratamento.

Outrossim, existem vários estudos indicando que, mesmo com tratamento de efluentes, não há uma garantia de eliminação completa dos microorganismos. E, havendo, no caso da *Salmonella* sp., a possibilidade de seleção de linhagens mais virulentas, devem ser tomadas medidas de controle nos rebanhos para atenuar os riscos de transmissão de salmonelose (ESPIGARES *et al*, 2006), seja para a espécie humana ou animal. Howard *et al*. (2004) encontraram após o tratamento de água um conteúdo

em NMP de salmonela de 45/100mL. Chinivasagam *et al.* (2004), em quatro das 13 lagoas finais de tratamento das granjas pesquisadas na Austrália, acharam um conteúdo de até 51 NMP 100mL⁻¹.

Sanguinetti *et al.* (2005), contaminando artificialmente com *Salmonella enteritidis* amostras de lagoas de tratamento primário, conseguiram uma redução de 7,0 x 10⁶ UFC para 3,0 x 10⁴ UFC após 115 dias de armazenamento. Embora estes autores, tenham conseguido a redução de 99% na concentração inicial de *Salmonella* sp., sem um tratamento complementar estes efluentes não poderiam ser utilizados na agricultura ou como água de abastecimento.

Koivunen, Siitonen e Heinonen-Tanski (2003) também recomendam o tratamento de efluentes para minimizar as infecções por microorganismos patogênicos, pois a qualidade da água utilizada para a agricultura ou para beber deve ter qualidade elevada.

Medidas como o tratamento de efluentes juntamente com controles microbiológicos e físico-químicos irão amenizar os riscos de distribuição e conseqüente consumo de água contaminada às comunidades urbanas e rurais (humanas ou animais).

Enquanto os dejetos suínícolos 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 (PALHARES, 2007a).

5 CONCLUSÕES

De acordo com os achados neste estudo conclui-se que:

- O método A foi aquele que recuperou melhor a quantidade de *Salmonella* Tiphymurium inoculada, sendo, neste caso, a melhor metodologia de NMP para análise de efluente.
- Os métodos B e C apresentaram diferenças estatísticas quando comparado os valores encontrados ao inóculo utilizado.
- O método C, segundo o levantamento de custo realizado é o mais caro, embora necessite de menos tempo para obter os resultados.
- A ausência de *Salmonella* sp. na segunda fase do experimento pode ter sido resultado do tempo e temperatura de armazenamento e, também da concentração de bactéria presente na amostra.
- As análises físico-químicas apontam para um efluente não satisfatório quando comparado a CONAMA 357/05.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standart methods for the examination of water and wastewater**. 18 ed. Washington: Apha, 1991. v.1. 702 p.

BARCELLOS, L.J.G.(org.) A piscicultura na região, no estado, no país e no mundo. In: _____. **Policultivo de Jundiás, Tilápias e Carpas**: uma alternativa de produção para a piscicultura rio-grandense. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2006. cap.1, p.17-26.

BELLAVER, C.; FIGUEIREDO, E.P. **Conjuntura da avicultura e suinocultura para 2007**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_j0t46v1f.pdf> Acesso em: 21 jul. 2008.

BELLI FILHO, P. *et al.* Tecnologias para tratamento de dejetos de suínos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v.5, n.1, p.166-170, 2001.

BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella sp.* em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 80-84, abr./jun. 2004.

BETTEGA, J.M.P.R. *et al.* Métodos analíticos no controle microbiológico da água para consumo humano. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v.30, n. 5, p.950-954, set./out. 2006.

BOTTELDOORN N. *et al.* *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.95, p. 891-903, 2003.

BOROWSKY, L. M. **Comparação de dois métodos de quantificação de *Salmonella sp.* em embutidos suínos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BOROWSKY, L.M.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. Estimation of most probable number of *Salmonella* in minced pork samples. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 38, p.544-546, 2007.

BRANDÃO, V.S. *et al.* Tratamento de águas residuárias da suinocultura utilizando-se filtros orgânicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 3, p. 327-333, fev. 2000.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 375 de 29 de agosto de 2006. 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. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 30 de agosto de 2006, p.141-146. Disponível em:
<<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=506> Acesso em: 05 out. 2008.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 20 de 18 de junho de 1986. Dispõe sobre a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 30 de julho de 1986, p. 11356-11361. Disponível em:
<http://www.jurisambiente.com.br/ambiente/arq_legislacao/Resolu%C3%A7%C3%A3o%20CONAMA%2020%202086.pdf > Acesso em: 21 ago.2008.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 18 de março de 2005, Seção 1, p. 58-63.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Lei Federal nº 6438 de 31 de agosto 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 02 de setembro de 1981. Disponível em:
<http://www.cetesb.sp.gov.br/licenciamento/legislacao/federal/leis/1981_Lei_Fed_6938.pdf> Acesso em: 28 maio 2008.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Lei Federal nº 7804 de 18 de julho de 1989. Altera a Lei n. 6.938, de 31 de agosto de 1981, que dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, a Lei n. 7.735, de 22 de fevereiro de 1989, a Lei n. 6.803, de 2 de julho de 1980, a Lei n. 6.902, de 21 de abril de 1981, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 20 de julho de 1989. Disponível em:
<http://sigam.ambiente.sp.gov.br/sigam2/legisla%c3%a7%c3%a30%20ambiental/Lei%20Fed%201989_7804.pdf > Acesso em: 28 maio 2008.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Lei Federal nº 9433 de 8 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da

Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989. **Diário Oficial [da] República Federativa da União**, Brasília, DF, 09 de janeiro de 1997, seção 1, p. 470, v. 135, n. 6. Disponível em: < <http://www.aneel.gov.br/cedoc/blei19979433.pdf> > Acesso em: 28 maio 2008.

BRASIL, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2000**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2002. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb/pnsb.pdf>> Acesso em: 17 abr. 2007

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Portaria MS nº 518 de 25 março de 2004. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2005. 28 p.

CASTAGNA, S.M.F. *et al.* Prevalência de suínos portadores de *Salmonella sp.* ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.32, n. 2, p. 141-147, 2004.

CASTAGNA, S.M.F. *et al.* Resistência a antimicrobianos de amostras de *Salmonella sp.* isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS**, Porto Alegre, v. 29, n. 1, p. 44-49, 2001.

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

CHINIVASAGAN, H.N. *et al.* Microbiological status of piggery effluent from 13 piggeries in the south east Queensland region of Australia. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p. 883-891, 2004.

DAL BOSCO, L. **Suinocultura busca soluções para o consumo interno e gerar riquezas para o país**. Curitiba: Associação Paranaense de Suinocultores, 2008.

Disponível em: <http://www.aps.org.br/index.php?option=com_content&task=view&id=106> Acesso em: 27 ago. 2008.

DAVIES, P.R. *et al.* Comparison of methods for isolating *Samonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, p.169-177, 2000.

DAY, D.L.; FUNK, T.L. Processing manure: physical, chemical and biological treatment. In: HATFIELD, J.L.; STEWART, B.A. **Animal waste utilization: effective use of manure as a soil resource**. New York: Lewis Publishes, 2002. p. 243-282.

DIESEL, R.; MIRANDA, C. R.; PERDOMO, C. C. Coletânea de tecnologias sobre dejetos suínos. Concórdia: **Embrapa Suínos e Aves**, ago. 2002. 31p. (Boletim Informativo). Disponível em:
<http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=publicacoes&cod_publicacao=317 >
Acesso em: 16 jul. 2008.

DRCA, M.; PHILIPP, W.; BÖHM, R. A comparison of three methods for isolation of *Salmonella* from biological waste. **International Society for Animal Hygiene- ISAH v.2**, Boxter, The Netherlands, 2005. Disponível em:
<http://www.isah-soc.org/documents/2005/sections/61_vol_2.pdf> Acesso em: 17 ago. 2008

ESCARTÍN, E.F.; LOZANO, J.S.; GARCIA, O.R. Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 54, p. 19-25, 2000.

ESPIGARES, E. *et al.* Isolation of *Salmonella* serotypes in wastewater and effluent: effect of treatment and potential risk. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 209, p. 103-107, Aug. 2006.

FABLET, C.H. *et al.* *Salmonella enterica* level in French pig farms effluents: experimental and field data. **Livestock Science**. Amsterdam, v. 102, p. 216-225, Mar. 2006.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FRAVALO, P., *et al.* Convenient method for rapid and quantitative assessment of *Salmonella enterica* contamination: the mini-MSRV-MPN technique. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, Trumbull, v.11, p.81-88, 2003.

FUNK, J. Pré-harvest food safety diagnostics for *Salmonella* serovares: part.1: Microbiological culture. **Journal of Swine Health and Production**, Perry, v. 11, n. 2, p. 87-90, 2003.

GARCIA-FELIZ, C. *et al.* *Salmonella enterica* infections in spanish swine fattening units. **Zoonoses and Public Health**, Berlim, v. 54, p.294-300, Oct. 2007.

GREWAL, S.; SREEVATSAN, S.; FREDERICK, C. JR. M. Persistence of *Listeria* and *Salmonella* during swine manure treatment. **Compost Science & Utilization**, Emmaus, Mar. 2007. Disponível em: <<http://www.redorbit.com/modules/news/tools.php?tool=print&id=858258>> Acesso em: 28 jul. 2008

HARVEY, R.W.S.; PRICE, T.H. *Salmonella* isolation with Rappaport's medium after pre-enrichment in buffered peptone water using a series of inoculum ratios. **Journal of Hygiene**, Inglaterra, v. 85, p.125-128, 1980.

HEINONEN-TANSKI, H. *et al.* *Salmonella* in animal slurry can be destroyed by aeration at low temperatures. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, n. 2, p. 277–281 Aug.1998. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119136487/PDFSTART>> Acesso em: 15 jul. 2008

HIGARASHI, M.M.; KUNZ, A.; OLIVEIRA, P.A.V. Redução da carga poluente: sistemas de tratamento. In: SEGANFREDO, M. A. **Gestão Ambiental na Suinocultura**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. v.1, cap.5, p.121-147.

HOLT, J.G. *et al.* **Berguey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1993. p. 175-222.

HOWARD *et al.* Evaluation of microbiological and physicochemical indicators for wastewater treatment. **Environmental Toxicology**, New York, v. 19, n. 3, p.241-249, 2004.

HUSSONG, D.; ENKIRI, N.K.; BURGE, W.D. Modified agar medium for detecting environmental salmonellae by the most-probable-number method. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 5, p. 1026-1030, Nov. 1984. Disponível em: <<http://www.aem.org/cgi/reprint/48/5/1026>> Acesso em: 16 ago. 2008.

HUTCHISON, M.L. *et al.* Analyses of livestock production, waste storage, and pathogen levels and prevalences in farm manures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1231-1236, Mar. 2005a.

HUTCHISON, M.L. *et al.* Fate of pathogens present in livestock wastes spread onto fescue plots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 691-696, Feb. 2005b.

ISLAM, M. *et al.* Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water.

Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 70, n. 4, p. 2497-2502, Apr. 2004. Disponível em:
<<http://www.aem.asm.org/cgi/reprint/70/4/2497>> Acesso em: 28 jul. 2008.

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

KICH, J.D.; CARDOSO, M. **Salmonela em suínos**: segurança alimentar e situação do Brasil. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2004. Disponível em:
<http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=artigos&cod_artigo=30> Acesso em: 01 ago.2008

KOIVUNEN, J.; SIITONEN, A.; HEINONEN-TANSKI, H. Elimination of enteric bacteria in biological-chemical wastewater treatment and tertiary filtration units. **Water Research**, New York, v. 37, p. 690-698, Feb. 2003.

KUNZ, A.; HIGARASHI, M.M.; OLIVEIRA, P.A.V. Redução de carga poluente: a questão dos nutrientes. In: SEGANFREDO, M. A. **Gestão Ambiental na Suinocultura**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. v. 1, cap. 4, p. 105-118.

KUNZ, A. **Remoção de nitrogênio em dejetos de suínos**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005a. Disponível em:
<http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_s185q3t.pdf> Acesso em: 21 jul. 2008

KUNZ, A. **Tratamento de dejetos**: desafios da suinocultura tecnificada. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005b. Disponível em:
<http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_q0v75q0p.pdf> Acesso em: 21 jul. 2008.

LEITÃO, M.F.F. Microbiologia de alimentos. In: Roitman, I.; Travassos, L. R.; Azevedo, J. L., ed. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo, 1988. v. 2, p. 70-75.

LIBÂNIO, P.A.C.; CHERNICHARO, C.A.L.; NASCIMENTO, N.O. A dimensão da qualidade da água: avaliação da relação entre indicadores sociais, de disponibilidade hídrica, de saneamento e saúde pública. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, p.219-228, jul./set. 2005. Disponível em: <<http://www.abes-dn.org.br/publicacoes/engenharia/resaonline/v10n03/v10n03a05.pdf> > Acesso em: 07 abr. 2007

LIMA, G.J.M.M. **A poluição ambiental por dejetos de suínos e o papel dos técnicos e nutricionistas**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2000. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=artigos&cod.artigo=165>> Acesso em 17 jul. 2008.

LIMA, G.J.M.M., Nutrição de Suínos: ferramenta para reduzir a poluição causada pelos dejetos e aumentar a lucratividade do negócio. In: SEGANFREDO, M. A. **Gestão Ambiental na Suinocultura**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. v. 1, cap. 3, p. 65-101.

LUDKE, J.V.; LUDKE, M.C.M.M. **Produção de suínos com ênfase na preservação do ambiente: 2- Manejo da nutrição**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2003. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=artigos_artigos=89> Acesso em: 06 ago. 2008

McKAY, A.M. Viable but non-culturable forms of potentially pathogenic bacteria in water. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 14, p. 129-135, 1992. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119840987/pdfstart>> Acesso em: 16 ago. 2008.

MICHAEL, G.B. *et al.* Sorotipos de *Salmonella* isolados em uma propriedade de suínos de terminação no sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n. 3, p.525-527, jun. 2002.

MICHAELSEN, R. *et al.* Sobrevivência de coliformes em sistema anaeróbio para tratamento de dejetos de suínos. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE QUALIDADE AMBIENTAL**, 2008, Porto Alegre. Anais do Simpósio. Porto Alegre: ABES - RS, 2008. Disponível em: < <http://www6.ufrgs.br/sga/coliformes.pdf>> Acesso em: 30 ago. 2008.

MIELE, M.; KUNZ, A. **Tratar dejetos para fortalecer a competitividade da carne suína**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_k2j7811t.pdf> Acesso em: 21 jul. 2008.

MIRANDA, C.R. Aspectos ambientais da suinocultura brasileira. In: SEGANFREDO, M. A. (Coord.) **Gestão Ambiental na Suinocultura**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. v. 1, cap. 1, p. 15-35.

MIRANDA, C.R. **Ordenamento sustentável da suinocultura em Santa Catarina**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. Disponível em:

<http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_k8d36l7j.pdf> Acesso em: 17 maio 2008.

MORÉS, N.; ZANELLA, J.C. **Perfil sanitário da suinocultura no Brasil**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. Disponível em:

<http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_x1b40v7z.pdf> Acesso em: 22 maio 2008.

NEDER, R.N. **Microbiologia**: manual de laboratório. São Paulo: Nobel, 1992. 138p.

NOLLET, N. et al. *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 36, p.645-656, 2005.

OLIVEIRA, P.A.V. **A escolha do sistema para manejo dos dejetos de suínos: uma difícil decisão**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2000. Disponível em:

<http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=artigos&cod_artigo=160> Acesso em 17 maio 2008.

OLIVEIRA, P.A.V. (Coord.). **Manual de manejo e utilização dos dejetos de suínos**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 1993. 188 p.

OLIVEIRA, P.A.V.; SILVA, A.P.; PERDOMO, C.C. Aspectos construtivos na produção de suínos visando aos aspectos ambientais de manejo dos dejetos. In: SEGANFREDO, M. A. (Coord.). **Gestão Ambiental na Suinocultura**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. v. 1, cap. 7, p. 179-215.

PALHARES, J.C.P. **Análise ambiental para a produção de suínos no sul do Brasil**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007a. Disponível em:

<<http://www.porkworld.com.br/index.php?documento=1038#>> Acesso em: 08 abr. 2008.

PALHARES, J.C.P. **A nova resolução CONAMA 357 e a produção de suínos e aves**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. Disponível em:

<http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=artigos&cod_artigos=216> Acesso em: 17 maio 2008.

PALHARES, J. C. P., CALIJURI, M.C. Caracterização dos afluentes e efluentes suinícolas em sistemas de crescimento terminação e qualificação de seu impacto ambiental. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, p. 502-509, mar.- abr. 2007a. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v37n2/a32v37n2.pdf>> Acesso em: 09 abr. 2008.

PALHARES, J.C.P.; CALIJURI, M.C. **Impacto de sistemas de produção suinícola na qualidade dos recursos hídricos**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007b. Disponível em: <<http://www.porkworld.com.br/index.php?documento=1037>> Acesso em 15 jul. 2007.

PALHARES, J.C.P. **Considerar as diferenças para resolver os problemas ambientais da suinocultura**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2003. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=artigos&cod_artigos=91> Acesso em: 17 maio 2008.

PALHARES, J.C.P. Criação integrada entre piscicultura e suinocultura. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS, 5., In: SEMINÁRIO DE AQUICULTURA, MARICULTURA E PESCA, 2., 2005. **AveSui**, Florianópolis, 2006. p. 15-26.

PALHARES, J.C.P.; JACOB, A.D. **Impacto ambiental da suinocultura nos recursos hídricos**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. Disponível em: <<http://www.porkworld.com.br/index.php?documento=1032>> Acesso em: 09 abr. 2008.

PALHARES, J.C.P. Legislação ambiental e suinocultura: barreiras leis e futuro. In: SEGANFREDO, M.A. (Coord.). **Gestão Ambiental na Suinocultura**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007b, v. 1, cap. 2, p. 39-61.

PALHARES, J.C.P. **Monitoramento da qualidade da água**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007c. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_s7f57p4z.pdf> Acesso em: 21 jul. 2008.

PAIVA, D.P. Manejo de resíduos para controle de moscas em suinocultura industrial. In: SEGANFREDO, M.A. (Coord.). **Gestão Ambiental na Suinocultura**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. v. 1, cap. 9, p. 243-250.

PELCZAR, M.; KRIEG, R. N.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 1996. p. 591-770. 2 v.

PELL, A.N. Manure and microbes: public and animal health problem? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n.10, p. 2673-2681, 1997.

PERALES, I.; AUDICANA, A. Semisolid media for isolation of *Salmonella spp.* from coastal waters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 11, p. 3032-3033, Nov. 1989.

PERDOMO, C.C. **Alternativas para o manejo e tratamento de dejetos**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2001. Disponível em:
<http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=artigos&cod_artigos=142> Acesso em: 17 maio 2008.

PERDOMO, C.C.; LIMA, G.M.M.; NONES, K. Produção de suínos e meio ambiente. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO DA SUINOCULTURA, 9., 2001, Gramado. **Anais...** Gramado: CNPSA, 2001. p. 11-17.

PERDOMO, C.C.; LIMA G.J.M.M.; SCOLARI T.M.G. **Situação da Suinocultura no Brasil**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006. Disponível em:
< <http://www.ambienteemfoco.com.br/?p=182>> Acesso em: 27 ago. 2008.

PILARSKI, F. *et al.* Consórcio suíno-peixe: aspectos ambientais e qualidade do pescado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 2, p. 267-276, mar./abr. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v33n2/21237.pdf>> Acesso em: 07 abr. 2007.

PILLON, C.N. **Termo de ajuste de conduta para a suinocultura**: primeiro fruto da parceria Embrapa e consórcio Lambari. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2000. Disponível em:
<http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=publicacoes&cod_publicacao=167> Acesso em: 17 maio 2008.

PUNDSACK, J.W.; HICKS, R.E.; AXLER, R.P. Effect of alternative on-site wastewater treatment on the viability and culturability of *Salmonella choleraesuis*. **Water Science & Technology**, Oxford, v. 3, n. 1, 2005.

QUINN, P. J. *et al.* **Clinical veterinary microbiology**. 4^oed. London: Mosby, 1998. p. 209-213.

RELATÓRIO anual de atividades 2005 da Embrapa Suínos e Aves. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006. Disponível em:
<http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_v8z85q9v.pdf> Acesso em: 31 ago. 2008.

RIO GRANDE DO SUL, Assembléia Legislativa. Lei Estadual nº 11520 de 03 de agosto de 2000. Institui o Código Estadual do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. **Diário Oficial da Assembléia Legislativa**, Porto Alegre, RS, 04 de agosto de 2000. Disponível em:
<<http://www.al.rs.gov.br/legiscomp/arquivo.asp?rotulo=Lein11520pidnorma=11&tipo=pdf>> Acesso em: 28 maio 2008.

ROBINAULT, C. *et al.* Influence and interaction of different parameters on the survival of two strains of *Salmonella enterica* in pig slurry. **International Society for Animal Hygiene- ISAH** v.2, Boxter, The Netherlands, 2005. Disponível em: <http://www.isah-soc.org/documents/2005/sections/73_vol_2.pdf> Acesso em: 17 ago. 2008.

ROCHA, D.C.C. Suinocultura: pesquisa mostra que rebanho suíno cresceu 3,3% no ano passado. **Zootecnia Brasil**, Montes Claros, 2007. Disponível em: <<http://www.zootecniabrasil.com.br/sistema/modules/news/article.php?storyid=1167>> Acesso em: 27 ago. 2008.

ROCHA, D.C.C. Suinocultura: exportação de carne suína sobe 2,7% em junho. **Zootecnia Brasil**, Montes Claros, 2008. Disponível em: <<http://www.zootecniabrasil.com.br/sistema/modules/news/article.php?storyid=1659>> Acesso em: 27 ago.2008.

ROCHA, D.C.C.; PINTO, M. Suinocultura: suinocultura quer crescer e investe em reaproveitamento de dejetos nas criações. **Zootecnia Brasil**, Montes Claros, 2008. Disponível em: <<http://www.zootecniabrasil.com.br/sistema/modules/news/article.php?storyid=1728>> Acesso em: 27 ago. 2008.

SANGUINETTI, G.S. *et al.* Investigating helminth eggs and *Salmonella sp.* in stabilization ponds treating septage. **Water Science & technology**, Oxford, v. 51, n. 12, p. 239-247, 2005.

SANTA CATARINA, Fundação do Meio Ambiente do Estado de Santa Catarina. Portaria nº 002 de 09 de janeiro de 2003. Disciplina o ordenamento e a tramitação dos processos de licenciamento ambiental e dá outras providências. **Diário Oficial**, Florianópolis, SC, 16 jan. 2006, p. 75-80. Disponível em: <http://www.sorbent.com.br/legislacao_SC.htm> Acesso em: 28 maio 2008.

SANTOS FILHO, J.I.; CHIUCHETTA, O.; TALAMINI, D.J.D. **A suinocultura na virada do milênio**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2000. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=artigos&cod_artigo=182> Acesso em: 22 maio 2008.

SANTOS, M.A.A. *et al.* Esterqueiras: avaliação físico-química e microbiológica do dejetos de suíno armazenado. **Engenharia Agrícola**, Sorocaba, v. 27, n. 2, p. 537-543, maio/ago. 2007.

SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. R. I. Sobrevivência e perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella sp.* isoladas em um sistema de tratamento de dejetos de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 881-888, set.- out. 2003.

SCHMIDT, V.; GOTTARDI, C. P. T.; NADVORNY, A. Segurança sanitária durante a produção, o manejo e a disposição final de dejetos suínos. In: SEGANFREDO, M.A. (Coord.). **Gestão Ambiental na Suinocultura**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. v.1, cap.11, p.261-286.

SCHMIDT, V. *et al.* Perfil físico-químico e microbiológico de uma estação de tratamento de dejetos de suínos. **ARS Veterinária**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 287-293, dez. 2002

SEGANFREDO, M.A. **A poluição por dejetos de suínos. O aspecto econômico e o direito público**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=artigos&cod_artigo=115> Acesso em: 17 maio 2008.

SEGANFREDO, M.A. **Dejetos animais: a dupla face benefício e prejuízo**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2004. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=artigos&cod_artigo=34> Acesso em: 17 maio 2008.

SEGANFREDO, M.A.; PERIN JÚNIOR, V. **Dejetos de suínos: adubo ou poluente?** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_q5c76o7i.pdf>. Acesso em: 17 maio 2008.

SEGANFREDO, M.A. Uso de dejetos de suínos como fertilizante e seus riscos ambientais. In: SEGANFREDO, M. A. **Gestão Ambiental na Suinocultura**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. v. 1, cap. 6, p. 151-175.

SILVA, L.E. **Estudo longitudinal da infecção por *Salmonella sp.* em um sistema integrado da produção de suínos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela Ltda, 1997. 295p.

SILVA, L.E. *et al.* Infecção por *Salmonella enterica* em suínos criados em um sistema integrado de produção do sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootécnica**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 455-461, ago. 2006b.

SINELL, H. J *et al.* Estimation of most probable number of *Salmonella* in retail samples of minced pork. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 11, p. 135-142. 1990.

SOUZA, S.M.G. **Qualidade da água para o cultivo de peixes**. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. 74 p.

STRAUCH, D. Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 10, n. 3, p. 813-846, Sept. 1991.

TALAMINI, D.J.D. **Evolução recente e perspectivas da suinocultura brasileira para 2005**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_m6e44g9.pdf> Acesso em: 17 maio 2008.

TIAGO, G.G.; GIANESELLA, S.M.F. O uso da água pela aqüicultura: estratégias e ferramentas de implementação de gestão. **Revista do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 1-7, 2003.

TORTORA, G.J. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 827p.

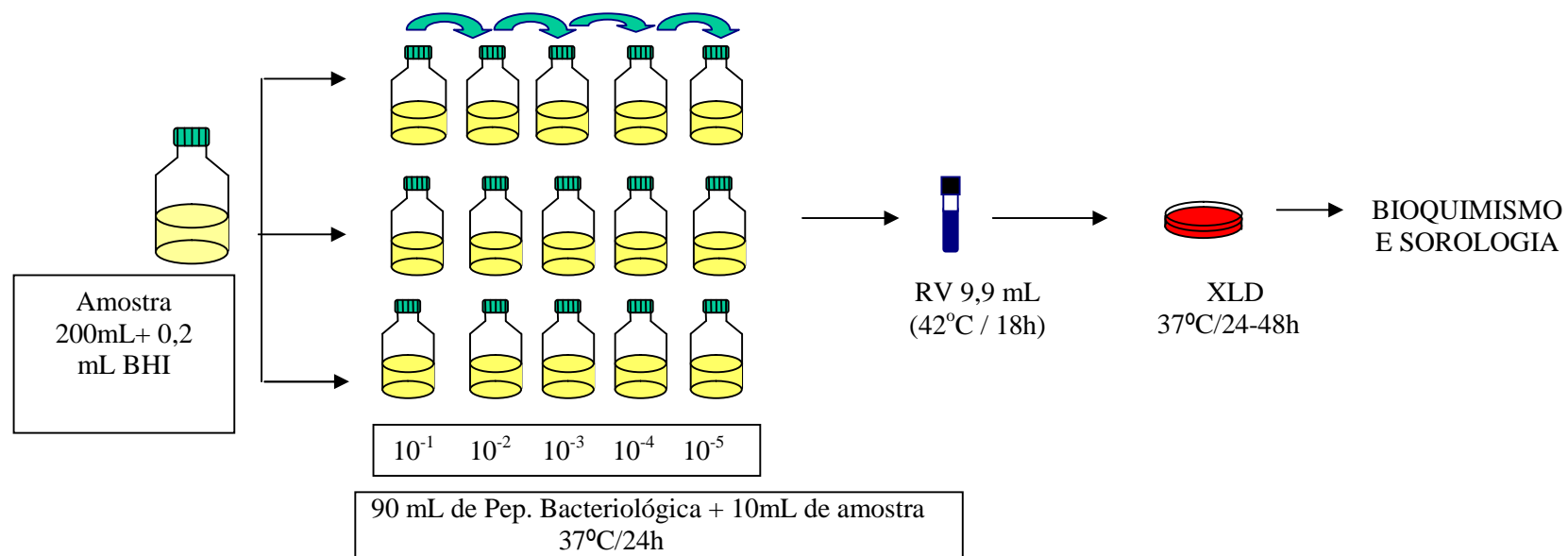
TRABULSI, L.R. *et al.* **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 207-234.

VENGLOVSKY, J.; MARTINEZ, J.; PLACHA, I. Hygienic and ecological risks connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 102, p. 197-203, 2006.

WATABE, M. *et al.* Prevalence of bacterial faecal pathogens in separated and unseparated store pig slurry. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 208-212, Apr. 2003.

APÊNDICE A

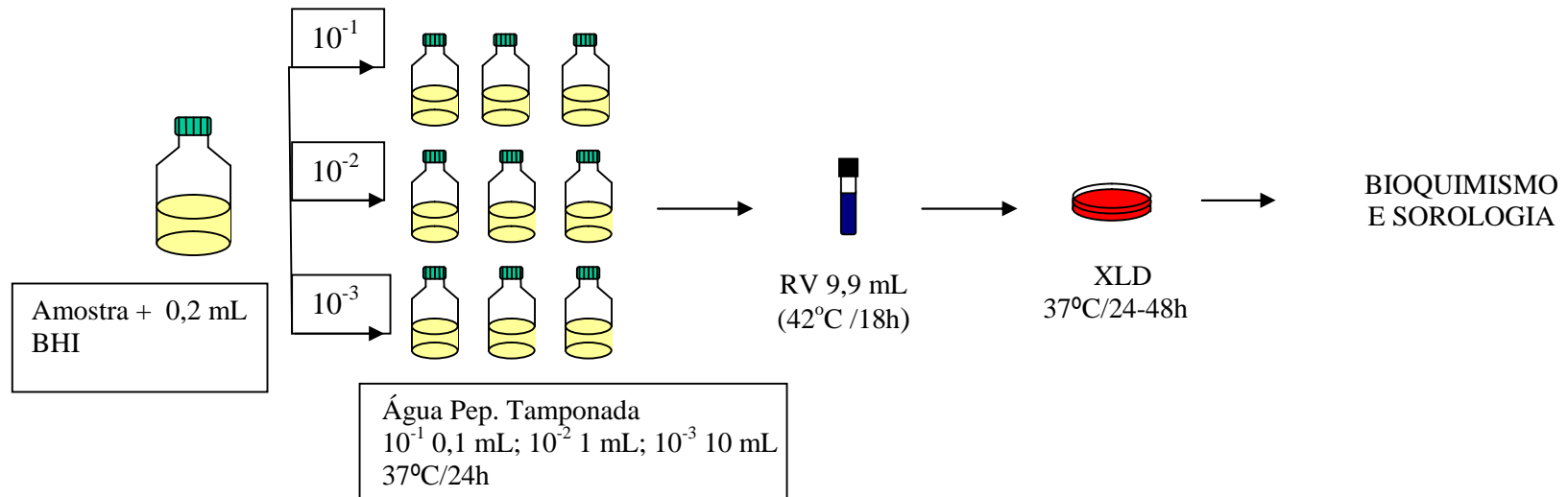
MÉTODO A



ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE NMP DO MÉTODO DE ESCARTÍN, E.F.; LOZANO, J.S.; GARCIA, O.R., (2000)

APÊNDICE B

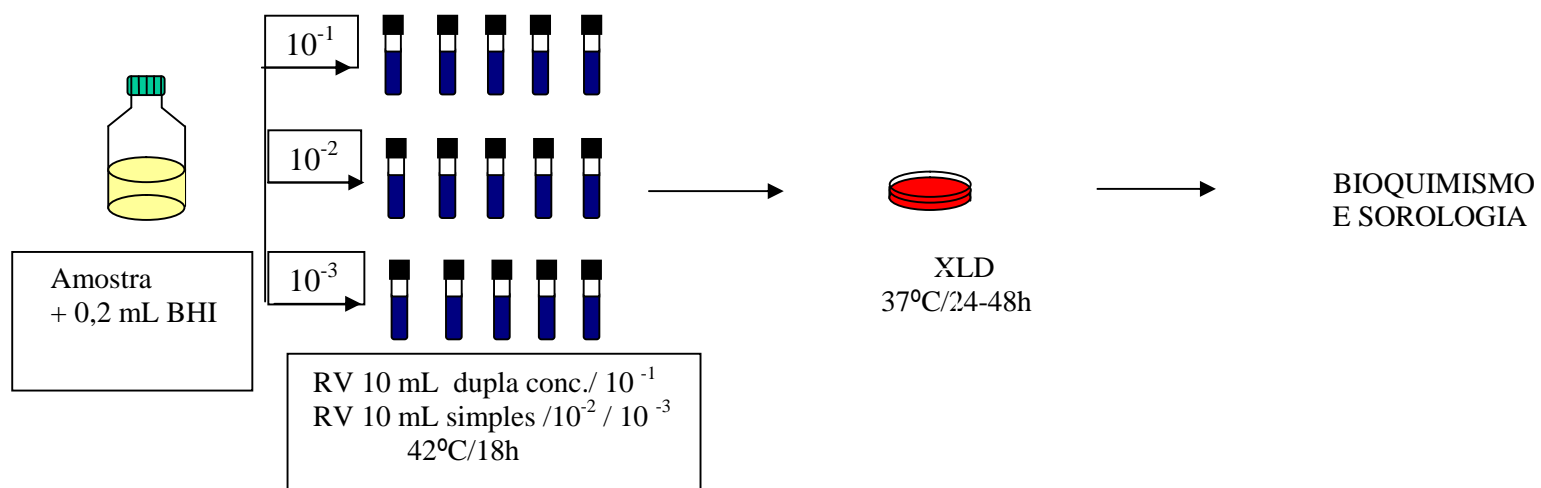
MÉTODO B



ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE NMP DO MÉTODO DE KOVUINEN *et al.*, (2003)

APÊNDICE C

MÉTODO C



ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE NMP DO MÉTODO DE SANGUINETTI *et al.*, (2005)