



Avaliação da eficácia do tratamento de esgotos de um sistema de lagoa de estabilização através da identificação de população bacteriana

Sewage treatment efficacy evaluation of a stabilization lagoon system throughout identification of bacteria population

Margaroni Fialho de Oliveira¹, Elisabeth Beatriz Pilz¹, Giovani Sebben Bellincanta, Nilza Limberger¹, Neida Terezinha Macedo², Gertrudes Corção², José Carlos Germani³ & Sueli Teresinha Van Der Sand²

RESUMO

As lagoas de estabilização para tratamento de esgoto sanitário são processos biológicos eficientes e econômicos utilizados como solução satisfatória para a remoção de microrganismos potencialmente patogênicos. Neste trabalho, foram isoladas e identificadas bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas presentes na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) - Ipanema, Porto Alegre/RS com o objetivo de avaliar a eficiência do processo de tratamento de esgotos. Foram realizadas coletas trimestrais durante o período de um ano. As amostras foram coletadas do afluente, da lagoa facultativa, da lagoa de maturação e do efluente, semeadas em diferentes meios de cultura para a identificação bacteriana. Foram isoladas e identificadas 392 bactérias, destas 40.8% pertencentes ao gênero *Enterobacter*, 29.6% ao gênero *Bacillus*, 6.63% de *Acinetobacter* e, 4.84% do gênero *Alcaligenes* e os demais 18.13% distribuídos entre outros 12 gêneros, os quais foram predominantemente Gram-negativos. Observou-se um decréscimo no número de coliformes totais e fecais no afluente e efluente, como dos gêneros bacterianos durante as etapas do sistema de tratamento bem como a DBO, demonstrando a eficácia do processo.

Descritores: microrganismos patogênicos, tratamento de esgotos, lagoas de estabilização, coliformes totais e fecais.

ABSTRACT

Stabilization lagoons are being used as an efficient and economical bioprocess designed to treat domestic sewage in order to reduce potentially pathogenic bacteria from wastewaters. In this work aerobic and facultative anaerobic bacteria were isolated and identified of a sewage treatment plant (ETE-Ipanema) in Porto Alegre, RS. The main objective was to evaluate the efficiency of the treatment process. To accomplish this task, samples from the incoming raw sewage, facultative lagoon, maturation lagoon and treated sewage were collected and analyzed every three months during a period time of one year. A total number of 392 bacteria isolates were identified, 40.8% were from the genera *Enterobacter*, 29.6% genera *Bacillus*, 6.63% were *Acinetobacter*, 4.48% from genera *Alcaligenes* and 18.13% belonged to other 12 genera. A significant decrease in fecal and total coliform counts, BOD concentration was observed of the affluent and effluent. Also the bacteria genera decreases throughout the different stages of the sewage treatment process as an indication of the efficacy of the process.

Key words: pathogenic microorganisms, sewage treatment, stabilization lagoons, fecal and total coliform.

INTRODUÇÃO

Esgotos têm sido considerados uma das maiores fontes de microrganismos patogênicos encontrados em ambientes aquáticos. Processos de tratamento de esgotos significativamente diminuem a incidência de doenças veiculadas a água, entre a população humana.

Microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella* sp., *Vibrio* sp., *Aeromonas hydrophila*, naturalmente são encontrados nos ambientes aquáticos e por isso infecções causados por esses microrganismos dependem do tempo de exposição na água [4]. No entanto, os microrganismos que causam as maiores preocupações e estão associados a água, são aqueles oriundos do intestino de humanos e animais de sangue quente, os quais entram no ambiente aquático via contaminação fecal. Doenças diarreicas de veiculação hídrica, têm sido responsáveis por vários surtos epidêmicos e pelas elevadas taxas de mortalidade infantil relacionadas a água de consumo humano [8], resultado das precárias condições de saneamento básico e da má qualidade da água de consumo.

A identificação das fontes de contaminação fecal é de alta importância para se compreender melhor o potencial risco à saúde e para se atenuar a fonte de poluição [13].

As águas de esgoto devem ser tratadas antes de seu lançamento em corpos de água receptores a fim de reduzir a disseminação de doenças veiculadas a água contaminadas, evitar a poluição das águas superficiais e subterrâneas e diminuir a demanda bioquímica de oxigênio (DBO).

Os principais objetivos deste trabalho foram identificar as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas presentes no sistema de tratamento de esgotos da ETE-Ipanema - Porto Alegre, afim de avaliar a eficiência do processo na remoção de microrganismos potencialmente patogênicos. O referido Sistema de tratamento é um sistema de lagoas de estabilização.

MATERIAIS E METODOS

A Estação de Tratamento de Esgotos - ETE-Ipanema de Porto Alegre é operada pelo Departamento Municipal de Águas e Esgoto (DMAE) da Prefeitura de Porto Alegre, que trata o esgoto da rede cloacal e pluvial recolhidas através da rede pluvial. Esta estação usa um sistema de tratamento de Lagoas de Estabilização em Série (tipo australiano), dispensando o uso de produtos químicos e energia [17]. O tratamento realizado, sob um processo totalmente natural, é com-

posto por dois módulos de seis lagoas: duas lagoas anaeróbias, quatro facultativas e seis de maturação.

Coleta das amostras

No momento da realização deste trabalho somente um dos módulos encontrava-se em funcionamento. Portanto, as amostras de águas de esgoto foram coletadas do afluente, da primeira lagoa facultativa, da primeira lagoa de maturação e do efluente (que corresponde a terceira lagoa de maturação) da ETE-Ipanema. As coletas foram realizadas, trimestralmente, de julho de 1997 a julho de 1998 em frascos estéreis de 100 mL, perfazendo um total de 16 coletas.

Isolamento bacteriano

Para o isolamento dos microrganismos foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-3}) em água peptonada 0,1%. De cada diluição 0,1 mL foram semeados em duplicatas, em placas contendo diferentes meios de cultura: ágar base enriquecido com sangue ovino 5%, ágar pseudomonas, ágar eosina azul de metileno (EMB), ágar chapman e ágar listéria. Para o isolamento de *Yersinia* sp. as amostras foram previamente enriquecidas em solução salina fosfatada (PBS, pH 7,6) a 4°C durante 21 dias e após semeadas em meio seletivo para *Yersinia*.

Para o isolamento de *Salmonella* sp., utilizou-se o meio ágar Salmonella-Shigella (SS), ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) e ágar xilose lisina tergitol 4 (XLT₄). As amostras foram pré-enriquecidas em caldo tetrationato Müller-Kauffmann, incubados a 42°C por 16-18 horas e após 0,1mL foi semeado em placas contendo cada um dos meios de cultura especificados anteriormente. Todas as placas, após devidamente semeadas, foram incubadas a 37°C por 24h-48h.

Identificação dos isolados

Após selecionar colônias típicas e atípicas de cada meio de cultura, estas foram semeadas por esgotamento em placas contendo os mesmos meios de cultura, dos quais haviam sido removidos e novamente incubados a 37°C por 18-24h. Colônias isoladas foram inoculadas em meio de caldo infusão de cérebro e coração (BHI), incubadas a 37°C por 18-24h, após foram semeadas em ágar inclinado BHI para posterior utilização. A identificação bacteriana foi iniciada com a coloração de Gram, seguida de provas bioquímicas, tais como: oxidase, catalase, ágar três açúcares ferro (TSI), ágar lisina açúcar ferro (LIA), meio sulfureto indol motilidade (SIM), ágar citrato de

Simmons, ágar fenilalanina desaminase, caldo uréia, caldo VM-VP (vermelho de metila/Voges Proskauer), meio oxidação/fermentação (OF), meio base para descarboxilase da lisina, ornitina e arginina, carbohidratos, gelatina e para a confirmação sorológica de *Salmonella* sp., foi usado o anti-soro polivalente "O" (DIFCO). As provas bioquímicas utilizadas na identificação dos gêneros e espécies basearam-se em literatura apropriada [9,12].

RESULTADOS

Do número total de colônias bacterianas 392 foram isoladas e identificadas das amostras de água de esgoto, coletadas durante o período deste estudo da ETE-Ipanema do afluente, lagoa facultativa, lagoa de maturação e efluente. Observou-se um maior número de bactérias Gram-negativas (69,38%) dos isolados, distribuídos em 14 diferentes gêneros. As bactérias Gram-positivas representaram 30,62% dos isolados e destes 96,66% foram pertencentes ao gênero *Bacillus* sp.

Dentre os isolados identificados os gêneros que predominaram nas amostras foram: *Enterobacter*

(40,8%), *Bacillus* (29,6%), *Acinetobacter* (6,63%), *Alcaligenes* (4,84%), *Pseudomonas* (3,57%), *Proteus* (3,06%), os demais 11,5% ficaram distribuídos entre outros 10 gêneros (Tabela 1).

Entre as bactérias Gram positivas como o gênero *Bacillus* foi predominante no grupo, este gênero foi identificado em nível de espécies: *B. licheniformis* (37,93%), *B. thuringiensis* (29,31%), *B. laterosporus* (12,93%), *B. cereus* (4,3%), *B. circulans* (3,44%) e os demais 12,06% ficaram distribuídos entre outras 8 espécies (Tabela 2).

Os resultados referentes a determinação de coliformes totais, fecais, DBO, temperatura e pH da água do afluente e efluente podem ser observados nas tabelas 3 e 4 respectivamente. Os resultados mostram um decréscimo no número de coliformes totais e fecais bastante acentuado.

DISCUSSÃO

Os gêneros bacterianos identificados nas amostras deste trabalho são comumente encontrados neste tipo de ambiente segundo trabalho de vários autores [1, 5,14]. A identificação de bactérias Gram-negativas isoladas de estação de tratamento de esgotos realizada por

Tabela 1. Distribuição total dos gêneros bacterianos isolados e identificados através de provas bioquímicas, nos pontos de coleta da ETE - Ipanema.

Ponto/coleta	Afluente	Facultativa	Maturação	Efluente	TOTAL
Gêneros					
<i>Enterobacter</i> sp.	43	41	38	38	160
<i>Bacillus</i> sp.	48	25	25	18	116
<i>Acinetobacter</i> sp.	10	03	06	07	26
<i>Alcaligenes</i> sp.	06	03	07	03	19
<i>Pseudomonas</i> sp.	04	03	04	03	14
<i>Proteus</i> sp.	12	-	-	-	12
<i>Citrobacter</i> sp.	05	03	02	01	11
<i>Escherichia</i> sp.	02	02	02	01	07
<i>Aeromonas</i> sp.	03	01	03	-	07
<i>Serratia</i> sp.	01	-	03	02	06
<i>Salmonella</i> sp.	03	01	-	-	04
<i>Staphylococcus</i> sp.	03	01	-	-	04
<i>Klebsiella</i> sp.	-	-	01	01	02
<i>Erwinia</i> sp.	02	-	-	-	02
<i>Yersinia</i> sp.	01	-	-	-	01
<i>Moraxella</i> sp.	-	01	-	-	01
TOTAL	143	84	91	74	392

Tabela 2. Distribuição total das espécies de *Bacillus* isolados e identificados através de provas bioquímicas, nos pontos de coleta da ETE - Ipanema.

Ponto/coleta	Afluente	Facultativa	Maturação	Efluente	TOTAL
Gêneros					
<i>B. licheniformis</i>	13	11	07	13	44
<i>B. thuringiensis</i>	15	06	10	03	34
<i>B. laterosporus</i>	02	04	08	01	15
<i>B. cereus</i>	05	-	-	-	05
<i>B. circulans</i>	02	02	-	-	04
<i>B. coagulans</i>	02	01	-	01	04
<i>B. pentothenicus</i>	02	-	-	-	02
<i>B. macquariensis</i>	01	01	-	-	02
<i>B. macerans</i>	02	-	-	-	02
<i>B. pasteurii</i>	01	-	-	-	01
<i>B. larvae</i>	01	-	-	-	01
<i>B. sphaericus</i>	01	-	-	-	01
<i>B. polymyxa</i>	01	-	-	-	01
TOTAL	48	25	25	18	116

Tabela 3. Dados referentes a determinação de coliformes totais e fecais do afluente, DBO, temperatura e pH da amostra.

Data da coleta	Temp. da amostra (°C)	DBO (mgO ₂ /L)	pH	Col. Totais NMP/100 mL	Col. Fecais NMP/100 mL
22/07/1997	17,5°C	6,0	7,3	2,2x10 ⁵	3x10 ⁴
15/12/1997	26,5°C	28,0	7,5	8,0x10 ⁷	1,3x10 ⁶
19/05/1998	16,7°C	7,9	7,4	3,0x10 ⁵	7,0x10 ⁴
27/07/1998	16,5°C	2,5	7,3	2,2x10 ⁵	1,1x10 ⁵

Dados fornecidos pela Divisão de Pesquisa do Departamento Municipal de Água e Esgotos (DMAE)/Porto Alegre.

Tabela 4. Dados referentes a determinação de coliformes totais e fecais do efluente, DBO, temperatura e pH da amostra.

Data da coleta	Temp. da amostra (°C)	DBO (mgO ₂ /L)	pH	Col. Totais NMP/100 mL	Col. Fecais NMP/100 mL
22/07/1997	15,0°C	5,5	7,6	1,7x10 ³	0,4x10 ¹
15/12/1997	28,0°C	5,8	7,5	8,0x10 ³	5,0x10 ²
19/05/1998	18,0°C	2,9	8,9	2,3x10 ²	2,3x10 ¹
27/07/1998	17,8°C	0,7	8,1	2,3x10 ²	0,8x10 ¹

Dados fornecidos pela Divisão de Pesquisa do Departamento Municipal de Água e Esgotos (DMAE)/Porto Alegre.

Opplinger *et al.* [16] os gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* foram encontrados, além disso os autores observaram um baixo número de bactérias do gênero *Escherichia* e de bactérias potencialmente patogênicas, como *Salmonella*. O elevado número de bactérias do gênero *Enterobacter*, observado na ETE-Ipanema, pode ser atribuído a ampla distribuição deste na água, no esgoto, no solo e nos vegetais, pois apresenta uma fácil adaptação de sobrevivência nesses ambientes [5].

As bactérias do gênero *Salmonella* são patogênicas ao homem, podendo provocar graves doenças quando ingeridas em um número suficiente para a sua multiplicação e colonização no organismo. Nas amostras analisadas neste trabalho um baixo número destes microrganismos foi encontrado mesmo sendo este um ambiente rico em matéria orgânica. A baixa incidência de *Salmonella* em amostras de afluente e

efluente de esgotos pode ter como causas: (i) a existência de uma baixa porcentagem de *Salmonella* nas amostras de água; (ii) células de *Salmonella* estressadas devido às condições adversas do ambiente do esgoto, impediram a sua recuperação e crescimento nos meios de cultura seletivos; (iii) a microbiota competitiva, presente na amostra, uma vez que estes meios seletivos permitem o desenvolvimento de outros microrganismos, impediram o crescimento de um número maior desse microrganismos [2].

O gênero *Escherichia* esteve presente em todas as amostras, porém numa frequência bastante baixa. Este gênero ocorre na flora intestinal de animais de sangue quente. A espécie *E.coli* pode produzir enterotoxinas e outros fatores de virulência, sendo um patógeno importante em humanos. Competidores estão presentes no ambiente aquático e existe um rápido declínio na contagem de *E. coli*, presumivelmente devido à inabilidade deste competir com sucesso por nutrientes com outras bactérias presentes neste ambiente [11].

A maioria dos microrganismos do trato intestinal humano, uma vez submetida às condições adversas que predominam nos corpos d'água, tende a decrescer em número, caracterizando assim o chamado decaimento bacteriano, pois em todo o processo de tratamento de esgoto, fatores como competitividade e adaptação favorecem aquelas populações bacterianas que melhor adaptam-se ao ambiente, logo, não favorecendo aqueles patógenos que encontram, no trato intestinal, as condições adequadas para o seu crescimento. Segundo alguns pesquisadores [10,15,20], é comum a presença nestes ambientes, de um número maior de microrganismos transientes com relação ao número de bactérias patogênicas.

Dentre as bactérias Gram-positivas, o gênero *Bacillus* manteve-se presente em todos os pontos amostrados, porém verificou-se um decréscimo no número destes organismos no decorrer do tratamento. Em trabalhos realizados, em estações de tratamento de lodo ativado, o gênero *Bacillus* também foi observado em grande número, predominando inclusive sobre o número de bactérias que não são formadoras de endósporos [3,6].

A persistência do *B. licheniformis* (Tabela 2) nas diferentes etapas da estação de tratamento de esgotos pode estar relacionada com envoltório de exopolissacarídeos que esta espécie possui. Esta característica, segundo Poxton [18], pode favorecer a sua sobrevivência no esgoto, pois esta estrutura protege contra

fagocitose e predação por protozoários, formando uma matriz hidrofílica usada na adesão, agregação e na formação de biofilmes.

O número de organismos de cada gênero encontrado no afluente foi sempre mais elevado verificando-se a presença de bactérias potencialmente patogênicas no afluente e sua diminuição ou mesmo ausência no efluente. O afluente apresenta grande quantidade de matéria orgânica, a partir da qual os microrganismos dispõem de energia e nutrientes, diminuindo dessa forma a competição entre os mesmos e proporcionando uma ampla variabilidade de gêneros microbianos. Porém, ao longo do tratamento, na lagoa facultativa, a matéria orgânica diminui com a ação das bactérias e algas, promovendo a ação competitiva por nutrientes entre as bactérias ainda presentes, reduzindo a população microbiana. No caso da lagoa de maturação, ocorre a remoção de microrganismos patogênicos, sólidos em suspensão e nutrientes, melhorando a qualidade do efluente [19].

Um aspecto importante a ser considerado, no período da amostragem, é o fato de que a ETE-Ipanema não se encontrava com sua capacidade total de funcionamento, somente um dos dois módulos, que compõem a ETE estava funcionando e recebendo basicamente águas de esgotos pluviais da Zona Sul da cidade. Durante a primeira amostragem (julho/97), apenas o Arroio Capivara e o esgoto pluvial da rua Landislau Neto e da rua Déa Coufal estavam ligados ao interceptor que leva esgoto à ETE-Ipanema. Neste período, o elevado nível das águas do Lago Guaíba, não permitiu o bombeamento contínuo dos esgotos interceptados até a ETE-Ipanema. O Sistema Zona Sul deixa de ser efetivo quando a elevação do nível do Guaíba propicia o ingresso de suas águas para o interior do interceptor, seja por infiltração ou refluxo através das calhas dos arroios e pluviais. A partir de junho de 1997, as bombas tiveram o seu tempo de operação reduzido, permanecendo praticamente paradas de julho a novembro. De dezembro deste mesmo ano a maio 1998, apesar de ter aumentado o volume de esgoto bombeado, o número de extravasamentos permaneceu ainda bastante elevado, devido a intensa precipitação pluviométrica que se registrou neste período. Também o nível do Lago Guaíba, que se manteve elevado durante quase todo esse período (dezembro de 97 a maio 98), fez com que suas águas infiltrassem pelo interceptor, aumentando o tempo de operação das estações de bombeamento de esgotos

(EBEs) e o volume de esgoto enviado para tratamento na ETE-Ipanema, acarretando desta forma constante assoreamento da rede, com conseqüentes paradas de operação das EBEs para manutenção e limpeza do interceptor. O resultado disso foi que o sistema bombeou também as águas de infiltração, o que pode ser verificado com a determinação de baixos níveis de DBO no afluente da ETE, cuja média obtida neste período foi de 24mg O₂/L [7].

Levando-se em consideração as colocações acima feitas e observando-se os dados das Tabelas 3 e 4 pode-se considerar que a maior parte do esgoto que foi tratado no período de coleta de um ano continha um alto volume de esgoto pluvial tanto pelos valores da DBO registrados como os valores de coliformes totais e fecais determinados no afluente.

CONCLUSÕES

Observou-se uma redução no número de gêneros bacterianos no decorrer do tratamento do esgoto, demonstrando uma eficácia no sistema de lagoas de estabilização da ETE-Ipanema no processo de tratamento de esgotos.

Agradecimentos. Ao CNPq (Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro e bolsa de estudos de mestrado e iniciação científica. Aos técnicos do DMAE (Departamento Municipal de Águas e Esgotos de Porto Alegre) pelas coletas das amostras de água na estação de tratamento ETE-Ipanema, a Maria da Graça Ortolan por prontamente ter disponibilizados os dados referentes a colimetria, DBO, pH e temperatura que haviam sido realizados na Divisão de Pesquisa daquele Departamento.

REFERÊNCIAS

- 1 **Abo-Shehada M.N. & Sallal A.K.J. 1996.** Preliminary studies on the bacterial and parasitic microflora and microfauna of domestic sewage in northern Jordan. *International Journal of Environmental Health Research*. 6: 31-38.
- 2 **Águas I.F.** Estudo comparativo e diversos esquemas de isolamento de *Salmonella* sp. em águas residuais. Catálogo de teses. Disponível on-line em <http://fiocruz.br:80/cict/publica/teses/tes131.htm>.
- 3 **Bux F. & Kasan H.C. 1994.** A Microbiological survey of ten activated sludge plants. *Water Research Programme*. 20: 61-72.
- 4 **Borrego J.J. & Figueras M.J. 1997.** Microbiological quality of natural waters. *Microbiología Sem*. 13: 413-426
- 5 **Dudley D.J., Guentzel M.N., Ibarra M.J., Moore B.E. & Sagik B.P. 1980.** Enumeration of potentially pathogenic bacteria from sewage sludges. *Applied Environmental Microbiology*. 39: 118-126.
- 6 **Emtiazi G., Habibi M.H. & Setareh M. 1989.** Novel filamentous spore-forming iron bacteria causes bulking in activated sludge. *Journal of Applied Bacteriology*. 67: 99-108.
- 7 **Faria C.M. & Lersch E.C.** Saneamento da praia de Ipanema: o resgate de suas águas. *Pesquisa ECOS/DMAE*. 1: 22.
- 8 **Freitas M.B., Brilhante O.M. & Almeida L.M. 2001.** Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. *Caderno de Saúde Pública*. 17: 651-660.
- 9 **Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. & Stanley T.W. 1994.** Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 787p.
- 10 **Leclerc G.J., Tartera C. & Metcalf E. 1998.** Environmental regulation of *Salmonella typhi* invasion-defective mutants. *Infection of Immunity*. 66: 682-691.
- 11 **Lim C.H. & Flint K.P. 1989.** The effects of nutrients on the survival of *Escherichia coli* in lake water. *Journal of Applied Bacteriology*. 66: 559-569.
- 12 **Mac Faddin J.F. 1977.** *Biochemical test for identification of medical bacteria*. Baltimore: Williams & Wilkins, 312p.
- 13 **McLellan L.S. 2004.** Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from urban rivers and beach water. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 4658-4665.
- 14 **Melo M.T., Vieira R.H., Saker-Sampaio S. & Hofer E. 1997.** Coliforms and *Salmonella* in seawater near to domestic sewage sources in Fortaleza (Ceará, Brazil). *Microbiologia*. 13: 463-470.
- 15 **Moriñigo M.A., Martinez-Manzanares E., Muñoz A., Cornax R., Romero P. & Borrego J.J. 1989.** Evaluation of different plating media used in the isolation of *Salmonellas* from environmental samples. *Journal of Applied Bacteriology*. 6: 353-360.
- 16 **Oppliger A., Hilfiker S. & Vun Duc T. 2005.** Influence of seasons and sampling strategy on assessment of bioaerosols in sewage treatment plants in Switzerland. *Annual Occupational Hygiene*. 49: 393-400.
- 17 **Peterson V.L. 1997.** Um grande passo para a despoluição do Guaíba. Porto Alegre (Informativo Interno do Departamento Municipal de Águas e Esgotos - DMAE 01), 8p.

- 18 Poxton I.R. 1993.** Prokaryote envelope diversity. *Journal Applied Bacteriology*. Symposium Supplement.74: 1S-11S.
- 19 Uehara M.Y. & Vidal W.L. 1989.** Operação e manutenção de lagoas anaeróbias e facultativas. Série Manuais Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. São Paulo nº 5, 91p.
- 20 Varnam A.H. & Evans M.G. 1991.** Fodborne pathogens: an illustred text. England: Wolfe Publishing Ltda., 462p.