UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

RAPHAEL CORRÊA MEDEIROS

Avaliação da remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em processos de tratamento de esgoto sanitário.

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos
2013

RAPHAEL CORRÊA MEDEIROS

Avaliação da remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em processos de tratamento de esgoto sanitário.

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Antonio Daniel

São Carlos
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

M488a

Medeiros, Raphael Corrêa
Avaliação da remoção de Giardia spp. e Cryptosporidium spp. em processos de tratamento de esgoto sanitário / Raphael Corrêa Medeiros; orientador Luiz Antonio Daniel. São Carlos, 2013.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2013.

1. Tratamento de esgoto sanitário. 2. Giardia spp.. 3. Cryptosporidium spp.. 4. Reator UASB. 5. Lodos Ativados. 6. Filtro lento em areia. 7. Desinfecção Sequencial. 8. Microrganismos indicadores. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **RAPHAEL CORRÊA MEDEIROS**.

Título da tese: "Avaliação do comportamento dos protozoários – giárdia spp. e cryptosporidium spp. – e de micro-organismos indicadores frente ao tratamento de esgoto sanitário".

Data da defesa: 27/09/2013

Comissão Julgadora:	**Resultado:**
Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel (Orientador)** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	APROVADO
Prof. Titular **Jurandyr Povinelli** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	APROVADO
Dra. **Elayse Maria Hachich** (CETESB)	aprovado
Profa. Dra. **Regina Maura Bueno Franco** (Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)	aprovado
Prof. Dr. **Rafael Kopschitz Xavier Bastos** (Universidade Federal de Viçosa/UFV)	APROVADO

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Profa. Assoc. **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

Dedicatória

À minha família, em especial ao meu sobrinho Mateus e a sobrinhos e filhos que ainda virão.

Agradecimentos

A Deus e a todos os santos que sempre estiveram ao meu lado.

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais, Nelson e Eva, minha vózinha Suely, que mesmo longe, sempre me deram suporte para trilhar o meu caminho. “Vim, vi e venci”, novamente.

À Escola de Engenharia de São Carlos e ao Departamento de Hidráulica e Saneamento pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (processo 2010/07902-1).

À FAPESP, pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa (processos 2011/08653-8 e 2012/50522-0).

Ao professor Dr. Luiz Antônio Daniel, pelo apoio, amizade, sugestões, conselhos e constante orientação no decorrer de todo este trabalho.

À professora Dra. Lyda Patrícia Sabogal Paz pelo incentivo e inúmeras dicas para montagem do filtro lento.

À Dra. Elayse Hachich e aos professores: Tit. Jurandyr Povinelli, Dr. Rafael Bastos, Dra. Regina Maura Bueno Franco e Dr. Mário de Castro pelas valiosas sugestões.

À Luciana Urbano dos Santos pelas grandiosas sugestões.

À professora Isali Dinaísa Lins de Oliveira, pela amizade e confiança.

À Sá e à Priscila, da secretaria do departamento, pela atenção e ajuda.

À Rose, pelos ótimos humor e simpatia e grande ajuda.

À Luci, técnica do Biotace, pela hospitalidade e às maravilhosas trufas.

À Maria Teresa Hoffman, técnica do LATAR, pela amizade e por estar sempre prestativa a ajudar em quaisquer análises.

Ao Grande Alcino, sempre prestativo, humorado e cuidadoso com a ETE - USP São Carlos. E ao Márcio, seu fiel escudeiro.

Aos amigos do LATAR - Gabriel, Natália Fisher, Natália Pelisson, Gabriela, Lucas Marcon, Ludimila, Andressa, Eloá, Rafaela, Karen, Paulo, Marcos.

À turma de mestrado e "sobreviventes" do doutorado – Aurélia, Fernanda, Mélida, Rodrigo, Dagoberto.

Aos técnicos e ao Laboratório de Saneamento – Paulo, Júlio e Juliana, pela ajuda em análises que não puderam ser feitas no LATAR.

Aos meus queridos “atrasos de vida” do vôlei Caaso, pelos momentos de descontração, pelos campeonatos, lanches depois dos treinos e principalmente pela grande amizade durante todos esses anos. Ao Olibário Neto e Jader, pelos momentos republicanos.

À Luci Sartori pelas dicas e apoio, e disponibilidade de coletas de amostras na ETE - Monjolinho.

Às famílias adotivas de: São Carlos (Restaurante Dona Dora), Tietê (Ometto), Cerquilho (Viegas), Stockton (Ross).

Aos Amigos de longas datas e de todos os lugares por onde andei.

À Airina Louise F. Ribas, Liana Notari Pasqualini, Patrícia de Lourdes Viegas, Raquel Gardenal Ometto, Renata de Oliveira Pereira, pela grande amizade.

Aos amigos e colegas de profissão da UFSM - CESNORS, campus Frederico Westphalen-RS, pelos incentivos na etapa final deste trabalho.

À Faber Castell (doação de lodo de esgoto) e ETE Limeira, disponibilidade de coletas de amostras e doação de lodo de esgoto para os reatores.

Aos meus cachorros, que se renovam com o tempo, e sempre me recebem com muitos pulos de alegria.

Àqueles que, de uma forma ou de outra, me incentivaram a concluir mais essa etapa da minha vida.

A todos os professores que dedicam seu tempo a ensinar e, principalmente, a aprender.

“A força não provém da capacidade física e
sim de uma vontade indomável."
(Mahatma Ghandi)

“A maior recompensa pelo esforço de uma pessoa não é o que ela ganha com isso, mas o que ela se torna através dele."
(John Ruskin)

“O problema não é inventar. É ser inventado hora após hora e nunca ficar pronta nossa edição convincente."
(Carlos Drummond de Andrade)

“Há momentos na vida em que sentimos tanto
a falta de alguém que o que mais queremos
é tirar esta pessoa de nossos sonhos
e abraçá-la.

Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser,
Porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades bastante para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes
não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor
das oportunidades que aparecem
em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passam por suas vidas."
(Clarice Lispector).

Resumo

MEDEIROS, R. C. (2013). **Avaliação da remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em processos de tratamento de esgoto sanitário.** 300p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos - SP.

Este trabalho teve o intuito de avaliar a eficiência de remoção de protozoários patogênicos - *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. - em processos de tratamento de esgoto sanitário por reator UASB, lodos ativados, filtro lento em areia e diferentes desinfetantes. A recuperação de cistos de *Giardia* e de oocistos de *Cryptosporidium*, realizada por diferentes metodologias e utilizando ColorSeed®, foi de, respectivamente, 85 e 20% em esgoto bruto, e 62,5 e 17,5% em efluente tratado, quando foi utilizado o método de tripla centrifugação. Cistos de *Giardia* foram encontrados em 100% as amostras de esgoto pesquisadas, com média de 1,5 x 10^4 cistos por litro e oocistos de *Cryptosporidium* em 31,4% com média 3,1 x 10^2 oocistos por litro, em esgoto bruto. No tratamento biológico por reator UASB seguido de Lodos Ativados, a remoção de cisto de *Giardia* e esporos de *Clostridium perfringens* foram estatisticamente menores que as remoções de *E. coli* e coliformes totais. Não foram encontrados (oo)cistos após o tratamento terciário realizado através da filtração lenta em areia. Houve remoção estatisticamente maior na ETE em escala plena para coliformes totais e *Clostridium perfringens*. *E. coli* e cistos de *Giardia*, em ambas ETEs, apresentaram remoções similares. Elevadas concentrações de (oo)cistos foram encontradas no lodo de esgoto, com grande porcentagem ainda viável. Com relação à desinfecção, entre as bactérias indicadoras, *Clostridium perfringens* foram mais resistentes ao cloro, ozônio e radiação ultravioleta. O efeito sinérgico, promovido pelas desinfecções sequenciais (cloro-radiação ultravioleta e ozônio-radiação ultravioleta), foi evidenciado em alguns experimentos para todas as bactérias estudadas. O cloro alterou a fluorescência dos cistos de *Giardia* e o ozônio, além de alterar a fluorescência, foi capaz de diminuir a concentração de cistos desse microrganismo. Pode-se concluir que as concentrações tanto de microrganismos indicadores como de protozoários patogênicos é bastante elevada, qualquer que seja o tipo de esgoto: bruto, efluente do reator UASB ou efluente do lodos ativados. Isso evidencia o extremo cuidado com que estes efluentes devem ser tratados, para posteriores usos ou lançamento em corpo receptor, em especial devido à presença de (oo)cistos ainda viáveis de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. mesmo

após o tratamento biológico por lodos ativados, e a necessidade de desinfecção do efluente.

Palavras-chave: tratamento de esgoto sanitário, *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., reator UASB, Lodos Ativados, filtro lento em areia, Desinfecção sequencial, microrganismos indicadores.

Abstract

MEDEIROS, R. C. (2013). **Assessment of removal of Giardia spp. and Cryptosporidium spp. from wastewater treatment processes.** 300p. Thesis (Doctorate) – São Carlos Engineering School. São Paulo University. São Carlos – SP.

This work aimed to evaluate the efficiency of removal of pathogenic protozoa - *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. - during wastewater treatment by UASB reactor , activated sludge , slow sand filter and different disinfectants. The recovery of *Giardia* cysts and of *Cryptosporidium* oocysts, performed by different methodologies and using ColorSeed®, was respectively of 85 and 20%, in raw wastewater and 62.5 and 17.5% in treated effluent, applying triple centrifugation method. *Giardia* cysts were found in 100% of the the sewage samples surveyed, with average of 1.5 x 10^4 cysts per liter and *Cryptosporidium* oocysts were found in 31.4% with average of 3.1 x 10^2 oocysts per liter, in raw wastewater. *Giardia* cyst and *Clostridium perfringens* spores removals were statistically lower than *E. coli* and total coliforms removal when applying the biological treatment by UASB reactor followed by Activated Sludge. There were no (oo) cysts after treatment tertiary accomplished by slow sand filtration. There was a statistically higher removal in the full scale WWTP for total coliforms and *Clostridium perfringens*; however, *E. coli* and *Giardia* cysts, in both WWTPs, presented the same removal efficiency. High concentrations of (oo)cysts were found in the sludge sludge, with a high percentage still viable. Regarding disinfection, among the indicating bacteria, *Clostridium perfringens* was more resistant to chlorine, ozone and ultraviolet radiation. The synergic effect promoted by sequential disinfections (chlorine-ultraviolet radiation and ozone-ultraviolet radiation) was evidenced in some experiments for all the bacteria studied. Chlorine altered the fluorescence of *Giardia* cysts and ozone, as well as change in fluorescence was able to decrease the concentration of this microorganism. It can be concluded that the concentrations of indicator microorganisms as well as of pathogenic protozoa is very high, regardless the kind of wastewater: raw, UASB reactor effluent or activated sludge effluent. This shows the extreme care that must be taken towards these effluents, for future reuse or simply release in the environment, mainly due to the presence of viable *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. (oo)cysts even after the activated sludge treatment, and the need of disinfection of the effluent.

Key Words: wastewater treatment, *Giardia* spp., C*ryptosporidium* spp., UASB reactor, activated sludge, slow sand filtration, sequential disinfection, indicator microorganisms.

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Ciclo da *Giardia* spp. no homem (*Centers for Disease Control and Prevention*, adaptado por Bastos et al., 2003).	43
Figura 1.2 - Ciclo biológico do *Cryptosporidium* spp. (*Centers for Disease Control and Prevention*, adaptado por Bastos et al., 2003).	45
Figura 1.3 - Distribuição de dissertações e teses sobre os temas *Giardia* e *Cryptosporidium* nas regiões geográficas do Brasil (BDTD, 2013).	49
Figura 1.4 - Distribuição dos locais de estudo dos trabalhos sobre os temas *Giardia* e *Cryptosporidium* nas regiões geográficas do Brasil (BDTD, 2013).	50
Figura 2.1 - Cistos de *Giardia* (400x) - A: marcado com Texas Red (ColorSeed®); B: da própria amostra de esgoto. I. Filtro para FITC (450-490 nm); II. Filtro verde (510-550 nm)	85
Figura 2.2 - Esquema geral dos ensaios de recuperação de (oo)cistos com Kit ColorSeed®.	87
Figura 2.3 - Esquema geral dos ensaios de tripla centrifugação em amostras de turbidez elevada com o uso do Kit ColorSeed®.	88
Figura 2.4 - Esquema geral dos ensaios de tripla centrifugação em amostras de turbidez média com o uso do Kit ColorSeed®.	89
Figura 2.5 - Algumas etapas do ensaio de filtração em membrana em amostras de turbidez média e baixa com o uso do Kit ColorSeed®.	91
Figura 2.6 – Ilustração de algumas etapas da separação imunomagnética (IMS), utilizada na recuperação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*.	94
Figura 3.1 - Esquema Geral das etapas de tratamento na ETE (tratamento preliminar e reator UASB) seguida da instalação piloto (lodos ativados e filtro lento de areia).	108
Figura 3.2 - Corte transversal do reator anaeróbio com manta de lodo (UASB) da ETE - USP São Carlos. (PASSIG; CAMPOS, 2005).	109
Figura 3.3 - Tanque de aeração do sistema de lodos ativados da ETE - piloto (sem escala).	109
Figura 3.4 - Decantador do sistema de lodos ativados da ETE - piloto (sem escala).	110
Figura 3.5 - Sistema de Lodos Ativados e filtro lento em areia (ETE - escala piloto).	111

Figura 3.6 - Esquema de montagem do filtro de areia.	112
Figura 3.7 - Placa contaminada com colônias típicas de *E. coli* e coliformes totais.	115
Figura 3.8 - Etapas para a quantificação e confirmação de *Clostridium perfringens*.	117
Figura 3.9 - Relação entre alcalinidades intermediária e parcial (AI/AP) nas amostras de efluente do reator UASB.	123
Figura 3.10 - Exemplos de episódios da entrada de efluentes de origem desconhecida na ETE - piloto (USP - São Carlos).	124
Figura 3.11 - Concentração de coliformes totais nas unidades de tratamento da ETE - piloto.	126
Figura 3.12 - Concentração de *Escherichia coli* nas unidades de tratamento da ETE - piloto.	126
Figura 3.13 - Concentração de *Clostridium perfringens* nas unidades de tratamento da ETE - piloto.	127
Figura 3.14 - Concentração de cistos de *Giardia* nas unidades de tratamento da ETE - piloto.	129
Figura 3.15 - Remoção de cistos de *Giardia* no reator UASB e na operação dos dois sistemas de Lodos Ativados (L.A.): 7 e 20 dias. ETE - piloto.	132
Figura 3.16 - Viabilidade de cistos de *Giardia* nas unidades de tratamento da ETE - piloto.	133
Figura 3.17 - Eficiência da ETE - piloto (UASB seguido de lodos ativados convencional) em remover microrganismos indicadores e cistos de *Giardia*.	134
Figura 3.18 - Eficiência da ETE - piloto (UASB seguido de lodos ativados por aeração prolongada) na remoção de microrganismos indicadores e cistos de *Giardia*.	135
Figura 3.19 - Desempenho da carreira 1 do filtro lento recebendo baixas concentração orgânica e turbidez na remoção de turbidez.	141
Figura 3.20 - Desempenho da carreira 2 do filtro lento recebendo baixas concentração orgânica e turbidez na remoção de turbidez.	141
Figura 3.21 - Desempenho da carreira 1 do filtro lento recebendo baixas concentração orgânica e turbidez na remoção de DQO.	142
Figura 3.22 - Desempenho da carreira 2 do filtro lento recebendo baixas concentração orgânica e turbidez na remoção de DQO.	142

Figura 3.23 - Desempenho da carreira 1 do filtro lento recebendo baixas concentração orgânica e turbidez na remoção de microrganismos.	143
Figura 3.24 - Desempenho da carreira 2 do filtro lento recebendo baixas concentração orgânica e turbidez na remoção de microrganismos.	143
Figura 3.25 - Desempenho da carreira 3 do filtro lento recebendo altas concentração orgânica e turbidez na remoção de turbidez.	145
Figura 3.26 - Desempenho da carreira 4 do filtro lento recebendo altas concentração orgânica e turbidez na remoção de turbidez.	145
Figura 3.27 - Desempenho da carreira 3 do filtro lento recebendo altas concentração orgânica e turbidez na remoção de microrganismos.	146
Figura 3.28 - Desempenho da carreira 4 do filtro lento recebendo altas concentração orgânica e turbidez na remoção de microrganismos.	146
Figura 3.29 - Diversidade microbiana na camada biológica do filtro lento em areia.	148
Figura 4.1 - Placa com amostras de lodo para análise de *Giardia* e *Cryptosporidium*.	164
Figura 4.2 - Concentração de cistos de *Giardia* spp. em lodo de esgoto proveniente de sistema de Lodos Ativados.	165
Figura 4.3 - Concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em lodo de esgoto proveniente de sistema de Lodos Ativados (não foram detectados oocistos na coleta 1)	165
Figura 4.4 - Viabilidade de cistos de *Giardia* spp. em lodo de esgoto proveniente de sistema de lodos ativados (ETE - piloto)	166
Figura 4.5 - Exemplos de cistos de *Giardia* spp. viável e não viável em lodo de esgoto.	167
Figura 5.1 - Principais unidades de tratamento da ETE situada no município de Limeira - SP. I- caixa aerada de remoção de areia; II - reatores UASB; III - Lodos Ativados e IV: desinfecção com radiação ultravioleta.	172
Figura 5.2 - Reação de Imunofluorescência Direta (Fonte: FAGNANI, 2010).	174
Figura 5.3 - Classificação de cistos viáveis de *Giardia* de acordo com a fluorescência (400x).	174

Figura 5.4 - Viabilidade dos cistos de *Giardia* spp. no decorrer do tratamento da ETE em escala plena, situada no município de Limeira - SP.	182
Figura 5.5 - Avaliação da alteração da fluorescência dos cistos de *Giardia* em amostras de efluentes bruto e tratados de uma ETE em escala plena, situada no município de Limeira - SP.	183
Figura 6.1 - Porcentagem de distribuição do ácido hipocloroso e íon hipoclorito na água de acordo com o pH e temperatura (METCALF; EDDY, 2003).	188
Figura 6.2 - Absorção de luz UV pelo DNA (adaptado de KUZUHARA, 2005).	192
Figura 6.3 - Esquema geral dos ensaios de desinfecção individual e sequencial com efluente de tratamento secundário da ETE USP - São Carlos.	198
Figura 6.4 - Detalhe do reator de bancada de desinfecção por radiação ultravioleta.	200
Figura 6.5 - Reator de Radiação UV de bancada utilizado nos ensaios de desinfecções individual e sequenciais: A – com lâmpadas ligadas; B - lâmpadas desligadas.	201
Figura 6.6 - Detalhe da unidade de ozonização piloto utilizada nos ensaios de desinfecções individuais e sequenciais.	206
Figura 6.7 - A: solução de KI + Ozônio; B: solução com coloração amarelo palha; C: solução no final da titulação – incolor. Fonte (Medeiros, 2010)	208
Figura 6.8 - Inativação média de micro-organismos indicadores presentes em efluente secundário através da cloração com 5 $mg.L^{-1}$. As barras no centro das colunas representam o desvio padrão.	219
Figura 6.9 - Inativação média de micro-organismos indicadores presentes em efluente secundário através da cloração com 10 $mg.L^{-1}$. As barras no centro das colunas mostram o desvio padrão.	219
Figura 6.10 - Curvas de calibração do ozonizador para as tensões de 40%, 60% e 80%.	222
Figura 6.11 - Inativação de microrganismos indicadores presentes em efluente secundário após ozonização (Em cada ensaio, os quatro primeiros CT à esquerda foram obtidos com tensão de 40 % e os quatro CT à direita, com tensão de 60%; ambos para o tempo de 7 minutos de contato).	231
Figura 6.12 - Exemplo de forte correlação entre a inativação de coliformes totais com a massa de ozônio consumida durante os ensaios de desinfecção com ozônio.	232

Figura 6.13 - Exemplo de forte correlação entre a inativação de *E. coli* com a massa de ozônio consumida durante os ensaios de desinfecção com ozônio.	232
Figura 6.14 - Exemplo de forte correlação entre a inativação de *Clostridium perfringens* com a massa de ozônio consumida durante os ensaios de desinfecção com ozônio.	233
Figura 6.15 - Taxa de formação de Fe^{2+} a partir da intensidade de radiação UV aplicada na superfície do reator, nos ensaios de actinometria.	233
Figura 6.16 - Dose de radiação UV distribuída pelo volume de solução actinométrica de acordo com o tempo de exposição.	234
Figura 6.17 - Inativação média por radiação ultravioleta de microrganismos indicadores em efluente secundário. As barras no centro das colunas representam o desvio padrão.	237
Figura 6.18 - Avaliação do dano morfológico dos cistos de *Giardia* spp. após desinfecções individuais e sequenciais com cloro e radiação UV. As barras centrais representam o desvio padrão. Doses de cloro aplicadas: 5 $mg.L^{-1}$ em 5 minutos e 10 $mg.L^{-1}$ em 10 minutos. Dose de UV: 2,5 $Wh.m^{-3}$.	242
Figura 6.19 - Avaliação do dano morfológico dos cistos de *Giardia* spp. após desinfecções individuais e sequenciais com ozônio e radiação UV. As barras centrais representam o desvio padrão. CT de ozônio aplicados: 23 $mg.min.L^{-1}$ e 83 $mg.min.L^{-1}$. Dose de UV de 2,5 $Wh.m^{-3}$.	248
Figura 7.1 - ETE Monjolinho: I - vista geral (reatores UASB); II - unidade de desinfecção por radiação ultravioleta.	254
Figura 7.2 - Detalhe da calha de distribuição de solução de hipoclorito de sódio no efluente dos flotadores na ETE - Monjolinho.	260
Figura 7.3 - Resultados da desinfecção sequencial (cloro - radiação ultravioleta) na ETE - Monjolinho.	261

Lista de Quadros

Quadro 1.1 – Estudos de prevalência de enteroparasitas (geral) e de *Giardia* e *Cryptosporidium* em grupos populacionais de diferentes idades e de diferentes localidades do Brasil.	52
Quadro 1.2 - Estudos de prevalência de enteroparasitas (geral) e de *Giardia* e *Cryptosporidium* em animais.	61
Quadro 1.3 - Estudos sobre presença *Giardia* e *Cryptosporidium* em corpos d'água e remoção de (oo)cistos no tratamento de água.	67
Quadro 1.4 - Estudos sobre presença *Giardia* e *Cryptosporidium* em esgoto bruto e tratado e remoção de (oo)cistos em estações de tratamento de esgoto.	74
Quadro 1.5 - Estudos sobre presença *Giardia* e *Cryptosporidium* em alimentos.	78
Quadro 1.6 – Estudos com temas diversos sobre *Giardia* e *Cryptosporidium*.	80
Quadro 6.1 - Estudos de desinfecção em água e águas residuárias em que são relatados efeitos sinérgicos entre os desinfetantes utilizados, para diversos microrganismos.	195

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 – Algumas dos principais agentes etiológicos de doenças de veiculação hídrica.	42
Tabela 1.2 - Espécies de *Giardia* e principais hospedeiros.	44
Tabela 1.3 - Espécies de *Cryptosporidium* e seus hospedeiros principais.	46
Tabela 2.1 - Porcentagem de recuperação por ColorSeed® de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em esgoto bruto e tratado.	97
Tabela 2.2 - Comparação Estatística dos métodos para recuperação de (oo)cistos no efluente de média turbidez.	97
Tabela 3.1 - Concentrações de (oo)cistos de protozoários encontradas em águas superficiais.	102
Tabela 3.2 - Concentração de (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* encontrada no esgoto doméstico.	106
Tabela 3.3 - Característica granulométrica da areia grossa do filtro lento.	112
Tabela 3.4 - Característica granulométrica da areia fina do filtro lento.	113
Tabela 3.5 - Métodos analíticos empregados para análises físico-químicas de efluentes da ETE.	114
Tabela 3.6 - Resumo estatístico dos dados obtidos durante o monitoramento da ETE - piloto para o afluente bruto e efluente do reator UASB.	120
Tabela 3.7 - Resumo estatístico dos dados obtidos durante o monitoramento da ETE - piloto para o efluente do sistema de lodos ativados.	121
Tabela 3.8 - Remoção de coliformes totais, *E. coli* e *Clostridium perfringens* no reator UASB e nos dois sistemas de Lodos Ativados - aeração prolongada e convencional, na ETE - piloto.	128
Tabela 3.9 - Distribuição de amostras positivas e a média geométrica encontrada para oocistos de *Cryptosporidium*.	130
Tabela 3.10 - Resultados de correlação (coeficiente r - Spearman, teste não-paramétrico) entre concentrações de *Giardia* spp. e indicadores fecais para diferentes efluentes.	137
Tabela 3.11 - Resultados de correlação (coeficiente r - Spearman, teste paramétrico) entre as remoções (em log) de *Giardia* spp. e indicadores fecais.	137

Tabela 3.12 - Resultados de correlação (coeficiente r - Spearman, teste não-paramétrico) entre os valores de turbidez e as concentrações de microrganismos.	138
Tabela 3.13 - Resultados de correlação (coeficiente r - Spearman, teste não-paramétrico) entre os valores de absorbância 254 nm e as concentrações de microrganismos.	138
Tabela 3.14 - Resultados de correlação (coeficiente r - Spearman, teste não-paramétrico) entre concentrações de sólidos suspensos totais e as de microrganismos.	139
Tabela 3.15 - Características do esgoto tratado do lodos ativados por aeração prolongada e afluente ao filtro lento de areia.	140
Tabela 3.16 - Remoções médias de variáveis físicas, químicas e microbiológicas da ETE - piloto para cada carreira do filtro lento em areia.	148
Tabela 4.1 - Sistemas de tratamento de esgoto e respectivos volumes de lodo produzido (Arceivala (1981), EPA (1979, 1981, 1992), Metcalf; Eddy (1991), Vieira (1993), Von Sperling (1995) e Nascimento (1997) *apud* Bueno, 2001)).	152
Tabela 4.2 - Produção de lodo de ETE por região brasileira.	153
Tabela 4.3 - Classificação e processos de redução de patógenos.	154
Tabela 4.4 - Limites máximos permitidos para patógenos e parasitos em lodos e biossólidos.	155
Tabela 4.5 - Limites máximos permitidos para patógenos e parasitos em lodos e biossólidos (Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002).	156
Tabela 4.6 - Caracterização microbiológica de diferentes tipos de lodo de esgoto.	161
Tabela 5.1 - Métodos analíticos empregados para análises físico-químicas de efluentes da ETE - escala plena, situada no município de Limeira - SP.	173
Tabela 5.2 - Resultado do monitoramento físico-químico da ETE em escala plena, situada no município de Limeira - SP (afluente bruto, após tratamento preliminar; após reator UASB).	177
Tabela 5.3 - Resultado do monitoramento físico-químico da ETE em escala plena, situada no município de Limeira - SP (efluente do sistema de lodos ativados e após desinfecção com radiação UV).	178
Tabela 5.4 - Resultado do monitoramento microbiológico da ETE em escala plena, situada no município de Limeira - SP.	180

Tabela 6.1 – Métodos analíticos empregados para análises físico-químicas.	214
Tabela 6.2 - Resultados para as variáveis físicas, químicas e microbiológicos do ensaio I da cloração de efluente de tratamento secundário.	216
Tabela 6.3 - Resultados para as variáveis físicas, químicas e microbiológicos do ensaio II da cloração de efluente de tratamento secundário.	217
Tabela 6.4 - Resultados para as variáveis físicas, químicas e microbiológicos do ensaio III da cloração de efluente de tratamento secundário.	218
Tabela 6.5 – Produção de ozônio na calibração do ozonizador .	221
Tabela 6.6 – Balanço de massa e cálculo dos CT do ensaio I na desinfecção de efluente secundário com ozônio.	223
Tabela 6.7 – Balanço de massa e cálculo dos CT do ensaio II na desinfecção de efluente secundário com ozônio.	224
Tabela 6.8 – Balanço de massa e cálculo dos CT do ensaio III na desinfecção de efluente secundário com ozônio.	225
Tabela 6.9 - Resultados físico-químicos e microbiológicos do ensaio I da ozonização de efluente secundário.	227
Tabela 6.10 - Resultados físico-químicos e microbiológicos do ensaio II da ozonização de efluente secundário.	228
Tabela 6.11 - Resultados físico-químicos e microbiológicos do ensaio III da ozonização de efluente secundário.	229
Tabela 6.12 - Resultados físico-químicos e microbiológicos do Ensaio I da desinfecção com radiação ultravioleta em efluente secundário.	235
Tabela 6.13 - Resultados físico-químicos e microbiológicos do Ensaio II da desinfecção com radiação ultravioleta em efluente secundário.	235
Tabela 6.14 - Resultados físico-químicos e microbiológicos do Ensaio III da desinfecção com radiação ultravioleta em efluente secundário.	236
Tabela 6.15 - Resultados das variáveis físicas e químicas (média ± desvio padrão) da desinfecção sequencial (Cloro - UV) de efluente de tratamento secundário.	239
Tabela 6.16 - Inativação, em unidades logarítmicas, de microrganismos indicadores (média ± desvio padrão) submetidos à cloração seguida de radiação ultravioleta.	240

Tabela 6.17: Valores de sinergismo, em unidades logarítmicas, encontrados para os microrganismos indicadores nos ensaios de desinfecção sequencial (cloro - radiação ultravioleta).	241
Tabela 6.18 - Resultados das variáveis físicas e químicas (média ± desvio padrão) da desinfecção sequencial (Ozônio - UV) de efluente de tratamento secundário.	244
Tabela 6.19 - Inativação, em unidades logarítmicas, de microrganismos indicadores (média ± desvio padrão) submetidos à ozonização seguida de radiação ultravioleta.	245
Tabela 6.20 - Valores de sinergismo, em unidades logarítmicas, encontrados para os micro-organismos indicadores nos ensaios de desinfecção sequencial (ozônio - radiação ultravioleta).	246
Tabela 7.1 - Métodos analíticos empregados para análises físico-químicas de efluentes da ETE.	255
Tabela 7.2 - Média e desvio padrão (quatro amostras) das características físicas, químicas e microbiológicas dos dois tipos de efluentes dos flotadores da ETE - Monjolinho.	256
Tabela 7.3 - Inativação de microrganismos do efluente do flotador com radiação UV na ETE Monjolinho (lâmpadas limpas).	257
Tabela 7.4 - Inativação de microrganismos do efluente do flotador por radiação UV na ETE - Monjolinho (lâmpadas sujas).	257
Tabela 7.5 - Inativação de microrganismos com cloração de efluente quando em baixa vazão afluente à ETE - Monjolinho.	258
Tabela 7.6 - Inativação de microrganismos com cloração de efluente quando em elevada vazão afluente à ETE - Monjolinho.	259

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

Abs: Absorbânica em 254nm

ACOT: Altas carga orgânica e turbidez

ANOVA: *Analysis of Variance* / análise de variância

AI: Alcalinidade intermediária

AP: Alcalinidade parcial

AT: Alcalinidade total

APHA: American Public Health Association

AWWA: American Water Works Association

BDTD: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações

BCOT: Baixas carga orgânica e turbidez.

CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CI_{50}: Concentração de inibição do crescimento de 50%

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente.

CP: *Clostridium perfringens*

CRC: Cloro residual combinado

CRL: Cloro residual livre

CRT: Cloro residual total

CT: Concentração x tempo de contato

DAPI: 4’,6-diamidino-2fenil-indol

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DP: Desvio padrão

DQO: Demanda Química de Oxigênio

EB: Esgoto Bruto

EC: Esgoto clorado

EO: Esgoto ozonizado

EESC: Escola de Engenharia de São Carlos

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

ETA: Estação de Tratamento de Água

ETE: Estação de Tratamento de Esgoto

FISH: Hibridização *in situ*

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

HAART: Terapia anti-retroviral de alta potência

IBTD: Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia

ICR: Information Collection Rule.

IES: Instituições de Ensino Superior

IMS: Separação Imunomagnética (*immunomagnetic separation*)

KI: Iodeto de potássio

LA: Lodos ativados

LATAR: Laboratório de Tratamento Avançado e Reúso de Água

MA: massa da amostra (g)

MBDK: células Madin-Darby de rim bovino.

MBR: *Membrane Bioreactor*

MCP: Concentrador de partículas magnéticas

Nd: Não detectado

$N\text{-}NH_3$: Nitrogênio Amoniacal

NOM: Norma Oficial Mexicana

NR: Não realizado

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PMA: Propídio monoazida

PMS: Produtos microbianos solúveis

POA: Processos Oxidativos Avançados

PSA: Pressure Swing Adsorption

PSRP: *Processes to Significantly Reduce Pathogens*

AQRM: Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico

RAALEX: Reator anaeróbio-aeróbio de leito expandido

RID: Reação de Imunofluorescência Direta

RNA: Ácido ribonucléico

SDT: Sólidos dissolvidos totais

SST: Sólidos suspensos totais

ST: Sólidos totais

TDH: Tempo de detenção hidráulica

TRC: Tempo de residência celular

UASB: Upflow anaerobic sludge blanket/ reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo.

UFC: Unidade formadora de colônia.

UNT: Unidade nefelométrica de turbidez.

USEPA: *U. S. Environmental Protection Agency*

USP: Universidade de São Paulo

UV: Ultravioleta

VSL: volume de sedimento examinado na lâmina

VSF: volume de sedimento final

WEF: *Water Environmental Federation*

WHO: *World Health Organization*

Lista de Símbolos

λ: comprimento de onda

ºC: graus Celsius

a: coeficiente de extinção [cm^{-1}]

A: absorbância a 254 nm, cubeta de 1,0 cm;

D: dose de radiação ultravioleta de comprimento de onda de 254 nm ($mWs.cm^{-2}$)

D: dose [M] [L^{-1}]

Dr: dose recebida por volume [$Wh.m^{-3}$]

$[Fe^{2+}]_d$: concentração molar de Fe^{2+} depois da irradiação ($mol.L^{-1}$)

$[Fe^{2+}]_a$: concentração molar de Fe^{2+} antes da irradiação ($mol.L^{-1}$)

i: número de cistos e oocistos inoculados

I_i: Intensidade de radiação no ponto i [$mW.cm^{-2}$]

Im: Intensidade média de radiação

Io: Intensidade de radiação na superfície do reator [$mW.cm^{-2}$]

L: espessura da lâmina líquida ou caminho óptico [cm]

M_A: massa aplicada de ozônio [M]

MNT: Massa de ozônio não transferida (*offgas*) [M]

M_R: massa residual de ozônio [M]

M_T: massa transferida ao meio líquido [M]

N_{tio}: normalidade da solução de tiossulfato de sódio

$[O_3]_{offgas}$: concentração de ozônio no *offgas* [M] [L^{-1}]

$[O_3]_R$: Concentração de ozônio residual [M] [L^{-1}]

P: produção de ozônio [g $O_3.h^{-1}$]

R: número de cistos e oocistos recuperados

T: tempo de contato [T]

V: volume [L]

V_{am}: volume de amostra titulada [L]

V_b: volume de tiossulfato de sódio gasto na titulação do branco [L]

V_{ef} : Volume do efluente ozonizado [L]

V_{KI}: volume de solução de KI adicionada na coluna de ozonização [L]

$V_{offgás}$: Volume de solução de KI (2%) adicionado no frasco lavador de gás [L]

V_{tio}: Volume de tiossulfato gasto na titulação da amostra [L]

X: número de (oo)cistos por litro

Y: eficiência de recuperação [%]

ϕ_{Fe}: rendimento quântico de produção de Fe^{2+} no comprimento de onda de 254 nm (1,26 íon grama.Einstein $^{-1}$).

Sumário

Introdução	37
Objetivos	39
Capítulo 1 - Estado da Arte: *Giardia* e *Cryptosporidium* - experiências e desafios no Brasil	41
1.1 - INTRODUÇÃO	42
1.2 - METODOLOGIA	48
1.3 - SÍNTESE DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	48
1.3.1 - Seres Humanos	50
1.3.2 - Animais	60
1.3.3 - Água e Tratamento de Água	66
1.3.4 - Esgoto e Tratamento de Esgoto	72
1.3.5 - Alimentos	77
1.3.6 - Outros	79
1.4 - CONCLUSÃO	82
Capítulo 2 - Métodos para recuperação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em esgoto sanitário	83
2.1 - INTRODUÇÃO	84
2.2 - ESQUEMA GERAL DE ESTUDO	85
2.3 - MATERIAL E MÉTODOS	86
2.3.1 - Amostragem	86
2.3.2 - Ensaios de Recuperação	87
2.3.2.1 - Tripla Centrifugação	87
2.3.2.1.1 - Amostra com turbidez elevada	87
2.3.2.1.2 - Amostra com turbidez média	89
2.3.2.2 - Centrifugação seguida de Separação Imunomagnética (IMS)	90
2.3.2.3 - Filtração em membrana	90
2.3.3 - Separação Imunomagnética (IMS-*Immunomagnetic Separation*)	92
2.3.3.1 – Dissociação ácida de (oo)cistos	94
2.3.4 - Ensaio Controle - Negativo	95
2.3.5 - Detecção e Identificação	95
2.3.6 - Análise Estatística	96

2.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
2.5 - CONCLUSÃO	100
Capítulo 3 - Remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em ETE - piloto	101
3.1 - INTRODUÇÃO	102
3.1.1 - Presença de protozoários em águas superficiais	102
3.1.2 - Microrganismos Indicadores	102
3.1.3 Tratamento de Esgoto	105
3.2 - OBJETIVOS	107
3.3 - MATERIAL E MÉTODOS	108
3.3.1 - A ETE - piloto	108
3.3.2 - Amostragem	113
3.3.3 - Análises Físico-Químicas	114
3.3.4 - Exames Microbiológicos	114
3.3.4.1 - *Escherichia coli* e coliformes totais	114
3.3.4.2 - *Clostridium perfringens*	116
3.3.4.3 - *Giardia* spp. *e Cryptosporidium* spp.	118
3.3.5 - Análise Estatística	118
3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	119
3.4.1 - Monitoramento de variáveis físicas e químicas	119
3.4.1.1 - pH	122
3.4.1.2 - Temperatura	122
3.4.1.3 - Alcalinidade	122
3.4.1.4 - Absorbância em 254 nm	123
3.4.1.5 - Turbidez	124
3.4.1.6 - Demanda Química de Oxigênio	124
3.4.1.7 - Sólidos	125
3.4.2 - Monitoramento de parâmetros microbiológicos	125
3.4.2.1 - Microrganismos Indicadores	125
3.4.2.2 - Protozoários patogênicos	129
3.4.2.3 - Comparação de concentrações e remoções de microrganismos	134
3.4.3 - Pós-Tratamento de Efluente de Lodos Ativados com Filtro Lento de Areia.	139

3.4.3.1 - Efluente com Carga Orgânica e Turbidez Baixas	140
3.4.3.1.1 - Turbidez	140
3.4.3.1.2 - DQO	142
3.4.3.1.3 - Microrganismos Indicadores e Protozoários Patogênicos	143
3.4.3.2 - Efluente com Carga Orgânica e Turbidez Elevadas	144
3.4.3.2.1 - Turbidez	144
3.4.3.2.2 - DQO	145
3.4.3.2.3 - Microrganismos Indicadores e Protozoários Patogênicos	146
3.4.3.3 - Camada biológica do Filtro Lento	147
3.4.3.4 - Remoção de variáveis físicas, químicas e microbiológicas na ETE com tratamento terciário.	148
3.5 - CONCLUSÕES	149
Capítulo 4 - Quantificação e avaliação da viabilidade de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em lodo de ETEs	151
4.1 - INTRODUÇÃO	152
4.1.1 - Produção e Destinação Final de Lodo de Esgoto	152
4.1.2 - Legislação Ambiental Aplicada	153
4.1.3 - Métodos de Análise de Protozoários em Lodo de Esgoto	157
4.1.4 - Características do Lodo de Esgoto	159
4.2 - MATERIAL E MÉTODOS	162
4.2.1 - Amostragem	162
4.2.2 - Processamento das amostras	162
4.2.2.1 - Detecção e Identificação de (oo)cistos	163
4.2.2.2 - Avaliação da viabilidade de (oo)cistos	163
4.2.3 - Análise Estatística	164
4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	164
4.3.1 - ETE - Campus da USP, São Carlos - SP	164
4.3.2 - ETE - em escala plena, do município de Limeira - SP	167
4.4 - CONCLUSÃO	168
Capítulo 5 - Remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em ETE em escala plena	169
5.1. INTRODUÇÃO	170
5.2. OBJETIVO	170

5.3. MATERIAL E MÉTODOS	171
5.3.1 - A ETE	171
5.3.2 - Amostragem	172
5.3.3 - Análises Físico-Químicas	172
5.3.4 - Exames Microbiológicos	173
5.3.5 - Análise Estatística	175
5.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	175
5.4.1 - Monitoramento de variáveis físicas e químicas	175
5.4.2 - Monitoramento microbiológico	179
5.5 - CONCLUSÕES	183
Capítulo 6 - Pós-tratamento de efluente secundário por desinfecção: ensaios individuais e sequenciais em batelada	185
6.1. INTRODUÇÃO	186
6.2. DESINFECÇÃO DE ESGOTO SANITÁRIO	186
6.2.1 - Cloro	187
6.2.2 - Ozônio	190
6.2.3 - Radiação Ultravioleta	191
6.2.4 – Tratamentos Sequenciais	194
6.3. OBJETIVO	197
6.4. MATERIAL E MÉTODOS	197
6.4.1 - Ensaios de desinfecção com Cloro	198
6.4.2 – Ensaio com Radiação Ultravioleta	200
6.4.2.1 – Medição da intensidade de radiação de lâmpadas UV a 254nm por actinometria	201
6.4.3 – Ensaio com Ozônio	204
6.4.3.1 – Curva de Calibração do Ozonizador	207
6.4.3.2 – Ensaio de desinfecção com ozônio	208
6.4.3.3 – Cálculo da produção de ozônio	209
6.4.3.4 – Balanço de massa do ozônio dissolvido na fase líquida	210
6.4.3.5 – Cálculo dos valores de concentração x tempo (CT) para ozônio	212
6.4.4 – Ensaios Sequenciais	213
6.4.5 - Exames Microbiológicos	213

6.4.6 - Análises Físico-Químicas	214
6.4.7 - Análise Estatística	214
6.5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	215
6.5.1 - Desinfecções Individuais	215
6.5.1.1 - Desinfecção com Cloro	215
6.5.1.2 - Desinfecção com Ozônio	221
6.5.1.2.1 – Curva de Calibração do Gerador de Ozônio	221
6.5.1.2.2 – Ensaios com ozônio: Balanço de Massa e Desinfecção	222
6.5.1.3 - Desinfecção com Radiação Ultravioleta	233
6.5.1.3.1 - Ensaios de Medição da quantidade de radiação UV a 254nm	233
6.5.1.3.2 - Ensaios de Desinfecção com Radiação UV	234
6.5.2 - Desinfecções Sequenciais	238
6.5.2.1 - Desinfecção Sequencial: Cloro com Radiação Ultravioleta	238
6.5.2.2 - Desinfecção Sequencial: Ozônio com Radiação Ultravioleta	243
6.6 - CONCLUSÃO	249
Capítulo 7 - Desinfecção Sequencial em ETE em escala plena - Estudo de caso da ETE Monjolinho	251
7.1 - INTRODUÇÃO	252
7.2 - OBJETIVOS	253
7.3 - MATERIAL E MÉTODOS	253
7.3.1 - A ETE - Monjolinho	253
7.3.2 - Ensaios em bancada de desinfecção com cloro	254
7.3.3 - Análises Físico-Químicas	255
7.3.4 - Exames Microbiológicos	255
7.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	256
7.4.1 - Desinfecção com Radiação UV	257
7.4.2 - Desinfecção com cloro - ensaios em bancada	258
7.4.3 - Desinfecção Sequencial (Cloro-UV) na ETE - Monjolinho	259
7.5 - CONCLUSÃO	262
Capítulo 8 - Conclusão	263
Capítulo 9 - Sugestões	267
Referências Bibliográficas	269

Introdução

O crescimento populacional tem levado ao aumento do consumo de água doméstico, industrial e comercial, os quais pressionam o setor de abastecimento de água – na questão de qualidade e quantidade de água a ser ofertada. Outro ponto que deve ser destacado é o reúso indireto da água para abastecimento público, onde a mesma fonte de água para captação serve de receptora de efluentes domésticos e industriais. Com estes efluentes, dependo da carga orgânica, a autodepuração pode ser insuficiente, piorando a qualidade da água e apresentando maiores riscos para a saúde da população à jusante.

O Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2012) relatou que, em 2010, 46,2 % da população brasileira possuía rede de coleta de esgoto sanitário e apenas 37,9 % do volume gerado de esgoto era tratado. Ao mesmo tempo, pesquisa do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) revelou que mais de 34 milhões de pessoas - 18% da população brasileira - estavam expostas a contrair inúmeras doenças advindas do contato direto e indireto com esgoto sanitário (IBGE, 2011).

Como há inúmeras doenças que podem ser veiculadas pela água, o tratamento de esgoto sanitário possui papel essencial na remoção e inativação de microrganismos patogênicos, no intuito de que seu efluente não comprometa os múltiplos usos do corpo d'água receptor.

Muito tem se pesquisado quanto ao tratamento de água visando ao abastecimento público, mas ainda são escassos os dados disponíveis sobre a remoção e inativação de protozoários por meio de tratamento de esgoto (CARDOSO et al., 2003; CARRARO et al., 2000; CHENG et al., 2009; HELLER et al., 2004; ROBERTSON et al., 2000; ROSE et al., 1996; SANTOS et al., 2004; WEN at al., 2009).

A frequência de detecção de *Giardia* e *Cryptosporidium* na água filtrada está relacionada à concentração de cistos e oocistos na água bruta de mananciais (BETANCOURT; ROSE, 2004; LECHEVALIER; NORTON, 1995). Por conseguinte, um eficiente processo de tratamento de esgoto, com alta eficiência na remoção e inativação de microrganismos, diminui o aporte de patógenos aos mananciais. (CASTRO-HERMIDA et al., 2008; EDZWALD; KELLEY, 1998).

É necessário ainda um melhor entendimento dos mecanismos pelos quais os processos de tratamento controlam os patógenos presentes na água e esgoto (BETANCOURT; ROSE, 2004; WHO, 2006). E isso só pode ocorrer via integração de estudos que contemplem as fontes de abastecimento de água, o transporte e sobrevivência de parasitas na água, a influência de fatores ambientais e a habilidade de os sistemas de tratamento de água e esgoto em reduzirem os riscos de doenças de veiculação hídrica (CASTRO-HERMIDA et al., 2008; FERGUSON et al., 2003; LONIGRO et al., 2006).

A questão do reuso de águas residuárias é muito promissora e em diversos países, onde a água já está escassa, ela se faz necessária. Neste contexto, a presente pesquisa visou a investigar a remoção em reatores UASB, sistema de lodos ativados, filtro lento em areia e a ação de diferentes desinfetantes em cistos de *Giardia* e em oocistos de *Cryptosporidium*, a fim de expor os riscos e, principalmente, os desafios para futuros reusos.

Com o intuito de se ter uma melhor compreensão desta tese, em vista de sua abrangência, houve a divisão em nove capítulos principais:

- Capítulo 1: Estado da Arte: *Giardia* e *Cryptosporidium* - experiências e desafios no Brasil.
- Capítulo 2: Métodos de recuperação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em esgoto sanitário.
- Capítulo 3: Remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em ETE - piloto.
- Capítulo 4: Quantificação e Avaliação da viabilidade de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em lodo de ETEs.
- Capítulo 5: Remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em ETE em escala plena.
- Capítulo 6: Pós-tratamento de efluente secundário por desinfecção - ensaios individuais e sequenciais em batelada.
- Capítulo 7: Desinfecção Sequencial em ETE em escala plena - Estudo de caso da ETE Monjolinho.
- Capítulo 8: Conclusão.
- Capítulo 9: Sugestões.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de processos de tratamento de esgoto na remoção de protozoários patogênicos: *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp..

Como objetivos específicos, são destacados os seguintes:

- Testar métodos para recuperação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em esgoto sanitário bruto e tratado;
- Avaliar a remoção e a viabilidade dos cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em processos de tratamento de esgoto - UASB, sistema de lodos ativados e filtração lenta em areia, em ETE - piloto.
- Avaliar a remoção e a viabilidade dos cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em processos de tratamento de esgoto - UASB, sistema de lodos ativados, em ETE - escala plena.
- Avaliar a remoção de microrganismos indicadores – coliformes totais, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* - em processos de tratamento de esgoto, em ETE - piloto e em escala plena, em busca de associação à remoção de protozoários patogênicos.
- Avaliar diferença de remoção de microrganismos em sistema de lodos ativados a partir da mudança do tempo de residência celular.
- Avaliar diferença de remoção de microrganismos em filtro lento em areia operado com diferentes taxas de filtração e carga orgânica aplicada.
- Verificar a concentração e viabilidade de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em lodo de ETEs;
- Avaliar a ação dos desinfetantes - cloro, ozônio e radiação ultravioleta - em ensaios individuais e sequenciais em esgoto tratado, na inativação de protozoários patogênicos e microrganismos indicadores, no intuito de encontrar efeitos sinérgicos.
- Avaliar a ocorrência de efeitos sinérgicos de uma unidade de desinfecção sequencial - cloro seguido de radiação ultravioleta - em ETE de escala plena.

Capítulo 1

Estado da Arte: Giardia e *Cryptosporidium* - experiências e desafios no Brasil

O intuito deste capítulo foi constatar em pesquisas - teses e dissertações - os resultados e principalmente os desafios no estudo dos protozoários patogênicos - *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. – no país, a partir de levantamento bibliográfico de casos de prevalência na população humana e em animais, concentrações encontradas em água, esgoto sanitário, alimentos contaminados, entre outros temas.

1.1 - INTRODUÇÃO

Alguns dos mais importantes agentes patogênicos presentes em água contaminada - tanto em relação ao número de casos já relatados na literatura, quanto em preocupação no contexto de concentração excretada e respectiva dose infectante - podem ser visualizados na tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Alguns dos principais agentes etiológicos de doenças de veiculação hídrica.

Agente	**Doença**	**Concentração Excretada (por grama de fezes)**	**Dose Infectante (nº de organismos)**
Salmonella typhi(1)	Febre Tifoide	10^6	$10^5 – 10^9$
Shigella spp.(1)	Disenteria Bacilar	10^6	10 – 100
Vibrio cholerae(1)	Cólera	10^6	10^8
Enterovirus(2)	Gastroenterite	10^6	<100
Vírus da Hepatite A(2)	Gastroenterite	10^6	<100
Giardia lamblia(3)	Giardíase	10^5	< 10
Cryptosporidium sp(3)	Criptosporidiose	10^6	< 10
Entamoeba histolytica(3)	Amebíase	10^5 -10^7	<100
Ascaris lumbricoides(4)	Ascaridíase	10 - 10^4	< 10
Ancylostoma duodenale(4)	Ancilostomose	10 - 100	< 10
Taenia(4)	Teníase	10^5	< 10

Fonte: BASTOS et al., 2003; HELLER; PÁDUA, 2006; USEPA, 1999; WEF, 1996; WHO, 2006. (retirada de MEDEIROS, 2010).

(1)Bactéria; (2)Vírus; (3)Protozoário; (4)Helminto.

Entre os microrganismos relatados, *Giardia* e *Cryptosporidium* merecem destaque pois são excretados em alta concentração, possuem baixa dose infectante e são resistentes a processos de desinfecção comumente utilizados para tratamento de água e de efluentes (HELLER; PÁDUA, 2006).

Esses dois protozoários já foram diagnosticados até mesmo em material arqueológico no Brasil, sendo o primeiro relato de *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* em amostras de origem humana e animal (VILLARROEL, 2013). A mesma autora sugere a

circulação zoonótica de *Giardia* no passado, ao verificar a sua presença em amostras de origem humana e animal no mesmo sítio arqueológico.

A Giardíase e a Criptosporidiose foram incluídas no "Neglected Diseases Initiative" (Iniciativa em Doenças Negligenciadas) em 2005 pela Organização Mundial de Saúde. São doenças que juntas com outras causadas por bactérias, vírus e parasitas, têm em comum a ligação com a pobreza. Ambos agentes possuem como principais rotas de transmissão do tipo fecal – oral e podem ser: pessoa-pessoa por contato direto ou indireto; animal-animal; animal-homem; água contaminada; comida contaminada (FAYER et al., 2000; LIM et al., 2007, PLUTZER et al., 2010).

Giardia lamblia (sinônimos: *G. duodenalis* e *G. intestinalis*) é um protozoário flagelado, descoberto por Antonie van Leeuwenhoek em 1681. Apresenta-se em duas formas: trofozoíto e cisto. A primeira é a forma ativa, na qual ele se alimenta e se reproduz. O cisto é uma forma de resistência ou inativa, tem formato oval com aproximadamente de 8 a 12 μm de comprimento, por 7 a 10 μm de largura e uma "parede" de 0,3 a 0,5 μm de espessura, possuindo dois ou quatro núcleos (ADAM, 2001; SAGAYAR, 1997; USEPA, 2005).

A figura 1.1 ilustra o ciclo de vida da *Giardia* spp. no hospedeiro humano.

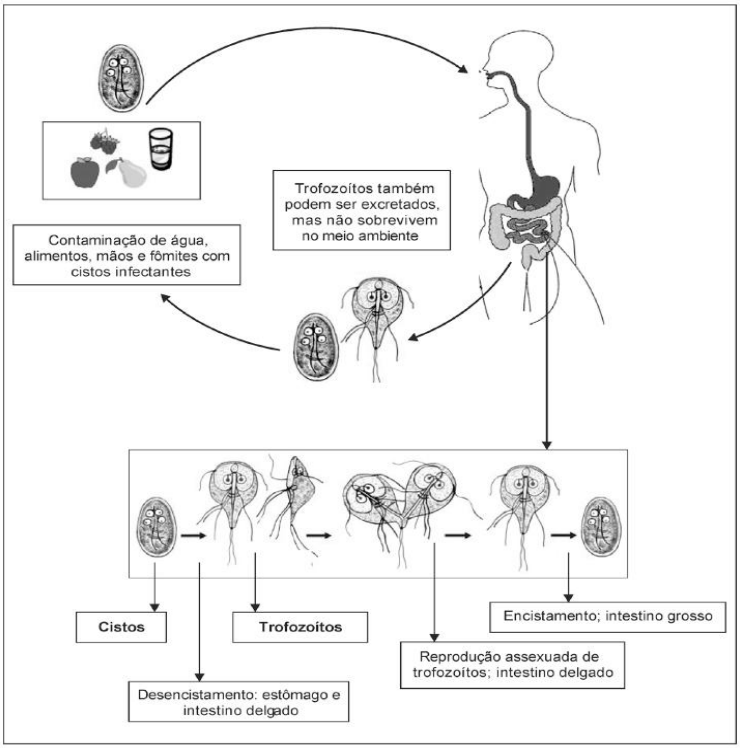


Figura 1.1 - Ciclo da *Giardia* spp. no homem (*Centers for Disease Control and Prevention*, adaptado por Bastos et al., 2003).

A *Giardia* spp. é ingerida na água e em alimentos contaminados na forma encistada, pois não sobreviveria no ambiente externo ao hospedeiro no estágio vegetativo (trofozoíto). Após ingestão do cisto, ocorre o desencistamento e posterior liberação do trofozoíto no estômago, com o favorecimento do ambiente ácido. No intestino delgado, há a reprodução do trofozoíto por fissão binária. E quando exposto à bile, o trofozoíto se encista no intestino grosso, sendo depois eliminado com as fezes. (ADAM, 2001; BASTOS et al., 2003; PLUTZER et al., 2010).

A persistência no ambiente aquático, resistência à desinfecção por cloro e infectividade são características que fazem da *Giardia* spp. um patógeno de alto risco para a saúde pública (MEDEMA; SCHIJVEN, 2001; SAGAYAR, 1997).As espécies de *Giardia* infectam uma diversidade de hospedeiros, desde mamíferos, até aves e anfíbios (FENG; XIAO, 2011). Atualmente, são aceitas seis espécies pela maioria dos pesquisadores, como pode ser visualizado na tabela 1.2.

Tabela 1.2 - Espécies de *Giardia*.e principais hospedeiros.

Espécies	**Genótipo**	**Principais Hospedeiros**
G. duodenalis	A	Humanos, primatas não humanos, ruminantes, suínos, equinos, canídeos silvestres e domésticos, felídeos, roedores e outros mamíferos.
	B	Humanos, primatas não humanos, bovinos, cães, equinos e outros mamíferos.
	C, D	Canídeos domésticos e silvestres
	E	Ruminantes domésticos e porcos
	F	Felinos
	G	Ratos
	H	Focas
G. agilis		Anfíbios
G. ardeae		Aves
G. microti		Roedores
G. muris		Roedores
G. psittaci		Aves

Fonte: Adaptado de Feng e Xiao (2011), Plutzer et al. (2010) e Villarroel (2013).

A espécie *G. duodenalis* apresenta diferentes genótipos: A, B, C, D, E, F, G e H, sendo considerada um complexo multiespécies. Dessa forma, é uma espécie com potencial de infecção de humanos e não humanos e de grande significância para a Saúde Pública, devido ao caráter zoonótico (FENG; XIAO, 2011).

O gênero *Cryptosporidium* foi descoberto pelo parasitologista Ernest Edward Tyzzer em 1907 (TZIPORI, WIDMER, 2008). A maioria dos oocistos possui forma esférica - oval, medindo de 4 a 6 µm de diâmetro. Esta é a forma pela qual ocorre a transmissão da doença, de um hospedeiro infectado para um susceptível. São parasitas obrigatórios que infectam o trato intestinal de humanos e animais.

O ciclo de vida do *Cryptosporidium* spp. pode ser visualizado na figura 1.2.

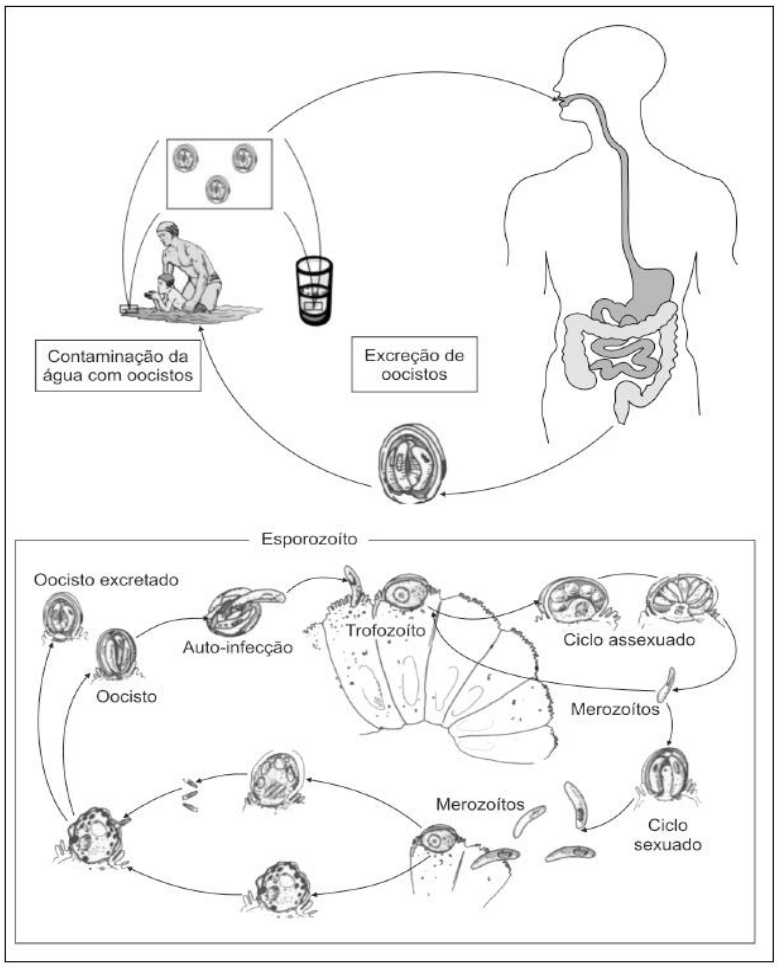


Figura 1.2 - Ciclo biológico do *Cryptosporidium* spp. (*Centers for Disease Control and Prevention*, adaptado por Bastos et al., 2003).

Os oocistos ingeridos liberam esporozoítos no intestino delgado, os quais penetram nas células epiteliais e se transformam em trofozoítos. Após os ciclos assexuado e sexuado de reprodução, são formados dois tipos de oocistos: um de parede

espessa (80%) que é liberado no ambiente junto com as fezes; e outro de parede mais fina (20%) que talvez seja o responsável por casos de auto-infecção (BASTOS et al., 2003; HUNTER; THOMPSON, 2005; SANTOS, 2007).

Com o avanço da AIDS, foi reconhecido como agente causador de diarréia em indivíduos com sistema imunológico comprometido como, por exemplo, pacientes HIV positivos, pacientes de quimioterapia, transplantados (CAREY et al., 2004). Este microrganismo ganhou destaque na saúde pública após o surto de Milwaukee (USA), onde infectou mais de 400 mil pessoas (MACKENZIE et al., 1994).

São reconhecidas 30 espécies de *Cryptosporidium*, as quais foram confirmadas por dados moleculares, morfológicos e biológicos (SLAPETA, 2013), como pode ser visualizado na tabela 1.3.

Slapeta (2013) relata que as espécies: *C. hominis* e *C. pestis* como as de maior significado à saúde pública; as espécies - *C. cuniculus, C. meleagridis, C. viatorum* e *C. felis* de médio significado; e as espécies: *C. parvum, C. canis, C. suis, C. ubiquitum, C. scrofarum, C. muris* e *C. andersoni* de pouco significado para a sáude pública.

Tabela 1.3 - Espécies de *Cryptosporidium* e seus hospedeiros principais.

Espécies	**Principais Hospedeiros**
C. muris	Roedores
C. parvum	Gado, animais domésticos, homem.
C. melegridis	Aves
C. wrairi	Porcos da Guiné
C. agni	Ovelha
C. bovis	Gado
C. cuniculus	Coelho
C. felis	Gatos
C. serpentis	Répteis
C. nasoris	Peixes
C. baileyi	Aves domésticas
C. varanii	Lagartos
C. cichlidis	Peixes
C. reichenbachklinkei	Peixes
C. galli	Aves
C. andersoni	Gado

C. canis	Cães
C. hominis	Homem
C. molnari	Peixes
C. suis	Porcos
C. scophthalmi	Peixes
C. pestis	Gado, homem e outros mamíferos
C. fayeri	Marsupiais
C. ryanae	Gado
C. fragile	Anfíbios
C. macropodum	Marsupiais
C. ducismarci	Tartarugas
C. ubiquitum	Mamíferos, incluindo o homem
C. viatorum	Homem
C. scrofarum	Porcos domésticos e javalis

Fonte: Slapeta (2013).

Essas duas doenças têm em comum o fato de serem, no Brasil, subdiagnosticadas e não possuem notificação obrigatória pelo sistema de saúde. Consequentemente, as prevalências na população são difíceis de determinar; no entanto, a contribuição por pessoas infectadas pode ser avaliada a partir de concentrações de cistos e oocistos encontradas no esgoto sanitário.

Baldursson e Karanis (2011) relatam que entre os anos de 2004 e 2010, cento e noventa e nove surtos por protozoários patogênicos foram reportados pelo mundo; 60,3% e 35,2% foram causados por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., respectivamente.

A partir dos relatos anteriores e a possibilidade de escassez hídrica qualitativa e/ou quantitativa, cresce a pressão para o reúso de esgoto, o que torna-se ainda mais importante estudos da ocorrência, remoção e inativação de (oo)cistos durante o tratamento de efluentes (ROBERTSON et al., 1999). Segundo Iacovscki et al. (2004), deve-se atentar também aos subprodutos desse tratamento, como o lodo de esgoto cuja utilização, principalmente na agricultura, vem crescendo em vários países nas últimas décadas. No entanto, é uma prática que precisa de cuidado devido a organismos patogênicos que podem estar presentes.

1.2 - METODOLOGIA

A coleta de dados foi realizada na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD) a qual reúne mais de 220 mil teses e dissertações de 97 instituições públicas e privadas brasileiras, e datam desde 1903. O projeto da BDTD é coordenado pelo Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia (IBICT), ligado ao Ministério de Ciência e Tecnologia, que integra os sistemas de informação de teses e dissertações existentes nas instituições de ensino e pesquisa brasileiras. Para isso, foram inseridas as palavras "*Giardia*" e "*Cryptosporidium*" na busca "simples" do banco de dados, surgindo a lista de teses e dissertações utilizadas para esta revisão crítica (BDTD, 2013).

1.3 - SÍNTESE DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Até o dia 12 de junho de 2013, como resposta da busca no banco de dados, foram encontradas 105 teses e dissertações que abordavam o tema *Giardia* e 90 com o tema *Cryptosporidium* (BDTD, 2013). Destes trabalhos, alguns estavam presentes na BDTD, porém não disponíveis, pois seu conteúdo estava liberado somente para a comunidade da Universidade da qual o documento era proveniente, ou se encontrava retido por motivo de patente requerido pelos autores; sendo assim, descartados da revisão bibliográfica. Além disso, alguns trabalhos tratavam dos dois temas.

Dessa forma, foram avaliadas 122 teses e dissertações, desenvolvidas em 23 diferentes Instituições de Ensino Superior (IES), de quatro das cinco regiões geográficas do Brasil, como pode ser visto da figura 1.3.

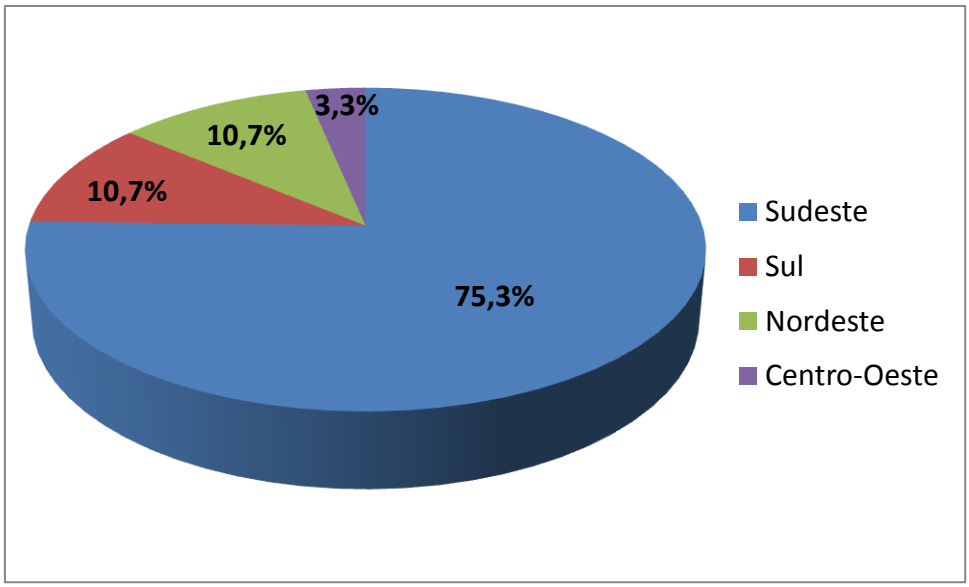


Figura 1.3: Distribuição de dissertações e teses sobre os temas *Giardia* e *Cryptosporidium* nas regiões geográficas do Brasil (BDTD, 2013).

Não foi encontrada, na base de dados pesquisada, nenhuma tese ou dissertação proveniente de IES localizada na região Norte. Destaca-se, nestas condições, uma má distribuição do conhecimento sobre os protozoários patogênicos *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., com acumulação de estudos na região Sudeste, principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais.

Observou-se uma grande ligação entre o Estado da Instituição de Ensino e o local onde a pesquisa foi realizada, com isso, apenas 16 Estados brasileiros e o Distrito Federal, em todas as regiões do país (figura 1.4), tiveram estudos sobre esses protozoários patogênicos, sendo concentrados nos estados: SP, MG, RS e RJ. Esses resultados, ao mesmo tempo em que mostram um horizonte muito curto de pesquisas sobre o tema, também relatam inúmeras abordagens de pesquisas a fim de suprir a carência de estudos sobre *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., altamente relevantes para a Saúde Pública.

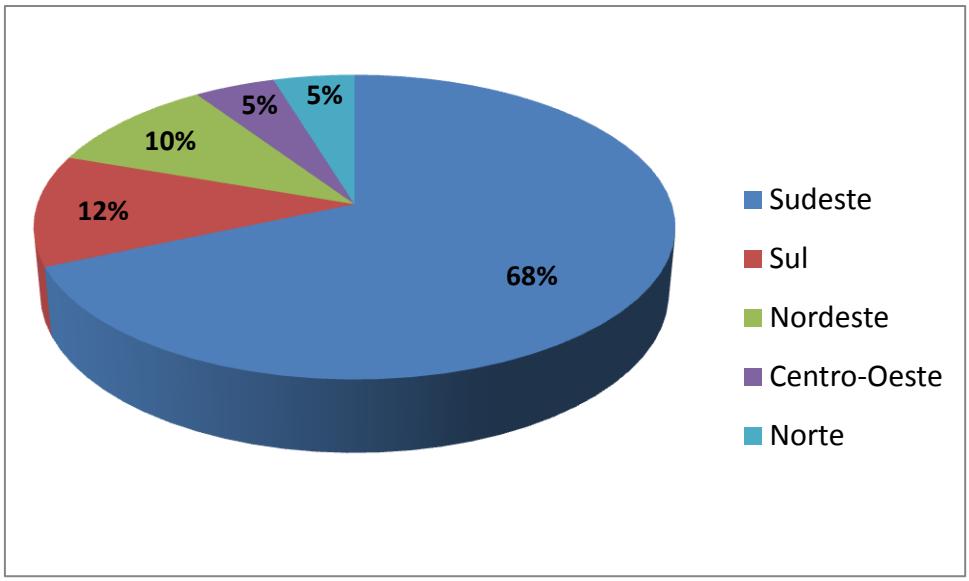


Figura 1.4: Distribuição dos locais de estudo dos trabalhos sobre os temas *Giardia* e *Cryptosporidium* nas regiões geográficas do Brasil (BDTD, 2013).

Constatou-se uma diversidade de áreas do conhecimento que dão suporte para pesquisas desses temas, como: área Médica, Parasitológica e Saúde Pública, nos estudos em humanos; Medicina Veterinária, em estudos com animais; Engenharia Sanitária, em estudos com água e esgoto. Observou-se também que as áreas do conhecimento não ficaram restritas a determinados temas, o que se torna extremamente importante na elucidação de casos, constatação de presença ou ausência de (oo)cistos nos mais variados ambientes; com destaque para as áreas parasitológica e epidemiológica.

Para melhor elucidação dos dados obtidos nesta revisão bibliográfica, o conteúdo das pesquisas foi dividido em seis temas principais: homem; animais; água e tratamento de água; esgoto e tratamento de esgoto; alimentos; e outros, que serão discutidos separadamente.

1.3.1 - Seres Humanos

Foram separados 50 trabalhos que tiveram como objetivo o estudo da prevalência de *Giardia* e/ou *Cryptosporidium* em amostras de fezes humanas, como pode ser visualizado no quadro 1.1.

Por esses estudos, verifica-se que são muitos os trabalhos com crianças até 5 anos de idade. Elas servem, segundo Berne (2007), Dias (2007) e Santos (2008), como indicadores de prevalência de enteroparasitoses, pois apresentam: baixa mobilidade, retratando melhor a condição higiênico-sanitária do local onde habitam; comportamento

ligado à fase oral; mais susceptíveis à giardíase e criptosporidiose devido à imaturidade do sistema imunológico.

A presença nas fezes de protozoários comensais – não patogênicos – como *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Enteromonas hominis*, em muitos trabalhos, indicam a ocorrência de contaminação de origem fecal humana, exibindo potencial de transmissão de doenças enteropatogênicas (FERREIRA, 2004; DIAS, 2005; MAIA, 2006; BERNE, 2007; MASCARINI, 2007; KRAUSE, 2009; BELLOTO, 2010; CARVALHO, 2011).

A questão da Educação Sanitária, enaltecida por Pereira (2003), Ferreira (2004), Souza (2005), Pereira (2010) e Carvalho (2011), é de extrema importância, pois segundo esses autores a falta de conhecimento sobre hábitos de higiene favorece a elevada taxa de prevalência de doenças parasitárias.

Outro ponto importante ressaltado nos estudos é a dificuldade de comparação em vista das diferentes metodologias empregadas para concentração e purificação das amostras de fezes: Hoffman et al. (1984); Faust et al.(1939); Vasques et al.(1986); ELISA (ensaio imunoenzimático), Sheather (1923), PCR, Coprotest®, entre outros. A coloração de (oo)cistos também foi realizada por inúmeras técnicas: lugol, safranina-azul de metileno, Ziehl Neelsen, ácido tricromático, hematoxilina férrica.

Há a necessidade de estudo e padronização de técnicas de biologia molecular para elucidar os genótipos de (oo)cistos encontrados nas amostras, com a finalidade de compreender a participação de diferentes espécies animais na contaminação do homem e de outras amostras, como por exemplo, água de mananciais. (ALMEIDA, 2004; DIAS, 2007; GONÇALVES, 2007; SOUZA, 2007).

Quadro 1.1 – Estudos de prevalência de enteroparasitas (geral) e de *Giardia* e *Cryptosporidium* em grupos populacionais de diferentes idades e de diferentes localidades do Brasil.

Referencia Bibliográfica	**Grupo Estudado**	**Prevalência**	**Local Estudo**	**Observações**
Lomazi (1990)	Crianças até 12 anos (288 amostras)	Geral (59,4%) *Giardia* (14,3%) *Cryptosporidium* (0,5%)	SP	Distribuição de episódios de diarréia durante o ano (diferença estatística): doenças bacterianas nos meses mais quentes; viroses nos meses mais frios.
Franco (1996)	Crianças de 2 a 42 meses (307 amostras) Funcionários de creche (134 amostras)	Crianças: Geral (17,9%) *Giardia* (10,1%) *Cryptosporidium* (5,5%) Funcionários: Geral (13,4%) Giardia (3,7%)	SP	Há múltiplos fatores que, em conjunto, são responsáveis por potencializar a transmissão de agentes enteropatogênicos. Presença de protozoários não patogênicos de origem fecal humana.
Ribeiro Junior (2002)	População em geral (224 amostras)	Geral (56,7%) *Giardia* (8%)	SP	*Giardia* mais prevalente na população com idade até 15 anos. Maior risco quando da ingestão de água não filtrada.
Pereira (2003)	População em geral (183 amostras)	Geral (26,1%) *Giardia* (7,9%)	SP	*Giardia* foi mais freqüente em criança e adolescentes (até 15 anos de idade). Presença de protozoários não patogênicos de origem fecal humana.
Almeida (2004)	População em geral (obtenção de oocistos)	Padronização de técnicas	SP	Técnicas de extração de DNA e identificação de *Cryptosporidium* por PCR
Antunes (2004)	Crianças de 3 a 6 anos (84 amostras)	Geral (27,4%) *Giardia* (2,4%)	MG	Água de consumo fora dos padrões de potabilidade, mas não encontrou relação estatística com a prevalência de parasitos.
Ferreira (2004)	Crianças até 10 anos (900 amostras)	Geral (11,5%) *Giardia* (5%)	SP	Maior prevalência em escolares com moradia precária. Presença de protozoários não patogênicos de origem fecal humana.
Oliveira (2004)	Crianças até 7anos (222 amostras)	Geral (37,2%) *Giardia* (8,4%)	MG	Em condições precárias, maiores casos de poliparasitismo. Creche/escola como importante mecanismo de transmissão.

Quadro 1.1 (Continuação) – Estudos de prevalência de enteroparasitas (geral) e de *Giardia* e *Cryptosporidium* em grupos populacionais de diferentes idades e de diferentes localidades do Brasil.

Dias (2005)	Crianças até 14 anos (1140 amostras)	Geral (15,8%) *Giardia* (5%)	RS	Mais casos de giardíase no verão. Presença de protozoários não patogênicos de origem fecal humana. Distância da fonte de contaminação (esgoto a céu aberto), distância menor de 300 metros, risco 153 vezes maior de contaminação
Malta (2005)	Crianças até 7 anos (314 amostras). Professores (16 amostras). Merendeiras (12 amostras).	Geral: (37% das crianças) (25% das merendeiras) (6% das professoras) *Giardia* (23,9 % crianças) (17% das merendeiras)	SP	Taxa de prevalência de protozoários é inversamente proporcional à faixa etária do hospedeiro e ao grau de instrução dos pais. Presença de protozoários não patogênicos de origem fecal humana.
Pereira (2005)	Crianças de 9 a 11 anos (1233 amostras)	Geral (49,6%) *Giardia* (13,1%)	RS	Presença de protozoários não patogênicos de origem fecal humana.
Sadovsky (2005)	Crianças até 3 anos (88 amostras)	*Giardia* (14,8%) *Cryptosporidium* (11,4%)	ES	Os protozoários são o grupo de enteropatógenos mais associados com poliparasitismo.
Souza (2005)	Polução em geral (188 amostras)	Geral (46%) *Giardia* (5%) *Cryptosporidium* não foi encontrado	RJ	Alta prevalência de *Giardia* em crianças com até 10 anos. Dos casos positivos para enteroparasitos, 44% houve poliparasitismo. Localidade do estudo com baixo padrão de saneamento e higiene.
Branco (2006)	População Geral (185 amostras)	Geral (49,2%) *Giardia* (5,9%) *Cryptosporidium* (8,1%)	SP	Dos casos de *Cryptosporidium*, 53,3% eram crianças de 0 a 12 anos idade.
César (2006)	População em geral (408 amostras)	Identificação de um surto de *Giardia* em creche; e de um surto de *Cryptosporidium* em orfanato.	SP	Faixa etária de até 1 ano, maior incidência de doença diarréica aguda (27,1/1000 habitantes). Maior concentração de casos dessas doenças nos bairros onde a população apresenta menor poder aquisitivo.

Quadro 1.1 (Continuação) – Estudos de prevalência de enteroparasitas (geral) e de *Giardia* e *Cryptosporidium* em grupos populacionais de diferentes idades e de diferentes localidades do Brasil.

Maia (2006)	Crianças até 10 anos (451 amostras)	Geral (58,7%) *Giardia* (21,5%)	AM	Não encontrou relação entre crianças desnutridas e não desnutridas com a prevalência de parasitoses. Presença de protozoários não patogênicos de origem fecal humana.
Silva (2006)	Crianças em idade escolar (1119 amostras)	Geral (40,3%)	RS	Crianças infectas com *Giardia lamblia* estavam "protegidas" de apresentar hiper-reatividade brônquica – devido a uma estimulação imunológica continua, seguidos de ativação de moléculas anti-inflamatórias, vindo a regular reações de doenças alérgicas.
Bachur (2007)	Pacientes HIV positivos (582 amostras)	Pré-HAART: Geral (63,9%); *Giardia* (7,9%), *Cryptosporidium* (8,1%). Pós-HAART. Geral (24%); *Giardia* (1,0%), não encontrado *Cryptosporidium*	CE	Diferença significativa de prevalência de parasitos nos pacientes pré-HAART e pós-HAART. O uso de anti-retrovirais parece representar "fator de proteção" contra a aquisição de enteroparasitas.
Berne (2007)	Crianças até 15 anos (165 amostras)	Geral (64,2%) *Giardia* (30,3%) *Cryptosporidium* (2,4%)	RS	Presença de protozoários não patogênicos de origem fecal humana.
Dias (2007)	Crianças até 10 anos (51 amostras)	Geral (21,1%) *Giardia* (6,1%) Não foi encontrado *Cryptosporidium*	MG	Associação significativa para uso doméstico de filtro para água.
Figueiredo (2007)	Pacientes HIV positivos (202 amostras)	*Giardia* (1,0%) *Cryptosporidium* (1,9%)	PE	Baixa prevalência neste estudo devido à ação de terapia anti-retroviral, bem como do trabalho de prevenção e educação para a saúde dos portadores de HIV.

Quadro 1.1 (Continuação) – Estudos de prevalência de enteroparasitas (geral) e de *Giardia* e *Cryptosporidium* em grupos populacionais de diferentes idades e de diferentes localidades do Brasil.

Gonçalves (2007)	População em geral (2410 amostras)	Geral (27,8%) *Giardia* (1,0%) *Cryptosporidium* (2,7%)	SP	Associação de *Cryptosporidium* com amostras de grupos de pessoas imunocomprometidas.
Mascarini (2007)	Crianças em creches (1029 amostras) Funcionários (114 amostras)	**1º periodo**: Crianças: Geral (50,4%) *Giardia*(23,7%) *Cryptosporidim* (15,6%) Funcionários: Geral (47,4%); *Giardia* (18,5%); *Cryptosporidium* (44,4%) **2º período**: Crianças: Geral (34%); *Giardia* (21,4%); *Cryptosporidium* (3,77%) Funcionários: Geral (39,2%); *Giardia* (5%); *Cryptosporidium* (45%)	SP	Maiores prevalências em crianças relacionadas à baixa renda familiar, mães com menos anos de estudo, possuir animais domésticos. Quanto aos funcionários, os residentes na zona rural apresentaram maior prevalência em relação aos que residiam na zona urbana. Presença de protozoários comensais, que funcionariam como indicadores de baixas condições socioeconômicas.
Recuero (2007)	Crianças até 12 anos (22 amostras)	*Giardia* (13,6%)	RS	Presença de protozoários não patogênicos de origem fecal humana.
Reis (2007)	Crianças até 6 anos (60 amostras)	Geral (93,3%) *Giardia* (16%)	MG	50 amostras diarréicas e 10 não diarréicas. Saneamento precário e água servida de má qualidade.
Souza (2007)	População em geral (37 amostras)	Identificação molecular genotípica de *Giardia*	SP	Amostras de fezes humanas: *Assemblage* A (genótipo A II) e *Assemblage* B (genótipo B IV).

Quadro 1.1 (Continuação) – Estudos de prevalência de enteroparasitas (geral) e de *Giardia* e *Cryptosporidium* em grupos populacionais de diferentes idades e de diferentes localidades do Brasil.

Batista (2008)	População geral (1 a 53 anos) - 48 amostras	Geral (85%) *Giardia* (54%)	RO	*Giardia* acometeu 43% dos adultos e 60% das crianças. 54% dos indivíduos parasitados apresentaram mais de um parasito (bi ou poliparasitismo).
Gonçalves (2008a)	Pacientes adultos HIV positivos (100 amostras)	*Giardia* (3,7%) Cryptosporidium (6,6%)	SP	
Iasbik (2008)	População Geral (266 amostras)	Geral (43,6%) *Giardia* (2,2%)	MG	Alta prevalência onde as condições higiênico-sanitárias não são adequadas. Redução de parasitose com o aumento da idade.
Santos (2008)	Crianças até 5 anos (245 amostras)	Geral (65,3%) *Giardia* (51,8%) *Cryptosporidium* (1,2%)	MG	Para giardíase: beber água filtrada foi fator de proteção; lavar as mãos com água e sabão, e não somente com água. Para Criptosporidiose, a idade foi significante (1 a 2 anos)
Teles (2008)	População em geral, acima de 5 anos (1622 amostras)	Geral (47,8%) *Giardia* (7,8%)	CE	*Giardia* foi mais frequente na faixa etária de 5 a 14 anos. Relação da prevalência de parasitoses com a pobreza, baixa escolaridade e falta de saneamento.
Araújo (2009)	34 Mães adolescentes e seus filhos até 1 ano (acompanhamento por um ano)	Mães: Geral: 76,4% *Giardia*: 19,2% Filhos: Geral: 61,7% *Giardia*: 40%	RN	Poliparasitismo em 38,2% das amostras de fezes das mães e em 11,8% das crianças. Associação entre o maior tempo de amamentação com o maior tempo para a primeira detecção de parasitos nas crianças. Grande importância do aleitamento materno para proteger a criança no seu 1º ano de vida contra parasitos intestinais.
Funada (2009)	População em geral (obtenção de oocistos)	Avaliação de desempenho de métodos de extração de DNA	SP	Aumento de sensibilidade do método de PCR com a realização de *Nested*-PCR (duas etapas de PCR)

Quadro 1.1 (Continuação) – Estudos de prevalência de enteroparasitas (geral) e de *Giardia* e *Cryptosporidium* em grupos populacionais de diferentes idades e de diferentes localidades do Brasil.

Garcia (2009)	Crianças até 2 anos (166 amostras)	Geral (25,5%) *Giardia* (20,5%)	AC	Presença de protozoários não patogênicos de origem fecal humana.
Hinke (2009)	População ribeirinha (268 amostras)	Geral (86,6%) *Giardia* (15,4%)	AM	Presença de protozoários não patogênicos de origem fecal humana.
Krause (2009)	Pacientes HIV/AIDS positivos (682 amostras)	Geral (47,6%) *Giardia* (7,7%) *Cryptosporidium* (1,1%)	RS	Maiores prevalências em pacientes com: menor nível econômico; possuem animais domésticos; não usam antiretrovirais.
Sevá (2009)	População em geral (24 amostras)	Encontrados: *C. canis*, *C.parvum*, *C. felis* e *C. hominis*	SP	Caracterização molecular de amostras de *Cryptosporidium* encontrados em fezes humanas.
Belloto (2010)	Crianças (2 a 15 anos) (310 amostras)	Geral (30,3%) *Giardia* (15,2%)	SP	Presença de protozoários não patogênicos de origem fecal humana. Consumo de água mineral se mostrou como fator de proteção às infecções por enteroparasitas.
Martins (2010)	População Geral (43 amostras) Variabilidade genotípica da espécie *Giardia duodenalis*	*Assemblage* A: 34,8% *Assemblage* B: 53,5% Infecção mista: 11,6%	SP	Participação de genótipos zoonóticos é relevante na epidemiologia da Giardíase no litoral do Estado de São Paulo.
Cardoso (2011)	Pacientes HIV/AIDS positivos (500 amostras)	*Giardia* (3,5%) *Cryptosporidium* (0,28%)	SP	Diarreia esteve significativamente associada à Giardíase. Terapia anti-retroviral melhorou a qualidade de vida dos pacientes devido à reconstituição do sistema imune e ação direta na prevenção de doenças oportunistas.

Quadro 1.1 (Continuação) – Estudos de prevalência de enteroparasitas (geral) e de *Giardia* e *Cryptosporidium* em grupos populacionais de diferentes idades e de diferentes localidades do Brasil.

Carvalho (2011)	2.085 Crianças indígenas (até 12 anos)	Geral (50,5%) Giardia (18,4%)	MG	Baixa prevalência de helmintos (7,6%). Porém, elevada prevalência de protozoários nas amostras de fezes. Poliparasitismo em 39,7%, indicando condições sanitárias inadequadas.
Girotto (2011)	Idosos (acima de 60 anos) (293 amostras) Profissionais (63 amostras) Manipuladores de alimento (19)	Idosos: Geral (9,5%); *Giardia* (3,4%); *Cryptosporidium* (1,0%) Profissionais: Geral (17,4%); *Giardia* (1,6%) Manipuladores de alimento: *Giardia* (5,2%)	MG	Instituições de Longa Permanência são propícias à presença de protozoários patogênicos devido ao contato entre idosos, enfermeiros, técnicos de enfermagem e manipuladores de alimento. Risco 15 vezes maior de adquirir Giardíase quando o indivíduo possui contato com animal doméstico.
Oliveira (2011b)	Crianças até 12 anos (antes e após implementação de intervenções sanitárias)	Antes: Geral (84%) *Giardia* (22,1%) Após: Geral (25%) *Giardia* (4%)	CE	Poliparasitismo era de 77% e caiu para 8% após as intervenções sanitárias na comunidade. Melhorias no tratamento e abastecimento de água e destino adequado dos dejetos, entre outras, foram importantes para diminuir a exposição das crianças aos enteroparasitas.
Ribeiro (2011a)	617 trabalhadores cortadores de cana	Geral (30,5%) *Giardia* (3,4%) *Cryptosporidium* (3,2%)	SP	Prevalência de monoparasitismo em 23,8% e poliparasitismo em 6,7% dos casos.
Ribeiro (2011b)	160 indivíduos (356 amostras)	Geral (71,9%) Giardia (6,5%)	ES	Avaliação de 6 técnicas para diagnóstico de *Giardia* e *Cryptosporidium*. Os kits de detecção de coproantígenos para diagnóstico de *Giardia* e *Cryptosporidium* foram os de melhor sensibilidade

Quadro 1.1 (Continuação) – Estudos de prevalência de enteroparasitas (geral) e de *Giardia* e *Cryptosporidium* em grupos populacionais de diferentes idades e de diferentes localidades do Brasil.

Fonseca (2012)	664 crianças de até 5 anos	Geral (23,3 a 37,3%) *Giardia* (4,8 a 11,2% - utilizavam água de cisterna) *Giardia* (7,4 a 16,7%) - utilizavam água de outras fontes	MG	Poliparasitismo de 11,3 a 34,7%. Das 246 amostras de água, 95% apresentaram coliformes toais e 66% foram positivas para *E. coli*. As cisternas promoveram efeito protetor às crianças quanto à incidência de protozoários, principalmente *Giardia*.
Oliveira (2012b)	Crianças não doentes e doentes renais crônicas (229 amostras)	Não doentes: Geral (39%) *Giardia* (3,4%) Doentes: Geral (57,7%) *Giardia* (11,5%) *Cryptosporidium* (3,8%)	GO	Parasitos entéricos oportunistas são um risco maior para a população de hemodialisados. Necessidade de implantação de laboratórios especializados para a detecção de agentes infecto-parasitários.
Santos (2012)	Crianças lactentes entre 2 e 11 meses (1.113 amostras)	Geral (11,5%) *Giardia* (0,9%)	SE	Incidência de episódios de diarréia baixa sugerindo o papel da vacinação contra rotavírus como importante medida de prevenção.
Scalia (2012)	Crianças de pré-escola (226 amostras) Caracterização molecular de *Giardia*	*Giardia* (19,9%) Genótipos predominantes diferentes para diferentes cidades analisadas	MG	Relação entre a *Assemblage* B e crianças com diarreia. Nenhuma outra manifestação clínica foi associada às *Assemblages* A e B.
Oliveira (2013)	Usuários do sistema público de saúde	Geral (33,13%) *Giardia* (18,6%) *Giardia* (20,2%), no inverno	RN	Prevalência diretamente proporcional às condições de moradia e renda mensal domiciliar.

Nota: Amostras: não foi utilizado o número de indivíduos, pois, em alguns estudos, foram recolhidas mais de uma amostra por indivíduo.
HAART: Terapia anti-retroviral de alta potência.
Geral: Todos os enteroparasitos pesquisados nos respectivos estudos (protozoários, helmintos, bactérias e vírus)
PCR: *polimerase chain reaction* (reação de cadeia de polimerase)

Vale ressaltar que intervenções sanitárias, como melhorias no abastecimento de água, coleta e tratamento de esgoto, destino adequado de resíduos sólidos, entre outras, tem contribuído para promover mudanças profundas nos perfis de prevalência de parasitoses intestinais no país (OLIVEIRA, 2011b; FONSECA, 2012).

Segundo Hinke (2009), o diagnóstico de saúde de uma população descreve a situação presente, e se possível, o que aconteceu no passado, representando um quadro de referências para o futuro. A partir deste diagnóstico, podem-se orientar ações, de modo a atender as maiores necessidades da população quanto à prevenção, controle de doenças e a promoção da saúde.

1.3.2 - Animais

Foram separados 33 estudos nos quais amostras de animais serviram de tema central de pesquisa, como pode ser visualizado no quadro 1.2.

Observam-se muitos dados referentes a animais domésticos de companhia – cães e gatos, principalmente – e animais utilizados para fins comerciais (bovinos, caprinos, ovinos, avestruz, aves domésticas). Nos estudos, amostras de fezes de diversas espécies animais foram positivas para *Giardia* e *Cryptosporidium*, evidenciando seus papéis de parasitismo não específico e potencial zoonótico.

Alguns trabalhos mostram os primeiros relatos de genótipos de protozoários patogênicos em algumas espécies animais como, por exemplo, Souza (2007) e Furtado (2010) encontraram genótipos de *Cryptosporidium* para avestruz e onça pintada.

Pode-se destacar, de acordo com Balassiano (2007), uma lacuna de estudos a ser preenchida no que se refere ao controle e tratamento das infecções provocadas por estes protozoários patogênicos, com a finalidade de diminuir prejuízos econômicos em criações de animais comerciais.

Pereira (2007) aponta para a necessidade de educação da população para impedir a contaminação ambiental por fezes animais de companhia e reduzir o risco de zoonoses vir a ocorrer.

Diversos autores – Salles (2006), Balassiano (2007), Huber (2007) – salientam a questão de estudos sobre a transmissão zoonótica destes protozoários, principalmente devido à alta prevalência em animais domésticos e comerciais e a proximidade destes com o homem, sendo de grande relevância para a Saúde Pública.

Quadro 1.2 - Estudos de prevalência de enteroparasitas (geral) e de *Giardia* e *Cryptosporidium* em animais.

Referência Bibliográfica	**Animal Estudado**	**Prevalência**	**Local Estudo**	**Observações**
Garcia (1993)	Bovinos até 2 meses (262 amostras)	*Cryptosporidium* (19,5%)	MG	Maior prevalência em bovinos de 16 a 30 dias (24%). Prevalência de helmintos (26,6%).
Beck (2003)	Cães (332 amostras)	*Giardia* (34 %)	RS	Cães em canis apresentaram maior prevalência que cães de rua.
Almeida (2004)	Bovinos (2 amostras), cão (1 amostra), gatos (3 amostras), cavalo (1 amostra), Pombos (6 amostras)	Padronização de técnica de extração de DNA genômico de oocistos de *Cryptosporidium*	SP	A *Nested*-PCR aumento significativamente a positividade de diagnóstico. Ocorrência de pombos infectados com *Cryptosporidium* e *Giardia*.
Alves (2004)	Camundongos	Infecção experimental com oocistos de *Cryptosporidium*	SP	Correlação ente a quantidade de oocistos de *Cryptosporidium* liberada e a patologia intestinal nas 6 linhagens imunodeficientes testadas.
Gurgel (2005)	Chinchila (250 amostras)	Chinchila: *Giardia* (8%). Não encontrou *Cryptosporidium*	RS	Nas chinchilas positivas para *Giardia* não foram evidenciados sinais clínicos nos animais.
Araújo (2006)	Gerbils	Observação de cinética de infecção e desenvolvimento de alterações no intestino delgado, após inoculação com *Giardia*	MG	A dose de trofozoítos inoculados não interferiu no período pré-patente e na cinética de infecção. Não houve relação entre a dose de inoculo e o nº total de cistos eliminados.
Gomes (2006)	Patos (60 amostras) Codornas (60 amostras) Pintos (60 amostras)	*Cryptosporidium*: Patos (78,3%) Codornas (55%) Pintos (86,6%)	RJ	Condições sanitárias precárias nos dois Mercados Municipais avaliados são condicionantes para o aumento de risco de infecção.

Quadro 1.2 (Continuação) - Estudos de prevalência de enteroparasitas (geral) e de *Giardia* e *Cryptosporidium* em animais.

Salles (2006)	Cães (215 amostras)	Geral (56,7%) *Giardia* (2,3%)	RJ	Associação significativa entre a prevalência de infecção por endoparasitas e a higiene do ambiente. Multiparasitismo em 22,3% das amostras.
Thomaz (2006)	Bovinos (123 amostras) Cães (120 amostras) Gatos (106 amostras)	*Cryptosporidium*: Bovinos (17,1,%) Cães (12,5%) Gatos (2,8%)	SP	Análise Genotípica: Gatos (todos *C. felis*); Cães (todos *C. canis*); Bovinos (76% *C. parvum*; 24% *C. bovis*)
Balassiano (2007)	Cães (500 amostras)	Geral (46,4%) *Cryptospororidim* (26,2%) *Giardia* (2,6%)	RJ	Baixa prevalência de *Giardia* pode ser devido ao método utilizado. Cães mais jovens foram significantemente mais infectados
Borges (2007)	Peixe-boi marinho (136 amostras) Peixe-boi amazônico (115 amostras)	Peixe-boi marinho (25%) Peixe-boi amazônico (4,34%)	PE; PA	Em animais em cativeiro, 23,4% das amostras foram positivas para *Cryptosporidium*. Aumento da freqüência de manejo relacionado à maior prevalência de *Cryptosporidium*.
Britto (2007)	Camundongos	Manuntenção experimental *in vitro* e *in vivo* de cepa de *Cryptosporidium* de origem humana	MG	Houve realização do ciclo biológico completo da cepa em células de rim bovino (MDBK) – *in vitro*. Houve a manutenção da cepa de *Cryptosporidium* nos ensaio *in vivo*.
Dias (2007)	Bovinos Caprinos Suínos	Bovinos: *Giardia* (36,4%); *Cryptosporidium* (18%) Caprinos: *Giardia* (7,7%), *Cryptosporidium* (34,6%)	MG	Sub-bacias hidrográficas com maior densidade de animais de exploração são aquelas com maior ocorrência de *Giardia* e *Cryptospordium* na água.
Huber (2007)	Aves de Mercado Municipal Gatos (30 amostras) Bovinos (56 amostras)	*Cryptosporidium*: Gatos (30%); Bovinos (17,9%) *Giardia*: Gatos (60%)	RJ	Identificados por PCR, foram identificadas as seguintes espécies: *C. parvum* (bovinos); *C. meleagridis* (pintos); *C. baileyi* (codornas, patos); *C. felis* (gatos).

Quadro 1.2 (Continuação) - Estudos de prevalência de enteroparasitas (geral) e de *Giardia* e *Cryptosporidium* em animais.

Pereira (2007)	Cães e Gatos (81 amostras)	Geral (92,6%) *Cryptosporidium* (7,4%)	RJ	Multiparasitismo em 34,6% das amostras. 28% das praças públicas estavam contaminadas com parasitos.
Recuero (2007)	Bovinos até 12 meses (148 amostras)	*Giardia* (23,6%)	RS	70% das propriedades. Prevalência de *Giardia* decrescente não linear à medida que a idade aumentava.
Souza (2007)	Gatos, Cães, Bugios, Cachorro do mato, Onça pintada, Bovinos, Chinchilas e Avestruz	Padronização de PCR; caracterizar molecularmente *Giardia* spp. provenientes de amostras de fezes	SP	Gatos: *Assemblages* F e A (genótipo A I); Cães: *Assemblages* D e C; Bugios: *Assemblage* B (genótipo B IV); Cachorro do mato: *Assemblages* D e C; Onça pintada: *Assemblage* A (genótipo A I); Bovinos: *Assemblages* E e A (genótipo A I); Chichilas: *Asssemblage* B (genótipo B IV); Avestruz: *Assemblage* B (genótipo B IV)
Tembue (2007)	Ovinos (81 amostras)	*Cryptosporidium* (3,7%)	PE	2 a 400 oocistos por grama de fezes
Amorim (2008)	Gerbils	Perfil de eliminação e cinética de resposta imune, após inoculação com *Giardia*	MG	Doses pequenas de 10 a 100 trofozoítos foram capazes de induzir infecção. Gerbils, em fase adulta, desenvolveram forte imunidade à reinfecção
Gonçalves (2008b)	Suínos (80 amostras)	*Cryptosporidium* (46,3%)	RJ	Animais criados extensivamente.
Lippke (2008)	Suínos (276 amostras)	*Cryptosporidium* Leitões (2,9%)	RS	21,4% das unidades produtoras de leitões apresentaram leitões com *Cryptosporidium*
Nakamura (2008)	Aves domésticas (463 amostras) Aves exóticas (27 amostras)	*Cryptosporidium*: Aves domésticas (10,32%) Aves exóticas (7,41%)	SP; PR; GO	A microscopia foi mais sensível para detecção de *Cryptosporidium* que a PCR. Identificadas três espécies: *C. baileyi*, *C. meleagridis* e *C. galli.*
Fagundes (2009)	Avestruzes (264 amostras)	Geral (96,9%) *Cryptosporidium* (5,7%)	RJ	Quando houve multiparasitismo, o *Cryptosporidium* estava presente em 19,3% das associações.

Quadro 1.2 (Continuação) - Estudos de prevalência de enteroparasitas (geral) e de *Giardia* e *Cryptosporidium* em animais.

Ferreira (2009)	Bovinos (87 amostras)	*Cryptosporidium* (9,2%)	MG	25% das propriedades positivas. Instalações e condições de higiene inadequados foram fatores predisponentes para enfermidades em bezerros
Funada (2009)	Bovinos	Desempenho de métodos de extração de DNA	SP	Método de extração de DNA por excistação e purificação com fenol-clorofórmio possibilitou a detecção de até 1 oocisto pela *Nested*-PCR.
Presotto (2009)	Cães (300 amostras, sendo 250 de fezes e 50 de necropsia)	Fezes: Geral (87,2%) *Giardia* (20%) Necropsia: Geral (100%)	SP	Cães errantes. 27,2 % multiparasitismo (protozoários e helmintos)
Sevá (2009)	Aves silvestres (474 amostras) Bovinos (197 amostras) Cães (27 amostras) Sagüis (141 amostras)	*Cryptosporidium*: Aves silvestres (8,64%) Bovinos (4,57%) Cães (11,1%) Sagüis (9,2%)	SP	Análise genotípica: Aves silvestres (*C. baileyi; C. galli*); Bovinos (*C. andersoni*); Cães (*C. canis*); Saguís (*C. parvum*).
Silva (2009)	Ovinos (456 amostras)	*Cryptosporidium* (7,4% dos animais) *Giardia* (22,2% dos animais)	RN	27 cordeiros acompanhados do nascimento até o 3º mês de idade.
Soleiro (2009)	Avestruzes (195 amostras)	*Cryptosporidium* (87,2%)	RJ	Nenhuma ave apresentou sinal clínico da doença.
Furtado (2010)	Onça-pintada, bovinos, cães e gatos domésticos	Onça-pintada: 1º relato de *Giardia* e *Cryptosporidium* .	MS, GO e AM	A fragmentação de habitats e o aumento da proximidade entre humanos, animais domésticos e silvestres podem ser responsáveis pelo aparecimento de doenças emergentes, disseminação de patógenos e alterações nos padrões epidemiológicos das doenças.

Quadro 1.2 (Continuação) - Estudos de prevalência de enteroparasitas (geral) e de *Giardia* e *Cryptosporidium* em animais.

Rondon (2010)	Mamíferos de pequeno e médio portes	Parasitas entéricos em 67,6% e 74,2 % das amostras nos dois locais pesquisados *Giardia*: 0,9%	SP	Elevada positividade para helmintos. Maioria dos animais apresentou mais parasitas na estação úmida.
Silva (2010b)	Cães: sem proprietários (235 amostras) Com proprietários (219 amostras)	*Giardia* (18,5%) *Cryptosporidium* (6,34%)	RS	Diferença significativa para cães com e sem proprietários (apenas para *Cryptosporidium*). Cães com menos de 1 ano apresentaram maiores prevalência. Associação positiva entre a condição higiênica dos domicílios com a presença de *Giardia*
Dias (2012)	AQRM em cenários de irrigação de pastagens destinadas à alimentação de animais de produção	Concentrações de *Cryptosporidium* utilizadas em alguns dos cenários	MG	Necessidade de definição de riscos aceitáveis para animais, uma vez que a dinâmica de patógenos em rebanhos pode diferir da observada em humanos.

Nota: PCR: *Polimerase Chain Reaction* - reação em cadeira pela polimerase.
MBDK: células Madin-Darby de rim bovino.
AQRM: Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico

Dificuldade relatada nestes estudos é a ausência de padronização de métodos para detecção de protozoários em fezes de animais, vindo a dificultar a realização de comparações entre trabalhos científicos.

1.3.3 - Água e Tratamento de Água

Foram classificados 31 trabalhos relacionados ao tema água e tratamento de água, como pode ser visto no quadro 1.3.

Nos trabalhos, pode ser constatada a distribuição dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* nos mais diversos corpos d'água – como rios, córregos, represas, poços, fontes naturais (nascentes), água do mar – e em estações de tratamento de água para abastecimento público. É um cenário que merece atenção das autoridades públicas por consequência da contaminação de águas utilizadas para vários usos: abastecimento público, dessedentação de animais, recreação, irrigação etc.

Alguns fatores que levam à variação quanto à frequência e concentração de (oo) cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* em água, observados na literatura, de acordo com Sales (2006), são: condições do ambiente; metodologia utilizada para análise e a sua eficiência de recuperação de cistos e oocistos nos experimentos controle.

No que se refere à metodologia, nos estudos foram utilizados: concentração por precipitação de carbonato de cálcio; filtração em membrana e com posterior raspagem; método de Faust et al. (1939), método de Sheather (1923); flutuação por gradiente percoll sucrose, entre outros. Alguns estudos utilizaram imunofluorescência direta (IFA - *Immunofluoresce Assay*), outros empregaram coloração com ácido tricromático, Kinyoun modificada, safranina-azul de metileno ou lugol. Apenas seis trabalhos seguiram o Método 1623 que se tornou teste padrão para detecção de cistos em amostras ambientais mais recentemente (USEPA, 2012). Alguns trabalhos utilizaram PCR, outros, ELISA; o que prejudica muito as comparações de resultados.

Quadro 1.3 - Estudos sobre presença *Giardia* e *Cryptosporidium* em corpos d'água e remoção de (oo)cistos no tratamento de água.

Referência Bibliográfica	**Local Estudo**	**Característica da Água**	**Concentração de (oo)cistos**	**Observações**
Muller (1999)	SP	Mananciais superficiais e de ETA	*Cryptosporidium*: Água bruta (até 236 oocistos/L) Água tratada da ETA: (até 1,2 oocistos/L)	Baixa correlação da turbidez, coliformes totais e *E. coli* com *Cryptosporidium*. Correlação significativa da remoção de turbidez com remoção de *Cryptosporidium*
Farias (2000)	SP	Córrego urbano	*Cryptosporidium* (até 1400 oocistos/L) (100% das amostras positivas)	Circulação de água contaminada. Risco para a Saúde Pública.
Berino (2004)	RS	Quatro mananciais superficiais	*Giardia*: até 605 cistos/100L *Cryptosporidium*: até 400 oocistos/100L	Não houve correlação entre coliformes totais e *E. coli* com *Giardia* e *Cryptosporidium*. Correlação da turbidez com *Cryptosporidium* em um manancial.
Cantusio Neto (2004)	SP	Manancial superficial e em ETA	Água Bruta: *Giardia* (média de 32,8 cistos/L – amostra pontual) (média 35,8 cistos/L – amostragem composta - 3 dias consecutivos) *Cryptosporidium*: não detectado Na ETA: protozoários não detectados	Na amostragem pontual de água bruta, 90% da amostras foram positivas; na composta, 100%. Não houve correlação entre *Giardia* e coliformes totais, coliformes termotolerantes, turbidez, pluviosidade.
Oliveira (2004)	MG	Manancial superficial	*Giardia* (até 30 cistos/L) *Cryptosporidium* (até 20,02 oocistos/L)	Ocorrência de protozoários não apresentou correlação com turbidez ou a pluviosidade
Oliveira (2005)	SP	Manancial superficial antes e após encontro com manancial contaminado por esgoto doméstico.	Antes: *Giardia* (16 a 36 cistos/L) Ausência de *Cryptosporidium* Após: *Giardia* (14 a 240 cistos/L) *Cryptosporidium* (0,8 oocistos/L)	Não houve correlação entre cistos e coliformes totais e fecais. Presença e concentração de cistos não apresentaram sazonalidade.
Branco (2006)	SP	Fontes naturais	*Giardia* (0,07 a 0,1 cistos/L) *Cryptosporidium* (0,1 a 0,3 oocistos/L)	25% das fontes naturais estavam contaminadas.

Quadro 1.3 (Continuação) - Estudos sobre presença *Giardia* e *Cryptosporidium* em corpos d'água e remoção de (oo)cistos no tratamento de água.

Costa (2006)	RS	Mananciais superficiais	*Cryptosporidium* presente em 4,2% das amostras analisadas. *Giardia* não foi detectada	As condições da água do entorno da cidade denotam uma forte possibilidade de contaminação fecal
Fagundes (2006)	DF	Tratamento por filtração direta descendente (ETA)	Remoção de oocistos de *Cryptosporidium* geralmente inferior a 2,0 log.	Remoção esteve relacionada às condições de coagulação empregada. Diferença entre as remoções de oocistos, *E. coli* e coliformes totais.
Faria (2006)	SP	12 fontes naturais (bicas) utilizadas para abastecimento pela população	Não encontrou nenhum dos protozoários.	Somente 58% das amostras foram consideradas potáveis ao analisar os padrões bacteriológicos e físico-químicos.
Sales (2006)	PE	Manancial superficial e da ETA	*Giardia* (66,7 a 133,2 cistos/L) *Cryptosporidium* (47,6 ± 24,5 oocistos/L)	Turbidez demonstrou ser indicativa da presença de *Cryptospordium*, mas não os coliformes termotolerantes.
Dias (2007)	MG	Mananciais superficiais urbanos. Mananciais rurais subterrâneos e superficiais	Urbanos: *Giardia* (20,2 a 65,8 cistos/L) *Cryptosporidium* (15,3 a 28,5 ooscitos/L) Rurais: Subterrâneos: *Giardia* (71% das amostras); *Cryptosporidium* (54,8%) Superficiais: *Giardia* (62,5% das amostras); *Cryptosporidium* (75%)	Mananciais da propriedades são utilizados para dessedentação de animais. Limitação do grupo coliforme para testar a ausência de protozoários na água e aponta a adequação de bactérias anaeróbias e *Clostridium perfringens* como possíveis indicadores da presença de protozoários.
Falchi (2007)	RS	Água de Laguna	*Cryptosporidium* (16,7% dos pontos examinados)	Também encontrados outros protozoários como: *Acanthamoeba* e *Naegleria*.
Fernandes (2007)	DF	ETA com filtração direta descendente com dupla camada filtrante	*Cryptosporidium*: 1,2 a 3,2 log de remoção. Período de amadurecimento do filtro: 0,1 a 1 log de remoção	Mesmo com turbidez menor que 0,2 uT, foram encontrados oocistos na água filtrada.

Quadro 1.3 (Continuação) - Estudos sobre presença *Giardia* e *Cryptosporidium* em corpos d'água e remoção de (oo)cistos no tratamento de água.

Freitas (2007)	MG	Água de lavagem de Filtros (ETA) Água Bruta (manancial superficial)	Água Bruta: *Giardia* (2,55 ± 14,4 cistos/L) *Cryptosporidium* (1,6 ± 15,9 oocistos/L) Água de Lavagem de Filtro: *Giardia* (1,1 ± 66 cistos/L) *Cryptosporidium* (7,28 ± 44,2 oocistos/L)	A água de lavagem de filtro pode ser vista como a introdução de perigo na ETA. Turbidez não apresentou associação com presença de (oo)cistos.
Araújo (2008)	SP	Mananciais superficiais de abastecimento e recreacional	*Cryptosporidium* (30% da amostras)	Encontradas as espécies: *C. hominis*, *C. andersoni*; *C. meleagridis*.
Cantusio Neto (2008)	SP	Manancial superficial	*Giardia*: cistos em 93,7% das amostras *Cryptosporidium*: oocistos em 75% das amostras	Comparação de metodologias: Filtração em membrana e floculação com carbonato de cálcio, com e sem IMS.
Cerqueira (2008)	MG	ETA ciclo completo; dupla filtração e filtração direta descendente	Remoções de *Cryptosporidium* semelhante pelas três técnicas (aproximadamente 2,7 log)	Não foram observadas associações entre a remoção de oocistos, microesferas e esporos aeróbios.
Leal (2008)	SP	Manancial superficial e água do mar	Rio: *Giardia* (30,7 a 184,6 cistos/L) *Cryptosporidium* (até 76,9 oocistos/L) Mar: *Giardia* (50 a 95 cistos/L) *Cryptosporidium* (45 a 180 oocistos/L)	Correlação apenas entre o nº de cistos e coliformes termotolerantes. Altos índices de contaminação fecal por bactérias indicadoras nas águas do mar e rio.
Lopes (2008)	MG	Água de ETA	*Cryptosporidium*: média 0,65 log de remoção na decantação. Média de 0,85 log de remoção na filtração rápida.	Remoção de oocistos influenciada pela turbidez da água, período de amadurecimento do filtro, coagulação e pela concentração inicial de oocistos.
Ramos (2008)	RJ	Manancial superficial e reservatórios de distribuição	Encontrado *Cryptosporidium*. *Giardia* ausente.	Falta de sensibilidade do método utilizado foi apontada como resposta a não detecção de *Giardia*. Água consumida pela população é imprópria.

Quadro 1.3 (Continuação) - Estudos sobre presença *Giardia* e *Cryptosporidium* em corpos d'água e remoção de (oo)cistos no tratamento de água.

Silva (2008)	MG	Decantador de alta taxa e convencional (ETA)	Remoção de 1 a 2 log de *Cryptosporidium* para ambos decantadores	Remoção de oocistos semelhante para os diferentes coagulantes utilizados. Remoção de oocistos foi maior que os indicadores.
Careli (2009)	MG	Água de córregos para irrigação de hortaliças	*Giardia* (10,3 a 31,7 cistos/L) *Cryptosporidium* (6,3 a 22,3 oocistos/L)	Maior nº de (oo)cistos na época chuvosa. Correlação entre protozoários, turbidez e *Clostridium perfringens*
Fernandes (2009)	SP	Manancial superficial, de poço e nascente	40% das amostras positivas para *Giardia*.	Uso de PCR, observação do *Assemblage* A (genótipo A II)
Lopes (2009)	MG	Represa e córregos tributários	Represa: *Giardia* (até 8 cistos/L) *Cryptosporidium* (até 4 oocistos/L) Córregos tributários: *Giardia* (até 82,1 cistos/L) *Cryptosporidium* (até 30 oocistos/L)	Represa se comporta como barreira sanitária ao reduzir a quantidade de (oo)cistos provenientes de seus tributários. Turbidez e *E. coli* se mostraram pobres como indicadores da ocorrência de protozoários
Nascimento (2009)	DF	ETA com filtração direta ascendente	*Cryptosporidium*: 3,0 a 3,5 log de remoção na filtração	Não houver correlação entre oocistos e turbidez, coliformes totais, *E. coli* e contagem de partículas na água filtrada.
Andrade (2010)	MG	ETA piloto/Desinfecção com ClO_2	*Cryptosporidium*: 1 a 4,0 log de inativação em diferentes concentrações de tempos de contato do desinfetante.	Estudo de formação de subprodutos da desinfecção com ClO_2 e de manutenção de residual na rede de distribuição.
Fagnani (2010)	SP	Água preparada em laboratório/Processo Oxidativo Avançado	Inoculação de 10^3 cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. Classificação do dano morfológico para verificar a eficiência da desinfecção	POA foi mais agressivo e eficiente para redução de oocistos de *Cryptosporidium* que para cistos de *Giardia*.
Yamashiro (2010)	SP	Represa eutrofizada	*Giardia:* até 224 cistos/L *Cryptosporidium*: até 170 cistos/L	Detecção de protozoários coincidiu com a ocorrência de chuvas. Em apenas um dos quatro pontos pesquisados houve correlação entre *Giardia* e *E. coli* e coliformes totais.

Quadro 1.3 (Continuação) - Estudos sobre presença *Giardia* e *Cryptosporidium* em corpos d'água e remoção de (oo)cistos no tratamento de água.

Barros Júnior (2011)	SP	Manancial superficial (água superficial e interface sedimento - água)	Interface sedimento-água: *Giardia*: até 160 cistos/L *Cryptoporidium*: até 130 oocistos/L Água superficial Giardia: até 162 cistos/L Cryptosporidium: até 16 oocistos/L	Diferença estatística entre as concentrações de cistos de *Giardia* encontradas antes e após o lançamento de efluentes no curso d´água.
Oliveira (2011a)	RS	Água de torneira de 120 escolas	*Giardia:* 0,83% das amostras Cryptosporidium - 1,7% das amostras	8,3; 17 e 39% das amostras apresentaram, *E. coli*, coliformes totais e bactérias heterotróficas , respectivamente. 33% das escolas avaliadas apresentaram alto risco sanitário.

Nota: ETA: Estação de Tratamento de Água.
IMS: *Immunemagnetic Separation* (separação imunomagnética)
Log de remoção: 1 log equivale a 90%; 2 log – 99%; 3 log – 99,9% e assim, sucessivamente.
PCR: *Polimeras Chain Reaction* (reação em cadeia pela polimerase)
POA: Processos Oxidativos Avançados
uT: Unidades de Turbidez

Pode-se verificar relação entre as concentrações de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* com a qualidade da água do local estudado, principalmente ao receber efluentes domésticos (OLIVEIRA, 2005; LEAL, 2008; BARROS JÚNIOR, 2011). De acordo com Plutzer et al. (2010), vinte de aproximadamente 45 países europeus já publicaram artigos científicos referentes a relatos de prevalência de *Giardia* em humanos e em amostras de água e 15 países tiveram fontes de água contaminadas por este protozoário. Ainda segundo os autores, em áreas onde a *Giardia* possui altas concentrações no ambiente é de extrema importância um programa de monitoramento.

Com relação ao tratamento de água, em um dos trabalhos foram detectados oocistos em água filtrada de ETA, tipo convencional de ciclo completo (Muller, 1999). Além disso, Lopes (2008) relata observações sobre tendências gerais em ETA de ciclo completo: capacidade das etapas de decantação e filtração de homogeneizar variações da qualidade da água afluente, produzindo água com concentração de oocistos comparativamente mais baixa e de forma mais estável; remoção consistente de oocistos nas etapas sequenciais de decantação e filtração. Fagundes (2006), Fernandes (2008) e Nascimento (2009) alertam para o período vulnerável para baixas remoções, e consequente transpasse de oocistos quando o filtro está em fase de amadurecimento. Segundo Plutzer et al. (2010), próximo de 90% dos surtos por protozoários reportados na Europa foram devido à deficiência na filtração.

Apenas um trabalho, Andrade (2010), versou sobre desinfecção, com a utilização de dióxido de cloro. Outro ponto muito discutido é relacionado aos indicadores tradicionalmente utilizados que na maioria dos estudos não apresentaram correlação significativa com a presença, concentração e remoção de protozoários.

1.3.4 - Esgoto e Tratamento de Esgoto

Onze trabalhos abordaram o tema, como pode ser visualizado no quadro 1.4. Os trabalhos, além de relatarem a concentração de *Giardia* e *Cryptosporidium* presentes, também ressaltaram outros pontos relevantes, entre eles: o esgoto hospitalar que é extremamente infectante, com presença de patógenos e resíduos de fármacos, ainda com pouco estudo sobre o seu tratamento. Verifica-se novamente a falta de metodologia adequada para esse tipo de efluente, sendo os existentes adaptados da parasitologia clínica ou dos utilizados para água (FRANÇA, 2007).

Na questão do tratamento de esgoto doméstico, há uma convergência de ideias de que os tratamentos de esgoto em nível secundário e até mesmo terciário não são capazes de garantir um efluente seguro para futuros reúsos, sendo imprescindível a desinfecção (TOSETTO, 2005; MEDEIROS, 2010; OLIVEIRA, 2012a).

Ao mesmo tempo, há risco de uso do lodo de esgoto em aplicação no solo, pois segundo Bonatti (2007), *Giardia* e *Cryptosporidium* se apresentavam viáveis mesmo após 45 dias de exposição à luz solar. Além disso, a mesma autora relata que bactérias indicadoras tradicionais são inadequadas como os únicos indicadores para garantir segurança da disposição do lodo, devido à grande resistência dos protozoários aos processos de inativação.

Segundo Fernandes (2009), por não se conhecer as espécies ou genótipos de *Giardia* circulantes no esgoto no Brasil, não é possível saber se tais cistos são pertencentes aos genótipos associados à giardíase em humanos.

Quadro 1.4 - Estudos sobre presença *Giardia* e *Cryptosporidium* em esgoto bruto e tratado e remoção de (oo)cistos em estações de tratamento de esgoto.

Referência Bibliográfica	**Local Estudo**	**Característica do Esgoto**	**Concentração (oo)cistos**	**Observações**
Guilherme (1998)	SP	Lodo de ETE	*Giardia* e *Cryptosporidium* não detectados	A aplicação de lodo no solo pode expor o homem a uma fonte de contaminação
Farias (2000)	SP	Esgoto bruto	*Cryptosporidium*: até 1200 oocistos/L	100% das amostras positivas para *Cryptosporidium*.
Tosetto (2005)	SP	Efluente de tratamento secundário e terciário (filtração direta descendente)	Efluente 2º :*Giardia* (média de 620 cistos/L); *Cryptosporidium* (50 oocisto/L) Efluente filtrado: *Giardia* (25 a 430 cistos/L)	Remoção média de *Cryptosporidium* de 100% e de *Giardia* (80,9%). Importância de etapa de desinfecção para posterior reúso.
Bonatti (2007)	SP	Lodo de ETE	*Giardia*: 600 cistos/grama *Cryptosporidium*: até 4800 oocistos/grama	Cistos podem permanecer "viáveis" por até 45 dias de exposição à luz solar – implicações para uso no solo
Dias (2007)	MG	Efluentes de ETEs e Suinocultura	Efluente de ETE: *Giardia*: 3750 a 39035 cistos/L *Cryptosporidium*: 480 a 100 oocistos/L Suinocultura: *Giardia* (86 a 1320 cistos/L) *Cryptosporidim* (660 a 900 oocistos/L)	Baixa eficiência da ETE (tanque séptico seguido de filtro anaeróbio)
França (2007)	SP	Efluente Hospitalar Efluente desinfetado por tratamento fotoeletroquímico	*Giardia* (58,4% das amostras - média de $6,5 \times 10^5$ cistos/L) *Cryptosporidium* (4,1% das amostras – média de $6,6 \times 10^4$ oocistos/L)	Tratamento fotoeletroquímico obteve 96,3%de remoção de *Cryptosporidium* e 55,3% de *Giardia*.

Quadro 1.4 (Continuação) - Estudos sobre presença *Giardia* e *Cryptosporidium* em esgoto bruto e tratado e remoção de (oo)cistos em estações de tratamento de esgoto.

Santos (2007)	SP	Esgoto Bruto Efluente tratado e desinfetado	Esgoto Bruto: *Giardia* (média 10^5cistos/L); *Cryptosporidium* (média 6,0 x 10^4 oocistos/L) Efluente Tratado: *Giardia* (média 1,1 x 10^3 oocistos/L) *Cryptosporidium* (média 1,6 x 10^2 oocistos/L)	Reator de luz UV não foi capaz de inativar totalmente os cistos de *Giardia*, por ensaio de infectividade *in vivo*
Fernandes (2009)	SP	Esgoto bruto e tratado	*Giardia*: *Assemblage* B detectado em esgoto bruto. *Assemblage* A (genótipo A II) detectado em esgoto bruto e tratado	Necessidade de atenção ao tratamento de esgoto, devidos a suas inúmeras reutilizações.
Medeiros (2010)	SP	Esgoto Tratado (UASB) Efluente desinfetado com cloro, ozônio e radiação ultravioleta	*Giardia*: 710 a 2100 cistos/L *Cryptosporidium*: 89 a 430 oocistos/L	Diminuição de viabilidade de, no máximo, 0,23 log para desinfecção seqüencial (cloro – radiação ultravioleta)
Tonani (2011)	SP	Esgoto bruto e tratado (lodos ativados)	Esgoto Bruto: *Giardia* (de 120 a 2200 cistos/L); *Cryptosporidium* (até 28,9 oocistos/L) *Esgoto Tratado*: *Giardia* (0,45 a 3,5 cistos/L); *Cryptosporidium* (até 1,05 oocistos/L)	Encontrou também vírus - Rotavírus e Adenovírus - em 100% das amostras de esgoto bruto e tratado. Não houve correlação entre as concentrações de protozoários e das de coliformes termotolerantes e totais.

Quadro 1.4 (Continuação) - Estudos sobre presença *Giardia* e *Cryptosporidium* em esgoto bruto e tratado e remoção de (oo)cistos em estações de tratamento de esgoto.

Oliveira (2012a)	SP	Esgoto bruto e tratado (UASB, Lodos ativados, processos físico-químicos)	Esgoto Bruto: *Giardia* (de 9,8 x 10^3 a 1,6 x 10^4 cistos/L); *Cryptosporidium* (até 28,9 oocistos/L) *Esgoto Tratado*: *Giardia* (1,8 x 10^3 cistos/L) *Cryptosporidium* em apenas quatro amostras.	Remoção média de 2 log no reator UASB seguido de Lodos Ativados. No tratamento físico-químico, remoção de mais 1 log, independente do coagulante utilizado: cloreto férrico ou sulfato de alumínio.

Nota: ETE: Estação de Tratamento de Esgoto.

UASB: *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (Reator Anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo)

1.3.5 - Alimentos

Foram seis os trabalhos com pesquisa sobre alimentos, como pode ser observado no quadro 1.5, contemplando a avaliação da presença de (oo)cistos de protozoários.

Observa-se a contaminação de alimentos por *Giardia* e *Cryptosporidium*. Pereira (2010) cita ainda a presença de outros enteropatógenos, como protozoários não patogênicos, que também indicam contaminação de origem fecal. A mesma autora exalta a participação do trabalhador envolvido no cultivo de produtos agrícolas na contaminação de alimentos, principalmente pela falta de higiene. Deve-se atentar que a maioria das hortaliças pesquisadas são consumidas cruas, o que aumenta o risco de infecção.

A utilização de efluente de tratado de Estação de Tratamento de Esgoto na irrigação de alface e rúcula aumentou o número de cistos e oocistos encontrados, além da concentração de metais pesados (RIGAZZI, 2011)

Pereira (2008) relata que boas condições higiênico-sanitárias encontradas em propriedades rurais analisadas contribuíram para a baixa positividade para cistos de *Giardia* e para a negatividade de oocistos de *Cryptosporidium*, em relação às amostras de hortaliças e de água de irrigação.

Quadro 1.5 - Estudos sobre presença *Giardia* e *Cryptosporidium* em alimentos.

Referencia Bibliográfica	**Local Estudo**	**Tipo de Alimento**	**Concentração de (oo)cistos**	**Observações**
Leal (2008)	SP	Ostras	*Giardia*: 50 cistos/animal *Cryptosporidium*: 12 oocistos/animal	8,3% das amostras foram positivas para ambos protozoários.
Pereira (2008)	SP	Alface e Rúcula	*Giardia*: Alface (180 a 230 cistos/50g) Rúcula (180 cistos/50 g) *Cryptosporidium* não foi detectado	*Giardia* presente em 6,6% das amostras de alface e 1,6% das amostras de rúcula.
Careli (2009)	MG	Alface	*Giardia*: 37,9 a 66,8 cistos/100g *Cryptosporidium*: 15,6 a 46,7 oocistos/100g	Apenas uma, das 20 propriedades rurais pesquisadas, obteve amostra positiva para os protozoários.
Pereira (2010)	PB	Alface, tipo crespa	Geral: 85% com algum enteroparasito. *Giardia*: 3% das amostras de supermercado	Mercados e supermercados igualmente com amostras contaminadas.
Costa (2011)	CE	Alface (cultivos convencional, orgânico e hidropônico)	2, 18 e 48 cistos e trofozoítos de protozoários, entre eles *Giardia* spp., contabilizados em amostras cultivadas pelos métodos hidropônico, orgânico e tradicional.	Cultivo tradicional apresentou maior contaminação de origem fecal (coliformes fecais). 20% das amostras hidropônicas apresentaram *Salmonella*. Não houve diferença entre os dois métodos de higienização sugeridos (apenas hipoclorito de cálcio, ou detergente seguido de hipoclorito de cálcio)
Ragazzi (2011)	SP	Alface e Rúcula (das feiras livres ou de irrigação com efluente tratado e clorado de ETE)	Amostras irrigadas com o efluente da ETE: *Giardia* (6 a 15 cistos/ 50 g) *Cryptosporidium* (3 oocistos/ 50 g)	Houve contaminação por *Giardia* e *Cryptosporidium* apenas nas amostras irrigadas com efluente da ETE. A dosagem de 0,1 mg/L de cloro não eliminou agentes patogênicos.

Nota: ETE: Estação de Tratamento de Esgoto

1.3.6 - Outros

Neste tema, estão congregados: 2 trabalhos sobre solo, 4 sobre novas drogas no combate aos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium*, um trabalho sobre software e outro sobre avaliação quantitativa de risco microbiológico, como pode ser visualizado no quadro 1.6.

A preocupação de risco de contaminação de alimentos pelo solo contendo (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* é relatado por Careli (2009). Magalhães (2012) realizou análise quantitativa de risco microbiológico a partir de dados da literatura. Quatro outros estudos foram sobre investigação de drogas no combate a *Giardia*, e nenhum para *Cryptosporidium*, destacando o estudo de Silva (2010a) com a utilização de compostos de efeito giardicida a partir de vegetais.

Quadro 1.6 – Estudos com temas diversos sobre *Giardia* e *Cryptosporidium*.

Referência Bibliográfica	**Local Estudo**	**Tema**	**Resultados**	**Observações**
Col (2003)	SP	Criação de software contendo informações sobre os principais parasitas encontrados em camundongos de laboratório.	Software em CD-ROM. Entre os parasitas: *Giardia muris*, *Cryptosporidium muris* e *Cryptosporidium parvum*	Material didático acessível a alunos de graduação e pós-graduação.
Busatti (2006)	MG	Investigação do potencial giardicida de drogas sintetizadas a partir do metronidazol	O MTZBr e MTZI foram os mais eficientes giardicidas entre os derivados.	Todos os análogos foram mais ativos que o metronidazol.
Nogueira (2007)	RJ	Sintetização de novas drogas de combate protozooses	Inibição proliferativa de 51,7% para *Giardia lamblia* com a diisobutilfosforil – p – nitrofenilidrazona (6b)	A mesma droga também teve efeito inibidor em *Leishmania amazonensis*. Escassez de fármacos aplicáveis ao tratamento de protozooses.
Pereira (2007)	RJ	Fezes de animais em amostras de solo de praças públicas	Não foram encontrados *Giardia* e *Cryptosporidium*	36% do solo analisado de praças públicas estavam contaminados por outros parasitos, neste caso, helmintos.
Teles (2008)	CE	Eficácia terapêutica da *Mentha crispa* para tratamento de pacientes com Giardíase	84% de cura com Secnidazol 47,8% de cura com *Mentha crispa*	Secnidazol foi estatisticamente mais eficiente.
Careli (2009)	MG	Solo utilizado para cultivo de hortaliças	*Giardia* (6,7 a 13,3 cistos/25 g de solo) *Cryptosporidium* (5,3 a 6,4 oocistos/25 g de solo)	Ambos protozoários em maior concentração no período de chuvas.
Silva (2010a)	MG	Pesquisa com vegetais da família *Celastraceae* na busca de novos compostos giardicidas	A espécie *Maytenus gonoclada* apresentou potente atividade contra a *Giardia lamblia* (CI_{50} de 1,16 μg/mL)	Essa mesma espécie vegetal apresentou atividade moderada contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e atividade inseticida.

Quadro 1.6 – Estudos com temas diversos sobre *Giardia* e *Cryptosporidium*.

Magalhães (2012)	MG	Discussão crítica sobre a perspectiva da AQRM à saúde humana da Resolução CONAMA 375/2006. Níveis de contaminação de hortaliças adubadas com lodo de esgoto e biossólidos	Utilizou concentrações de *Giardia* e *Cryptosporidium* para a AQRM a partir de dados da literatura. Dependendo da concentração inicial, estimou baixo risco ao consumidor. E risco ocupacional elevado quando o lodo ou biossólido é aplicado sem qualquer medida de proteção ao trabalhador	Alguns aspectos da CONAMA 375/2006 mereceriam revisão. Começou a analisar oocistos de *Cryptosporidium*, porém após resultados negativos nas amostras de hortaliças e falta de metodologia específica, foi abandonado.

Nota: CI_{50}: Concentração de inibição do crescimento de 50% (no estudo, de trofozoítos de *Giardia lamblia*)

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente.

MTZBr e MTZI: Incialmente o metronidazol é convertido, por reação com cloro de metanossulfonila em piridina anidra, em O-mesilado (MTZMs). Este é convertido em MTZBr e MTZI por reação com brometo de potássio e iodato de potássio, respectivamente, em dimetilformamida, com aquecimento a 60ºC.

AQRM: Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico

1.4 - CONCLUSÃO

Os 122 trabalhos ressaltam algumas lacunas de investigação sobre os protozoários patogênicos *Giardia* e *Cryptosporidium*, como:

- novas drogas para o tratamento dessas doenças;
- metodologias para recuperação de (oo)cistos em água, esgoto, solo, lodo, alimentos que sejam baratas, rápidas e eficientes;
- metodologias para avaliação de (oo)cistos em amostras fecais que também sejam baratas, rápidas e eficientes;
- estudo de desinfetantes capazes de inativar (oo)cistos no tratamento de água e tratamento de esgoto;
- estudos de processos para remoção de (oo)cistos no tratamento de água e tratamento de esgoto;
- utilização da biologia molecular para elucidar os genótipos mais prevalentes desses protozoários no país e, assim, compreender a participação de espécies animais na transmissão de doença ao homem;
- educação sanitária como meio de combate à disseminação de doenças enteropatogênicas;
- a influência de infraestruturas sanitárias na concentração de (oo)cistos encontrada em amostras ambientais e sua repercussão na saúde pública.
- de forma geral, há necessidade de estudos em todos os temas discutidos e a sua ampliação em todas as regiões do Brasil.

Capítulo 2

Métodos para recuperação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em esgoto sanitário

Estudos de protozoários patogênicos *Giardia* e *Cryptosporidium*, em esgoto doméstico, necessitam, indubitavelmente, de métodos cada vez mais precisos de recuperação que possibilitem o avanço de pesquisas relacionadas à inativação, remoção, quantificação, diferenciação de espécies, etc.. Foi com esse intuito que neste capítulo foram avaliadas diferentes metodologias de recuperação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em esgotos bruto e tratado.

2.1 - INTRODUÇÃO

Em países industrializados, *Giardia* e *Cryptosporidium* são os protozoários veiculados pela água que inspiram maior preocupação: por possuírem (oo)cistos infectantes muito resistentes no ambiente, serem suficientemente pequenos para ultrapassar barreiras físicas e químicas impostas no tratamento de água, são excretados em grande quantidade nas fezes, além de a transmissão zoonótica também poder ocorrer (KARANIS et al., 2007).

Segundo Karanis et al. (2007), dos 325 surtos de doenças de veiculação hídrica reportados no mundo devido à protozoários patogênicos, *Giardia* foi responsável por 132 (40,6%) e *Cryptosporidium* por 165 (50,8%) destes surtos. Risebro et al. (2007) relataram que, na Europa, mais da metade dos surtos por veiculação hídrica foram associados aos mesmos protozoários (29 surtos por *Cryptosporidium* e 2 por *Giardia*), entre 1990 e 2005.

Assim, pesquisas para melhorar as técnicas de tratamento de água e esgoto são uma necessidade, bem como o desenvolvimento de métodos rápidos, precisos, de boa reprodutibilidade para detecção e enumeração desses parasitas. (CAREY et al., 2004; JEX et al., 2008). Atualmente, o método 1623.1 (USEPA, 2012) é o método padrão para análises de amostras de água, aplicável para águas superficiais, subterrâneas, água tratada, águas minerais, de piscina e águas recreacionais e se utiliza da filtração seguida de separação imunomagnética (IMS) com posterior etapa de detecção de (oo)cistos por imunofluorescência direta (PLUTZER et al., 2010; USEPA, 2012).

No entanto, de acordo com Bonatti et al. (2007), técnicas desenvolvidas para enumerar (oo)cistos em água, geralmente não são indicadas para amostras de esgoto. Diferenças fundamentais entre água e esgoto, incluindo o número de parasitas, concentração de material particulado e natureza complexa faz com que se procure por técnicas mais específicas (McCUIN; CLANCY, 2005; ROBERTSON et al., 2000).

Ainda não existe método exclusivo para águas residuárias, e em inúmeras pesquisas são utilizados alguns métodos ou modificações a partir dos métodos: floculação em solução de carbonato de cálcio (VERSEY et al., 1993); modificações do método 1622 da USEPA (1999a) para *Cryptosporidium* (McCUIN; CLANCY, 2005); concentração da amostra por filtração (SHEPERD; WYN-JONES, 1995); centrifugação e sem etapa de purificação (ROBERTSON et al., 2000), filtração em membrana (FRANCO et al., 2001), entre outros.

Robertson et al. (2000) e Bonatti et al. (2007) relatam algumas características que métodos devem possuir para recuperação de (oo)cistos: rapidez, simplicidade, baixo custo, bom resultado de recuperação e pouca manipulação da amostra.

Assim, a partir de modificações de Robertson et al. (2000), foi proposta a tripla centrifugação da amostra de esgoto bruto e tratado. Além disso, houve comparação entre este método com outros existentes: filtração em membrana, desenvolvido por Franco et al. (2001), seguida ou não por separação imunomagnética e centrifugação seguida de separação imunomagnética (modificado de McCUIN; CLANCY, 2005).

Por serem facilmente distinguíveis de cistos e oocistos já presentes em amostras de esgoto sanitário, o kit ColorSeed® pode servir como importante ferramenta para testar a performance de um método (McCUIN; CLANCY, 2005). A mudança do filtro da lente do microscópio permite clara diferenciação dos (oo)cistos inoculados os quais são marcados com corante Texas Red, como mostra a figura 2.1.

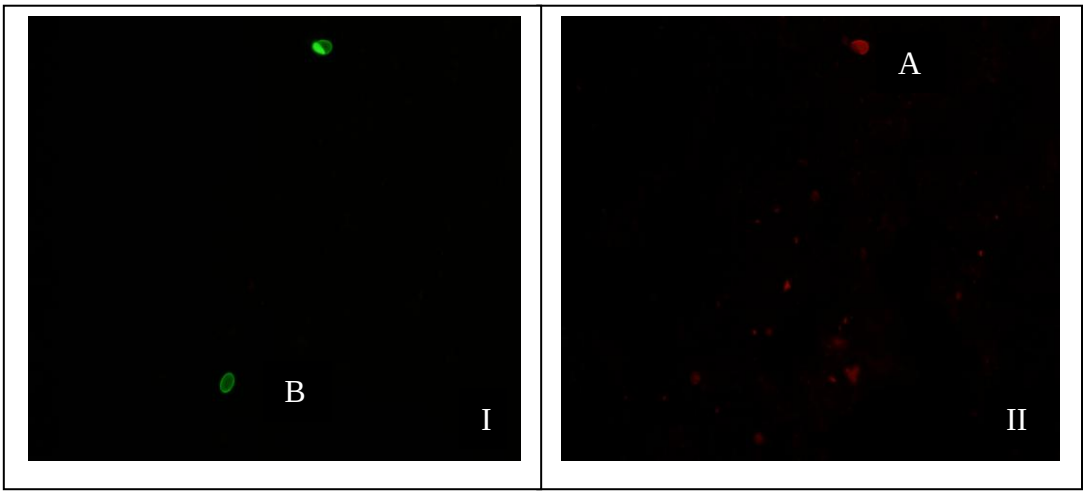


Figura 2.1 - Cistos de *Giardia* (400x) - A: marcado com Texas Red (ColorSeed®); B: da própria amostra de esgoto. I. Filtro para FITC (450-490 nm); II. Filtro verde (510-550 nm).

2.2 - ESQUEMA GERAL DE ESTUDO

Foi avaliada a recuperação de (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* com utilização de kit ColorSeed em esgoto bruto e tratados (pós-tratamento secundário por lodos ativados) através dos seguintes métodos:

- Tripla Centrifugação;
- Centrifugação seguida de separação imunomagnética (IMS);
- Filtração em membrana;

- Filtração em membrana seguida de IMS.

Para melhor visualização, a figura 2.2 representa o esquema geral dos ensaios.

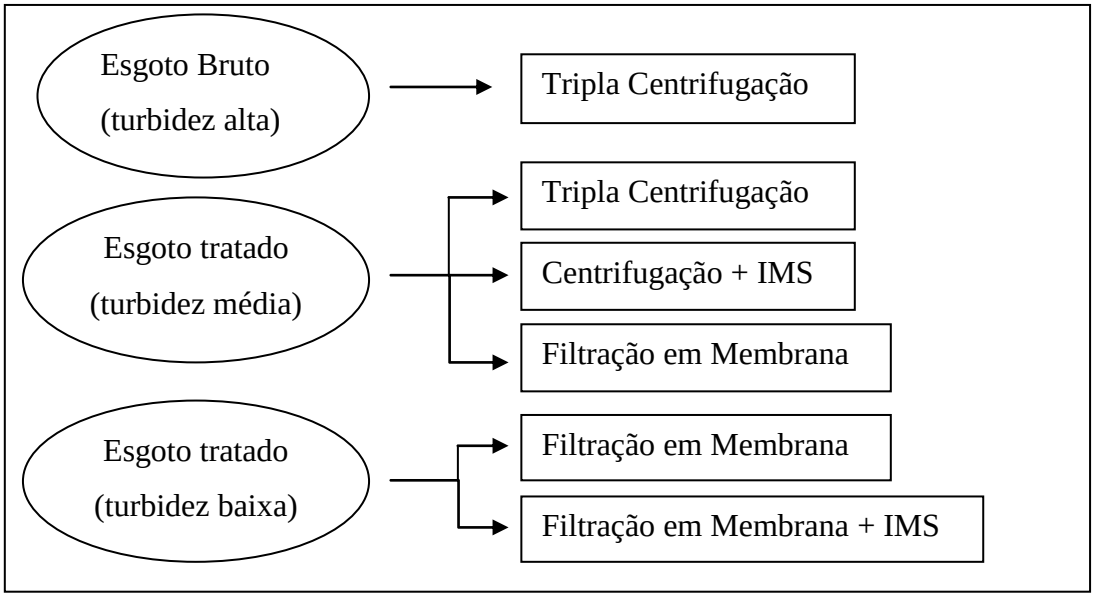


Figura 2.2 - Esquema geral dos ensaios de recuperação de (oo)cistos com Kit ColorSeed®.

Este delineamento experimental foi proposto a fim de:

- 1 - Avaliar a implicação da turbidez na recuperação do método da tripla centrifugação;
- 2 - Comparar a tripla centrifugação com dois métodos bastante utilizados em trabalhos na área (centrifugação com IMS e a filtração em membrana);
- 3 - Avaliar a remoção de cistos de oocistos após a introdução da etapa de IMS após a filtração, em esgoto tratado com turbidez baixa.

2.3 - MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 - Amostragem

As amostras de esgoto para estudo foram provenientes da ETE do campus da USP em São Carlos, Brasil. Ela possui unidade de tratamento preliminar (gradeamento, remoção de areia e de gordura) seguida de reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), o qual possui volume de 18,8 m³ e operado com tempo de detenção hidráulica de 12 horas e, em escala piloto, sistema de tratamento de lodos ativados, que possui volume de 1,2 m³ e foi operado com tempo de residência celular de 20 dias.

As amostras foram coletadas em frascos de 1 litro previamente lavados, desinfetados e enxaguados com solução de eluição – Tween 80 (0,1%; v/v) - e analisadas, no máximo, em 24 horas após coleta.

Primeiramente, todo material que entrou em contato com o esgoto bruto e tratado - por exemplo, proveta, becker, erlenmeyers, tubos de centrifugação, tubos de microcentrifugação, ponteiras - foi enxaguado com solução de eluição. O frasco de coleta era invertido 20 vezes para homogeneização e, caso a amostra apresentasse materiais grosseiros, ela era filtrada previamente aos ensaios por filtro plástico com tamanho de poro de 1,0 mm².

2.3.2 - Ensaios de Recuperação

Para a recuperação dos (oo)cistos utilizando o kit ColorSeed® (ColorSeed, Biotechnology Frontiers Inc., Sydney, Australia), seguiu-se o protocolo do fabricante para inoculação dos (oo)cistos marcados com 99 ± 2,2 de *Cryptosporidium* e 99 ± 1,4 de *Giardia*. Brevemente, consistiu no acréscimo de 2 mL de solução de Tween 20 (0,05%; v/v) no frasco com os (oo)cistos, levá-lo ao vórtex e para depois inocular na amostra. Porém, ao invés de realizar duas lavagens com 3 mL de água, como consta no protocolo do fabricante, optou-se por realizar três lavagens com 2 mL de água, por ser mais fácil a homogeneização.

Após a inoculação do ColorSeed, seguiram-se os diferentes métodos de centrifugação e filtração em membrana, com ou sem a utilização de separação imunomagnética, de acordo, principalmente, com a turbidez da amostra.

2.3.2.1 - Tripla Centrifugação

2.3.2.1.1 - Amostra com turbidez elevada

Para efluentes com turbidez alta, com uma proveta foram retirados 50 mL de amostra que foram colocados em frasco erlenmeyer. Houve acréscimo de 50 mL de solução Tween 80 (0,1%) completando 100 mL. A amostra, então, foi homogeneizada por 3 minutos com ajuda de agitador magnético. Esta e as outras etapas podem ser acompanhadas na figura 2.3.

Em seguida, o volume foi igualmente dividido em dois tubos de centrifugação de 50 mL de capacidade, sendo realizada a primeira centrifugação (Centrifuge 5810, Eppendorf) a 1500 x *g* por 15 minutos.

Decorrido o tempo, o sobrenadante de cada tubo foi retirado, deixando volume final de 5 mL, que foi levado ao vórtex para homogeneização do sedimento formado. O volume de 5 mL dos dois tubos de centrifugação foi concentrado em apenas 1 tubo – agora com 10 mL. O outro tubo, vazio, foi lavado com 2,5 mL de água deionizada, duas vezes - sendo este volume também repassado ao outro tubo de centrifugação, cujo volume total final foi de 15 mL.

Segunda Centrifugação – a 1500 x *g*, por 15 minutos. Nova retirada de sobrenadante, deixando apenas, aproximadamente, 0,5 mL no tubo de centrifugação. Este volume foi levado ao vórtex e repassado por meio de pipeta para tubo de microcentrifugação (1,5 mL de capacidade). O tubo de centrifugação foi lavado com 0,5 mL de água deionizada, sendo este volume também acrescentado ao tubo de microcentrifugação, cujo volume final foi próximo a 1,0 mL.

Terceira Centrifugação – a 1500 x *g*, por 15 minutos. Nova retirada de sobrenadante, deixando apenas 0,5 mL no tubo de microcentrifugação, que foi levado novamente ao vórtex e deixado "overnight" em geladeira – à temperatura de 5 a 10 ºC.

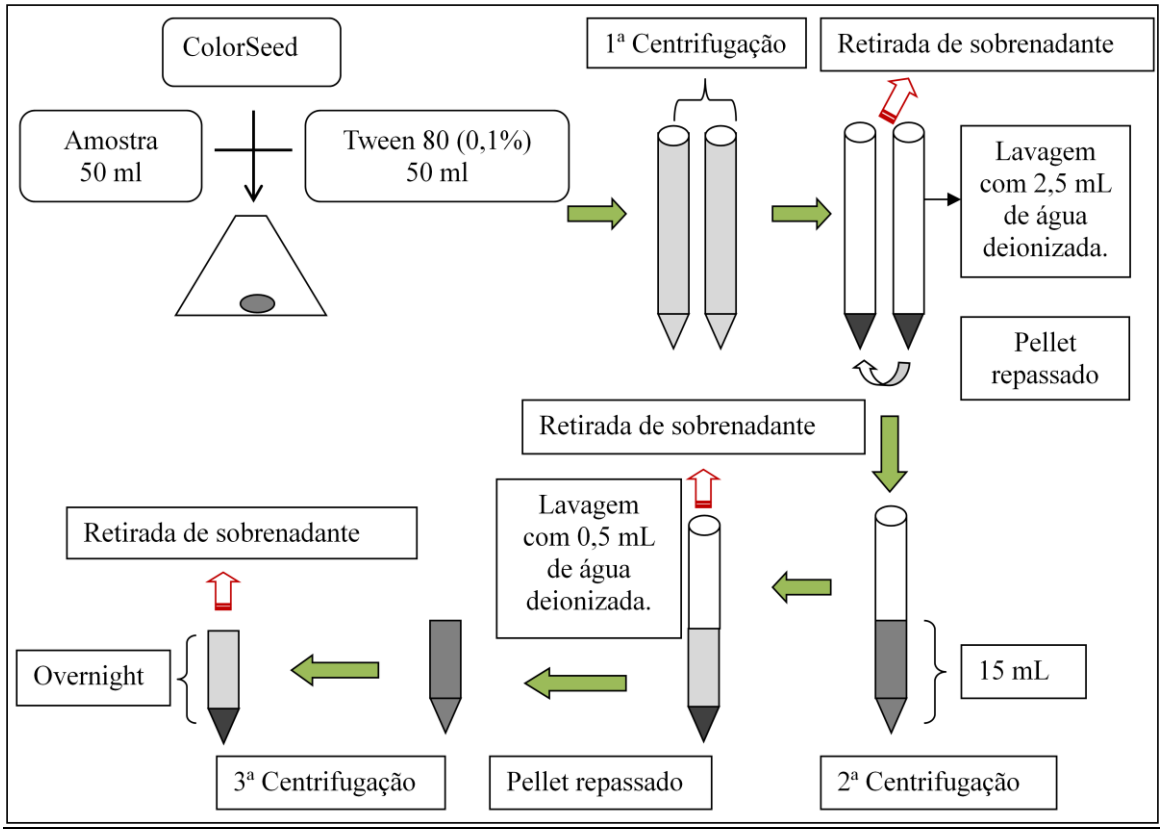


Figura 2.3 - Esquema geral dos ensaios de tripla centrifugação em amostras de turbidez elevada com o uso do Kit ColorSeed®.

2.3.2.1.2 - Amostra com turbidez média

Para efluente com turbidez média, com uma proveta foi coletado um volume maior, de 150 mL de amostra, que foram colocados em frasco erlenmeyer. Foram acrescentados 50 mL de solução Tween 80 (0,1%), num total de 200 mL que foram homogeneizados por 3 minutos com ajuda de agitador magnético. Esta e as outras etapas podem ser acompanhadas na figura 2.4.

Em seguida, este volume foi igualmente dividido em quatro tubos de centrifugação de 50 mL de capacidade, sendo realizada a primeira centrifugação a 1500 x *g* por 15 minutos.

Concluída a centrifugação, o sobrenadante de cada tubo foi retirado, deixando um volume final de aproximadamente 1 mL. Este volume foi levado ao vórtex para homogeneização do pellet formado. O volume de 1 mL de cada um dos quatro tubos de centrifugação foi concentrado em apenas 1 tubo – agora com aproximadamente 4 mL.

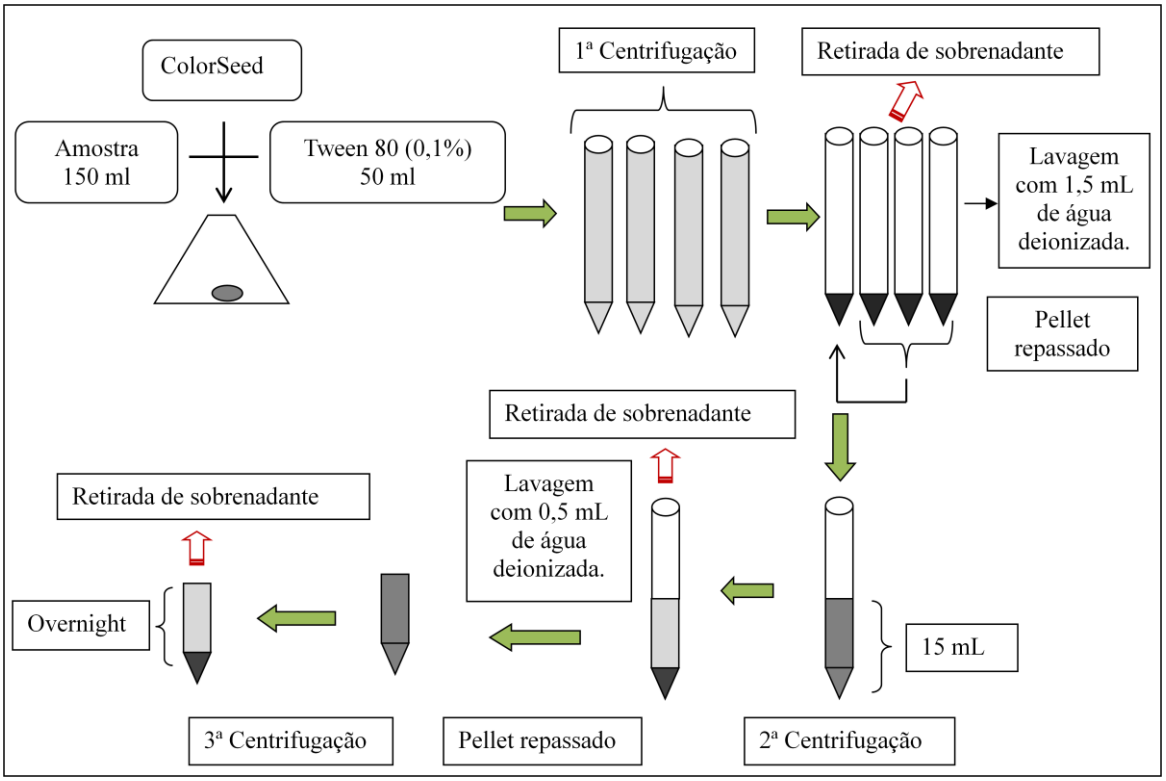


Figura 2.4 - Esquema geral dos ensaios de tripla centrifugação em amostras de turbidez média com o uso do Kit ColorSeed®.

Os outros três tubos, vazios, foram lavados com 1,5 mL de água deionizada, duas vezes - sendo este volume também repassado ao outro tubo de centrifugação que já

se encontrava com 4 mL. Às vezes foi necessário acréscimo de água deionizada para se obter volume final sempre de 15 mL.

A segunda e terceira centrifugações foram realizadas como relatado anteriormente para amostra com turbidez elevada - item 2.3.2.1.1.

2.3.2.2 - Centrifugação seguida de Separação Imunomagnética (IMS)

A separação imunomagnética foi incluída no procedimento de centrifugação com o intuito de melhorar a recuperação de cistos e principalmente, de oocistos, da amostra com turbidez média; sendo um método modificado de McCuin e Clancy (2005). Para isso, 150 mL de efluente e 50 mL de solução Tween 80 (0,1%) foram misturados e homogeneizados. O volume foi igualmente dividido em 4 tubos de centrifugação e centrifugados a 1500 x *g* por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado, deixando 0,5 mL em cada tubo. Esses volumes foram concentrados em um só tubo. Em cada um dos outros três tubos foram realizadas duas lavagens com 0,5 mL de água deionizada, para um volume total de 5 mL, o qual foi levado ao vórtex e deixado em geladeira overnight, entre 5 e 10º C.

Prosseguiu-se com a IMS: primeiramente passando o volume do tubo de centrifugação para o tubo de Leighton (tubo com lado plano). Depois, o tubo de centrifugação foi lavado duas vezes com 2,5 mL de água deionizada e o volume também repassado para o tubo de Leighton. A partir desse momento foi seguido o protocolo do fabricante dos Dynabeads (Dynal CG – Combo anti-*Cryptosporidium* & *Giardia*, Invitrogen Dynal AS, Norway), de acordo com o item 2.3.3.

2.3.2.3 - Filtração em membrana

Este método foi modificado de Franco et al. (2001). Primeiramente, todo o equipamento de filtração foi enxaguado com solução de eluição - Tween 80 (0,1%). A membrana de ésteres mistos de celulose com porosidade de 3 µm (47mm de diâmetro, Millipore) foi colocada no suporte de filtração e preparada com algumas gotas da solução de eluição (aproximadamente 1 mL) em quantidade suficiente para molhá-la. Em seguida, volume de amostra de baixa turbidez, necessário para colmatar a membrana, foi coletado com uma proveta e filtrado por bomba de vácuo (Marconi) com fluxo de 4 L.min-1 e pressão de - 500 mm Hg. Algumas etapas deste ensaio podem ser acompanhadas na figura 2.5.

Terminada a filtração, a membrana foi retirada do suporte de filtração e transferida para placa de Petri com 5 mL de solução de eluição - Tween 80 (0,1%), onde se procedeu à raspagem com alça plástica durante 10 minutos. Em intervalos intermediários de aproximadamente 3 minutos, foi retirado o volume aplicado de 5 mL e realizado enxágue com outros 5 mL de solução de Tween 80 (0,1%) - duas vezes - obtendo-se um volume final de 15 mL, que foi transferido para tubo de centrifugação.

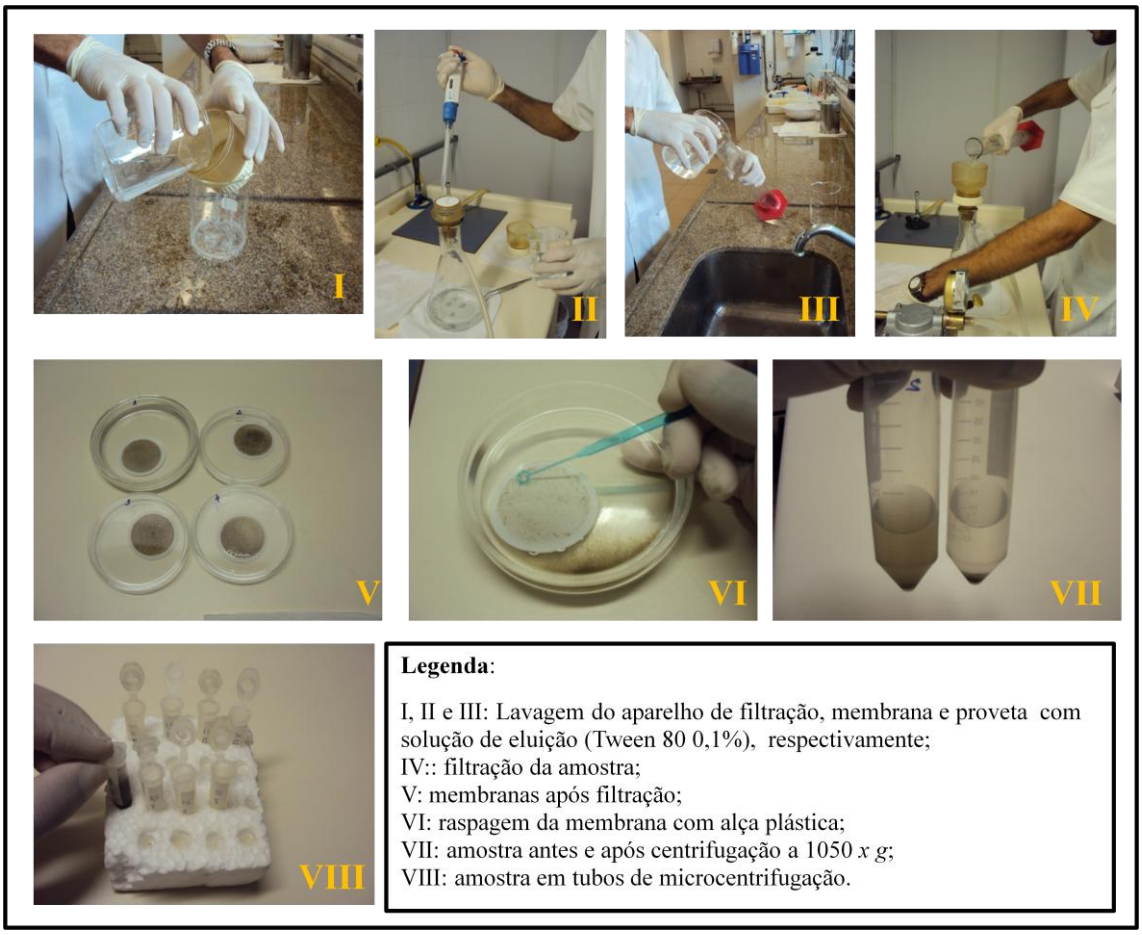


Figura 2.5 - Algumas etapas do ensaio de filtração em membrana em amostras de turbidez média e baixa com o uso do Kit ColorSeed®.

Foi realizada a primeira centrifugação - 1050 x *g* por 10 minutos, com retirada do sobrenadante, deixando os 5 mL restantes no tubo de centrifugação. A amostra foi levada ao vórtex, com acréscimo, logo em seguida, de 10 mL de água deionizada. Após a segunda centrifugação - 1050 x *g* por 10 minutos - foi retirado o sobrenadante deixando apenas 0,5 mL, o qual foi repassado a um tubo de microcentrifugação. Procedeu-se uma lavagem do tubo de centrifugação com 0,5 mL de água deionizada, sendo este volume também transferido ao tubo de microcentrifugação. Houve assim, a

terceira centrifugação, também a 1050 x *g* por 10 minutos e retirada de sobrenadante deixando apenas 0,5 mL no tubo de microcentrifugação. Este volume foi levado ao vórtex e deixado overnight em geladeira – à temperatura de 5 a 10ºC - para, só assim, realizar a etapa de detecção.

Quando foi seguida por IMS, para amostras com turbidez baixa, primeiramente foi repassado o volume do tubo de microcentrifugação para o tubo de Leighton (tubo com lado plano). Depois, o tubo de microcentrifugação foi lavado três vezes com 1,0 mL de água deionizada e o volume também repassado para o tubo de Leighton. Depois foram adicionados mais 6,5 mL ao tubo de Leighton, pois segundo o protocolo do fabricante, são necessários 10 mL de amostra para a fase de IMS. A partir desse momento foi seguido o protocolo do fabricante dos Dynabeads (Dynal CG – Combo anti-*Cryptosporidium* & *Giardia*, Invitrogen Dynal AS, Norway) , de acordo com o item 2.3.3.

2.3.3 - Separação Imunomagnética (IMS - *Immunomagnetic Separation*)

A separação imunomagnética serve para purificar as amostras, capturando cistos e oocistos e os separando de interferentes. Para efetuá-la, foi seguido o procedimento descrito a seguir, também relatado em Medeiros (2010):

- Primeiramente, o Kit de IMS (Invitrogen Dynal AS, Norway) era retirado da geladeira para ficar à temperatura ambiente.
- O volume da etapa anterior, de concentração, seja por centrifugação ou filtração em membrana, foi passado ao vórtex e despejado em um tubo de lado plano (T_{LP}) (Dynal® L10 tubes CAT nº 740.03, Invitrogen Dynal AS, Norway), previamente enxaguado com solução Tween 80 (0,1%).
- Procedeu-se, por conseguinte, uma dupla lavagem no tubo de centrífuga com 2,5 mL de água deionizada, sendo o volume das lavagens repassado ao T_{LP}, como relatado no item 2.3.2.2; ou três lavagens no tubo de microcentrífuga com 1,0 mL de água deionizada e adição de 6,5 mL também de água deionizada, como relatado no item 2.3.2.3. Por fim, deve haver, ao final, 10 mL de amostra.
- Foram acrescentados: 1 mL de cada um dos dois tampões (A e B) presentes no Kit de IMS; 100µL dynabeads anti-*Giardia* e 100µL anti-

Cryptosporidium, de acordo com o protocolo do fabricante (Dynal CG – Combo anti-*Cryptosporidium* & *Giardia*).

- Os T_{LP} foram encaminhados ao misturador de amostras (Dynabeads® Sample Mixer, Invitrogen™ USA) por uma hora a uma velocidade de 18 rpm em temperatura ambiente (figura 2.6a).
- Depois de transcorrido o tempo, os T_{LP} foram levados ao concentrador de partículas magnéticas (Dynal MPC – 1,Cat. nº 120.01D; Invitrogen Dynal AS, Norway), onde foram feitas rotações de 90º por 2 minutos; sendo aplicada, em média, uma rotação por segundo. Este procedimento tem o intuito de capturar os dynabeads, ligados aos protozoários, pelo imã (figura 2.6,b e c)
- O tubo foi então invertido, para descarte do sobrenadante, mantendo o seu lado plano voltado para cima.
- Em seguida, o T_{LP} era desacoplado do MPC-1 e foram realizadas duas lavagens de 0,5 mL com tampão A do próprio kit diluído a 10 vezes.
- Os volumes de cada tubo foram coletados por pipetas Pasteur e transferidos para tubos de microcentrífuga.
- Os tubos de microcentrífuga eram colocados em outro concentrador de partículas (MPC – S, Cat. nº120.20D, Invitrogen Dynal AS, Norway), já com a faixa magnética no local. Em seguida, eram agitados por 1 minuto fazendo um ângulo de 90º (figura 2.6d).
- O sobrenadante era aspirado e descartado. Após esta ação, a fita magnética do concentrador de partículas era retirada, para a realização da dissociação ácida dos (oo)cistos.

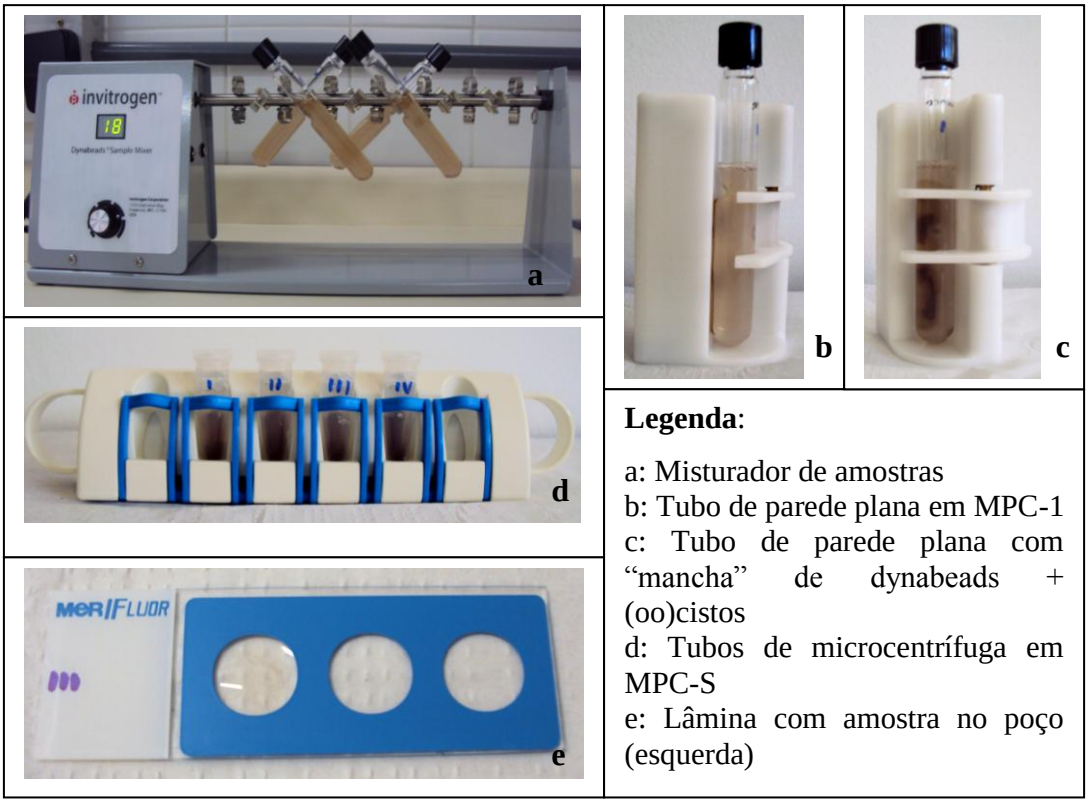


Figura 2.6 – Ilustração de algumas etapas da separação imunomagnética (IMS), utilizada na recuperação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*.

2.3.3.1 – Dissociação ácida de (oo)cistos

A dissociação foi realizada em duas etapas a fim de se aumentar a porcentagem de recuperação de (oo)cistos, como é proposto pelo método 1623 (USEPA, 2012). Na primeira etapa eram adicionados 50 µL de ácido clorídrico (0,1 N) e na segunda etapa 25 µL. Cada etapa consistiu em:

- Após a adição de ácido, os tubos de microcentrífuga foram agitados em vórtex por 10 segundos, tendo-se o cuidado de o material não atingir a tampa, e colocados no concentrador de partículas magnéticas (MPC – S) sem a fita magnética.
- Decorridos 10 minutos em repouso, na posição vertical e em temperatura ambiente, levou-se ao vortéx novamente por 10 segundos.
- Os tubos de microcentrífuga voltavam para o concentrador de partículas (MPC – S), no qual era inserida a fita magnética, mantendo-os em repouso por, no mínimo, 10 segundos.

Ocorria, assim, a preparação das placas, presentes no kit Merifluor (Meridien Bioscience Diagnostics, Cincinnatti, Ohio) utilizado para detecção de (oo)cistos:

adicionavam-se 7,5 µL de hidróxido de sódio (1 N) nos poços (wells) das placas – cuja finalidade era neutralizar os 75 µL de ácido (50 + 25 µL das duas etapas de dissociação), e depois se transferia o sobrenadante dos tubos de microcentrífuga para os poços das lâminas (figura 2.6e).

Após a etapa de IMS, as placas ficavam em repouso até as amostras secarem em temperatura ambiente (aproximadamente 4 horas), para assim, se dar início à etapa de detecção e identificação de cistos e oocistos.

2.3.4 - Ensaio Controle - Negativo

Quanto ao controle negativo, foram realizados três ensaios intercalados aos ensaios de recuperação, para averiguar se houve contaminação no decorrer do procedimento. Neste caso, ao invés de amostra de esgoto, todo o procedimento foi realizado com amostra de água deionizada: ausente de protozoários. Nos ensaios controle - negativo não foram encontrados (oo)cistos.

2.3.5 - Detecção e Identificação

A detecção e identificação dos (oo)cistos foram realizadas por Reação de Imunofluorescência Direta (RID) com o kit Merifluor.

A amostra que não passava por IMS, e estava em tubo de microcentrifugação, foi levada ao vórtex por 2 minutos e invertida 3 vezes para homogeneização. Dela, foram retirados 50 µL de amostra, com micropipeta previamente enxaguada com solução de eluição (Tween 80 (0,1%)), sendo transferidos para poço da placa. Essas placas ficavam em repouso até as amostras secarem em temperatura ambiente (aproximadamente 2 horas).

A amostra após secar em temperatura ambiente era fixada com metanol absoluto (20 a 50 µL) por 10 minutos. Em seguida, aplicava-se uma gota do fluido de detecção e uma gota do contra-corante, ambos presentes no kit Merifluor. A placa era levada para câmara úmida, no escuro, a 37ºC por 30 minutos.

Para lavagem, aplicavam-se 100 µL de água deionizada no poço da placa, e a mesma foi inclinada a 45º. Aplicava-se uma gota de meio de montagem presente no kit Merifluor e, por fim a lamínula era colocada.

A contagem de (oo)cistos no poço foi realizada sempre respeitando o prazo máximo de 7 dias (USEPA, 2012), utilizando microscópio de epifluorescência

(Olympus BX51), com aumento de 300 a 800 vezes. A contagem foi feita conforme proposto por Cantusio Neto (2004), usando-se a equação 2.1:

$$\frac{\text{n° de (oo)cistos detectados x } 10^6 \text{ x volume total do sedimento (mL)}}{\text{volume de sedimento na lâmina (µL) x volume da amostra (mL)}} \qquad (2.1)$$

Para a técnica de RID: foi avaliada a presença de estruturas esféricas de 4 a 6 µm – oocisto; e ovóides de 8 a 18 µm de comprimento por 5 a 15 µm de largura – cisto. A parede deveria mostrar fluorescência verde-maçã brilhante, sem poros ou apêndices e apresentar sutura do (oo)cisto visível (exibindo forte fluorescência).

2.3.6 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., 2004). Diferenças significativas entre as médias de recuperação dos métodos foram determinadas de acordo com ANOVA (*One Way Analysis of Variance*) com aplicação do teste t de *Student*, baseado na hipótese nula de médias iguais de recuperação para os métodos. Em todos os testes, valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

2.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos ensaios de recuperação estão apresentados na tabela 2.1.

O método da tripla centrifugação forneceu as maiores médias de recuperação para cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* nas amostras de elevada e média turbidez (ensaios 1 ao 4, da tabela 2.1). Apesar de a recuperação de cistos ter sido de 85% para efluente de elevada turbidez e 62,5% para média turbidez, não houve diferença estatística (p = 0,0633); o mesmo ocorreu para a recuperação de oocistos, em relação à recuperação em elevada turbidez (20,0%) e em média turbidez (17,5%).

Tabela 2.1 - Porcentagem de recuperação por ColorSeed de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em esgoto bruto e tratado.

Ensaio	**Turbidez (uT)**	**Método (nº repetições)**	**Recuperação de Cistos (Média ± DP)**	**Recuperação de Oocistos (Média ± DP)**
1	165	TC (4)	85,0 (± 12,9)	20,0 (± 8,2)
2	23,8	TC (4)	62,5 (± 15,0)	17,5 (± 5,0)
3	23,8	FM (4)	35,0 (± 5,8)	12,5 (± 5,0)
4	23,8	C+IMS (4)	27,5 (± 4,1)	7,0 (± 2,6)
5	6,5	FM (4)	67,5 (± 12,6)	22,5 (± 15)
6	6,5	FM+IMS (4)	47,8 (± 5,7)	35,3 (± 6,1)

Nota: TC: tripla centrifugação; FM: filtração em membrana; C: centrifugação; IMS: separação imunomagnética; DP: desvio padrão; uT: unidade de turbidez.

Ao se comparar os três métodos utilizados para turbidez média (ensaios 2, 3 e 4, da tabela 2.1), a tripla centrifugação mostrou melhor recuperação para *Giardia* que os métodos da filtração em membrana (p = 0,0141) e centrifugação com IMS (p = 0,0041). No entanto, na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium*, a tripla centrifugação apresentou melhor desempenho em relação apenas à adição da etapa de IMS (p = 0,0097); pois quando comparada à técnica de filtração em membrana, o teste t não mostrou diferença estatística (p = 0,2070). Pode-se constatar ainda que não houve diferença estatística entre a técnica de filtração em membrana e a centrifugação seguida de IMS, para *Giardia* (p = 0,0789) e para *Cryptosporidium* (p = 0,0984), conforme tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Comparação Estatística dos métodos para recuperação de (oo)cistos no efluente de média turbidez.

Método	***Giardia***	***Cryptosporidium***
Tripla Centrifugação	a	a
Filtração em Membrana	b	a b
Centrifugação + IMS	b	b

Nota: IMS: separação imunomagnética; Letras iguais nas colunas - sem diferença estatística.

Na análise dos métodos utilizados para amostras com turbidez baixa (ensaios 5 e 6 da tabela 2.1), a utilização da separação imunomagnética acarretou menor recuperação média de cistos, com diferença estatística (p = 0,0288). No entanto, aumentou a porcentagem de recuperação de oocistos de 22,5 para 35,3%, apesar de o teste t não ter verificado diferença entre as médias (p = 0,1662).

Pode-se constatar também a influência da turbidez nos ensaios de filtração em membrana (ensaios 3 e 5, da tabela 2.1) com maiores porcentagens de recuperação em turbidez baixa. Os resultados, quando comparados, apresentaram diferença estatística para a recuperação de cistos de *Giardia* (p = 0,0288); porém, isso não ocorreu para oocistos de *Cryptosporidium* (p = 0,1662).

Verifica-se também que cistos de *Giardia* foram mais facilmente recuperados que os oocistos de *Cryptosporidium* na turbidez média, quando os três métodos mostraram diferença estatística (p = 0,0013; 0,0011; 0,0002) para tripla centrifugação, filtração em membrana e centrifugação seguida de IMS, respectivamente. Esta mesma afirmação também se confirmou no efluente com turbidez elevada (p = 0,0001) e turbidez baixa (p = 0,0238).

Segundo McCuin e Clancy (2005), a recuperação promovida com ColorSeed parece mostrar uma estimativa conservadora da capacidade de recuperação de um método e nenhuma diferença estatística foi observada ao testar a recuperação com ColorSeed e oocistos vivos nos diferentes tipos de efluentes testados.

A interpretação e comparação de dados entre vários estudos sobre protozoários patogênicos é difícil devido a diferentes procedimentos, amostragem, concentração e status epidemiológico da população (MONTEMAYOR et al., 2005).

Robertson et al. (2000), a partir do conceito de "pequeno volume, sem etapa de purificação", recuperaram, para esgoto bruto: *Giardia* (79 ± 32 %) e *Cryptosporidium* (81 ± 21%), e para esgoto tratado: *Giardia* (81 ± 27%) e *Cryptosporidium* (89 ± 10%). Ao comparar com o método da tripla centrifugação, para *Giardia*, pode-se inferir que não houve diferença na recuperação; o que não poderia ser afirmado com relação ao *Cryptosporidium*, que foi recuperado no presente estudo no máximo em 35,3%.

McCuin e Clancy (2005) realizaram modificações do método 1622 (USEPA, 1999a) para recuperar oocistos de *Cryptosporidium* em águas residuárias. Com volume de amostra estudado (250 mL), estes pesquisadores recuperaram, utilizando ColorSeed, 23,5 ± 13,8% dos oocistos inoculados em esgoto bruto, 36,2 ± 11,4% em efluente

primário e 30,4 ± 17,5% para efluente secundário; valores próximos aos encontrados neste trabalho.

Montemayor et al. (2005) seguiram procedimento de Sheperd e Wyn-Jones (1995), com algumas modificações, para analisar *Cryptosporidium* em esgoto bruto e efluente secundário. A amostra passava por filtração mais grosseira (30 µm porosidade) para remover partículas, para assim ser filtrada em filtros de acetato de celulose com 1,2 µm porosidade, seguida de centrifugação (1500 x *g*, 10 minutos) e posterior IMS. Com esse procedimento a recuperação foi de 60 ± 18%. Ao utilizarem efluente terciário e aplicarem o método 1623 da USEPA (1999b) a recuperação foi de 33,6 ± 20,2%. Também foi utilizado para este efluente floculação com carbonato de cálcio (VESEY et al., 1993), com recuperação de 40,5 ± 24,5% de oocistos.

Os valores encontrados neste trabalho também estão próximos aos relatados por Ottonson et al. (2006), que utilizaram o método 1623 (USEPA, 2005) com algumas modificações: volume de 50 a 100 mL para esgoto bruto e de 300 a 600 mL para esgoto tratado; centrifugação da amostra a 2000 x *g* por 10 minutos. Esses autores relataram recuperação, em esgoto bruto, de 22 ± 1,5% para *Giardia* e 15 ± 4,6% para *Cryptosporidium*. Em esgoto tratado a recuperação foi de 25 ± 12% para *Giardia* e 39 ± 13% para *Cryptosporidium*.

O método da membrana filtrante faz uso de menos etapas para concentrar a amostra que o método de centrifugação seguido por IMS; porém, a raspagem da membrana pode não alcançar todos os (oo)cistos que permearam a membrana durante a filtração. De acordo com Carey et al. (2004), a recuperação de (oo)cistos na filtração pode ser afetada por alta turbidez da amostra, o que torna impraticável a filtração de esgoto bruto devido ao rápido entupimento da membrana; no entanto, pode ser usada para efluentes tratados (ROBERTSON et al., 2000).

Bonatti et al. (2007) modificaram o método de Robertson et al. (2000) com o uso 5 mL de amostra, com etapa de centrifugação apenas. Este método com menos manipulação da amostra e de baixo custo apresentou recuperação de *Giardia* de 43,7 ± 31,6% e para *Cryptosporidium* de 13,6 ± 12,8%; valores um pouco menores que os encontrados na tripla centrifugação.

O esgoto sanitário possui composição complexa com inúmeros interferentes, sendo assim, é possível que a baixa recuperação para o método com utilização de IMS, neste estudo, seja devido à grande manipulação da amostra com várias transferências de tubos e inúmeras etapas necessárias para o procedimento que aumentam as perdas de

(oo)cistos (ROBERTSON et al., 2000; BONATTI et al., 2007). Até mesmo há a possibilidade de ocorrer menor recuperação de (oo)cistos de acordo com a idade do kit Dynal utilizado (HU et al., 2004).

Neste contexto, a tripla centrifugação se apresenta como método promissor por ser rápido, barato (após se obter uma centrífuga) e simples, sem muitos detalhes. No entanto, esta técnica apresenta limite de detecção mais elevado, o que pode não ser favorável quando o número de (oo)cistos é baixo (ROBERTSON et al., 2000), como é o caso de efluentes tratados. Não obstante, para esse tipo de efluente, o método por membrana filtrante se mostrou mais eficaz.

2.5 - CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que:

- ✓ O método por tripla centrifugação seguido por RID pode ser aplicado para efluentes com elevada e média turbidez, apresentado boas porcentagens de recuperação, principalmente, de cistos de *Giardia*.
- ✓ Oocistos de *Cryptosporidium* são mais difíceis de recuperar que cistos de *Giardia* em matrizes complexas como o esgoto sanitário, mesmo tratado.
- ✓ A separação imunomagnética auxilia na captura, principalmente, de oocistos em amostras com turbidez baixa, além de ajudar na visualização com a retirada de grande parte do material particulado presente na amostra. No entanto, é uma etapa trabalhosa, com muitos detalhes, e onerosa.

Capítulo 3

Remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em ETE- piloto

O intuito deste capítulo foi avaliar a remoção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em uma ETE - piloto, e verificar se coliformes totais, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* são bons indicadores para esses protozoários.

3.1 - INTRODUÇÃO

3.1.1 - Presença de protozoários em águas superficiais

Cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* são detectados em águas superficiais devido ao descarte de efluentes domésticos, tratados e não-tratados, águas pluviais provenientes de áreas agrícolas (poluição difusa), chegando a mananciais utilizados para balneabilidade, abastecimento, irrigação, dessedentação de animais, vindo a manter o ambiente sempre contaminado (MEDEMA et al., 1997; CARRARO et al., 2000; HACHICH et al, 2004; KISTEMANN et al., 2012).

São vários os estudos na literatura referentes à presença desses protozoários patogênicos em águas superficiais, algumas utilizadas como fonte de abastecimento; e também em água já tratada, como pode ser visualizado na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Concentrações de (oo)cistos de protozoários encontradas em águas superficiais.

Concentração Média *Giardia*	**Concentração Média *Cryptosporidium***	**Referência Bibliográfica**
400 a 2800 / 100 litros	600 a 1200 / 100 litros	Payment e Franco (1993)
4 a 58 / litro	16 a 150 / litro	Hashimoto et al. (2002)
2 a140 / litro	4 a 510 / litro	Bastos et al. (2004)
0 a 521 / litro	0 a 20 / litro	Hachich et al. (2004)
---	16 a 40 / litro	Machado (2006)
0 a 22 / 100 litros	0 a 4 / 100 litros	Kistemann et al. (2012)
0 a 3,8 / litro	0 a 30 / litro	Haramoto et al. (2012)
0 a 2,29 / 10 litros	0 a 5,49 / 10 litros	Xiao et al. (2013)
0 a 4000 / 100 litros	0 a 2000 / 100 litros	Gallas-Lindemann et al. (2013)
0,1 a 97 / litro	0,1 a 6 / litro	Sato et al. (2013)

Os casos relatados são extremamente preocupantes, tanto do ponto de vista de tratamento e abastecimento de água potável, quanto à degradação e contaminação da bacia hidrográfica na qual se inserem os mananciais.

3.1.2 - Microrganismos Indicadores

A determinação quantitativa de patógenos, como *Cryptosporidium* e *Giardia*, demanda tempo, está sujeita a variáveis porcentagens de recuperação, é trabalhosa,

requer técnicos treinados, sendo um monitoramento difícil devido também a pouca concentração de (oo)cistos no final do tratamento de água (HACHICH et al., 2004; MOZOUA; CHAUVEHEID, 2005).

Em vista das inúmeras doenças relacionadas com contaminação hídrica, necessitou-se de mensurar a poluição fecal para, assim, poder associá-la a uma magnitude do risco em se contrair uma infecção.

A partir desse momento, foram procurados microrganismos que atendessem às seguintes características: ser exclusivamente fecal; não se reproduzir no ambiente externo ao hospedeiro; ser mais resistente que os organismos patogênicos às etapas de tratamento de água e esgoto, e aos desinfetantes; fácil, rápida e barata detecção; estar em maior número que os patogênicos; não ser patogênico (NIEMINSKI et al., 2000; TOLLON et al., 2005; BRASIL, 2006; STANDRIDGE, 2008).

O uso de bactéria como indicador de qualidade da água data de 1880, quando Von Fritsch descreveu a *Klebsiella penumoniae* e *rhinoscleromatis* como microrganismos constantemente encontrados em fezes humanas (Geldreich, 1978 *apud* Ashbolt et al., 2001). Em 1907, Winslow e Walker observaram que *Bacillus coli*, descrito por Escherich em 1885, apresentava origem fecal.

Um microrganismo ideal que contenha todas as características pré-relacionadas é praticamente impossível de ser encontrado. Os principais microrganismos utilizados como indicadores de poluição de origem fecal são: coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Enterococci faecal*, *Clostridium perfringens*, colifagos, contagem de bactérias heterotróficas (NIEMISKI, 2000; BASTOS et al., 2003; ASHBOLT et al., 2001; HACHICH et al., 2004; SAVICHTCHEVA; OKABE, 2006).

As definições desses principais microrganismos indicadores estão explícitas abaixo (APHA, 2005; TALLON et al., 2005; WHO, 2006):

- Coliformes Totais: bactérias gram-negativas, não formadoras de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, oxidase-negativos, fermentam lactose (com β-galactosidase) a ácido, aldeído e gás, num período de 24-48 horas, a 36 ± 2 ºC. A maioria das bactérias desse grupo pertence aos gêneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*.
- Coliformes Termotolerantes: subgrupo de coliformes os quais produzem gás e ácido a partir da lactose, a 44,5 ± 0,2 ºC, num intervalo de tempo de 24 ± 2h. Possui como principal representante a *Escherichia coli*.

- *Escherichia coli*: coliforme termofílico que produz indol a partir de triptofano, fermenta a lactose e o manitol, com produção de ácido e gás a 44,5 ± 0,2 ºC, num intervalo de tempo de 24 ± 2h. Não hidrolisa a uréia e apresenta atividade das enzimas β-galactosidase e β-glicoronidase. Estudos de caracterização mostraram que 94% de coliformes termotolerantes em fezes humanas eram *Escherichia coli*.
- *Enterococci faecal*: todas as bactérias do grupo de *Streptococci faecal* que se mostram tolerantes às condições adversas de crescimento com: presença de 6,5% de NaCl, pH 9,6, e nas temperaturas de 10º e 45ºC.
- *Clostridium perfringens*: bactérias gram-positivas, formados de esporos, não móveis, estritamente anaeróbias, sulfito redutoras, fermentam lactose, sucrose e inositol com produção de gás. Extremamente resistentes ao estresse ambiental.
- Colifagos: vírus que infectam *E. coli*, via parede celular. São resistentes às adversidades do ambiente, e também, de certo modo, à desinfecção. As linhagens MS2 e f2 têm mostrado resistência à inativação em ambientes naturais e nos processos de tratamento de esgoto.
- Contagem de bactérias heterotróficas: determinação da densidade de bactérias que são capazes de produzir unidades formadoras de colônias (UFC), na presença de compostos orgânicos contidos em meio de cultura apropriado, a 35,0 ± 0,5 ºC, em 48 horas.

Outro indicador é a turbidez: característica física da água resultante da presença de partículas em suspensão e expressa a interferência à passagem de luz através do líquido. No entanto assume papel de indicador sanitário, pois sua remoção indicaria a remoção de partículas em suspensão, incluindo (oo)cistos de protozoários. Além disso, elevados valores de turbidez podem levar à proteção de organismos patogênicos na desinfecção pelos sólidos presentes em suspensão.

Mozoua e Chauveheid (2005), ao avaliarem a eficiência do tratamento de água para abastecimento, propuseram como indicadores microbiológicos: vírus bacterianos e bactérias esporuladas (aeróbias e *Clostridium perfringens*). Estes microrganismos se mostraram os mais promissores, por apresentarem resistência à desinfecção química similar a *Cryptosporidium* e *Giardia*.

Payment e Hunter (2001) ao verificarem a associação de coliformes antes e durante surtos com os agentes etiológicos e tipos de processos de tratamento de água, concluíram que coliformes são indicadores mais adequados para bactérias e vírus.

Tollen et al. (2005) encontram associação entre *Clostridium perfringens* e *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas superficiais, mas não em águas contaminadas por esgoto ou água tratada. Relatam ainda a necessidade de maiores entendimentos sobre o ciclo de vida dos microrganismos, sobrevivência e persistência em sistemas de abastecimento de água.

Segundo Heller et al. (2007), existe a necessidade de pesquisa em indicadores físicos e microbiológicos para avaliar a eficiência dos processos de tratamento de esgoto quanto à remoção de patógenos.

3.1.3 Tratamento de Esgoto

O lançamento de esgoto *in natura* em corpos d´água é um dos principais problemas de saúde pública e investimentos em reúso de águas residuárias devem fazer parte de metas de gestão de recursos hídricos (ROSE, 2007).

A concentração de microrganismos patogênicos existente no esgoto pode ser muito grande, o que representa risco direto à população quando lançado em um curso d´água. Na tabela 3.2 estão apresentadas as concentração de (oo)cistos no esgoto, descritos por diferentes autores.

Segundo Plutzer et al. (2010), o tratamento efetivo do esgoto é crítico para manter a segurança à Saúde Pública contra infecções por *Giardia*, devido à proteção das fontes hídricas da contaminação dentro do conceito de "barreiras múltiplas".

Robertson et al. (2000) estimaram, através de tratamento de esgoto primário e secundário, a remoção de 60 a 90% para cistos de *Giardia*, e de 10 a 90% para oocistos de *Cryptosporidium*. Inúmeros fatores podem afetar a remoção incluindo propriedades dos próprios microrganismos, o tipo de tratamento e interações entre patógenos e o tratamento.

Cheng et al. (2009) constataram remoções de 64 a 99% de *Cryptosporidium* e 98 a 100% de *Giardia* em diferentes ETEs. Os mesmos autores afirmam que avaliar o comportamento microbiológico de (oo)cistos permite o entendimento do grau de estabilização e sanidade do efluente tratado após as diferentes etapas de tratamento de esgoto, e alertam para a infectividade dos (oo)cistos encontrados nos efluentes finais pesquisados.

Tabela 3.2 - Concentração de (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* encontrada no esgoto doméstico.

Concentração Média *Giardia*	**Concentração Média *Cryptosporidium***	**Referência Bibliográfica**
$3,9 \times 10^3$ / 100 litros	$3,7 \times 10^2$ / 100 litros	Rose et al. (1996)
50 a 8386 / litro	22 a 395 / litro	Robertson et al. (2000)
431 / 100 litros	1042 / 100 litros	Cardoso et al. (2003)
1×10^5 / litro	6×10^4 / litro	Cantusio Neto et al. (2006)
18 a 8480 / litro	1 a 80 / litro	Lim et al. (2007)
280,9 / litro	45,7 / litro	Reinoso et al. (2008)
2 a 390 / litro	79 a 2469 / litro	Castro-Hermida et al. (2008)
2,58 a $8,21 \times 10^1$ / litro	1,58 a $2,39 \times 10^2$ / litro	Wen et al. (2009)
130 a 3600 / litro	33 a 600 / litro	Fu et al. (2010)
2 a 14400 / litro	1 a 80 / litro	Castro-Hermida et al. (2010)
-	50 a 1280 / litro	Ajonina et al. (2012)
0 a 2436 / litro	0 a 1745 / litro	Gallas-Lindemann et al. (2013)

O reator UASB que, de acordo com Chernicharo (1997), apresenta baixo custo, simplicidade operacional e baixa produção de sólidos e são cada vez mais frequentes como alternativas de tratamento de águas residuárias no Brasil. Existem mais de mil reatores UASB instalados no mundo (TIWARI et al., 2006), entretanto, existem poucas referências bibliográficas que abordam a remoção ou inativação de microrganismos patogênicos, entre eles, *Giardia* e *Cryptosporidium*, por reator UASB.

O tratamento anaeróbio promovido pelo reator UASB muitas vezes não consegue atingir os requisitos para lançamento de efluentes impostos na legislação com relação à remoção de matéria orgânica; havendo, portanto, necessidade de pós-tratamento (TONETTI, 2004). Várias ETEs fazem uso do lodo ativado como tratamento secundário aeróbio com bons resultados quanto à qualidade do efluente (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999).

Outro processo de pós-tratamento de efluentes é a filtração lenta. Ela é primeiramente um processo biológico, uma vez que há atividade biológica no biofilme aderido ao leito filtrante, mas também atua como processo físico e químico de tratamento, através do “peneiramento” e da adsorção de compostos pela areia (JORDÃO; PESSOA, 2005; TONETTI, 2004).

Sistemas de tratamento como os lodos ativados e a filtração em areia podem também remover turbidez do efluente, o que contribui para um posterior etapa de desinfecção.

As ETEs são usualmente projetadas para remoção de carga orgânica - DBO e DQO - e raramente, tem-se atenção para microrganismos patogênicos (HASSEN et al., 2000; KOIVUNEN et al., 2003). De acordo com Langenbach et al. (2010), a tecnologia de filtração lenta em areia é utilizada há mais de 200 anos para tratamento de água para abastecimento, sendo poucos os estudos nos quais é empregada como pós-tratamento de esgoto sanitário.

Neste trabalho, o filtro lento em areia foi utilizado como alternativa de pós-tratamento do efluente secundário advindo do lodos ativados, principalmente, pelas seguintes características (LANGENBACH et al., 2010; MURTHA; HELLER, 2003; WHO, 1974):

- Simples construção;
- Fácil operação e manutenção;
- Baixos custos de implantação e operação;
- Não requer produtos químicos;
- Atividade biológica, além da ação física, para melhorar, sobretudo, a qualidade microbiológica do efluente.

Há ainda carência de estudos com reatores anaeróbios, aeróbios e filtros biológicos com relação à inativação e remoção de protozoários patogênicos. Além disso, a questão da viabilidade de cistos e oocistos pré e pós-tratamentos é muito pouco explorada.

3.2 - OBJETIVOS

Os objetivos foram: avaliar a eficiência na remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptoporidium* de uma estação de tratamento de esgoto (ETE) piloto composta por: tratamento preliminar, reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), sistema de lodos ativados e filtro lento em areia. Como objetivos específicos:

- Fornecer dados sobre a ocorrência de cistos e oocistos em esgoto bruto e tratado.

- Avaliar a remoção e a viabilidade dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. no decorrer dos processos de tratamento.
- Avaliar a remoção de microrganismos indicadores – coliformes totais, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*.
- Verificar associações entre a remoção de protozoários e a remoção de microrganismos indicadores.
- Verificar associações entre a remoção microbiológica e a remoção de variáveis físicas e químicas.
- Avaliar o efeito da mudança do tempo de residência celular do sistema de lodos ativados na remoção microbiológica e de variáveis físicas e químicas.
- Avaliar o efeito da taxa de filtração do filtro lento na remoção microbiológica e de variáveis físicas e químicas.

3.3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 - A ETE - piloto

O esgoto que chega à ETE - piloto é proveniente do Campus da USP - São Carlos e de bairros próximos, e possui várias processo de tratamento. Um esquema pode ser visualizado na figura 3.1.

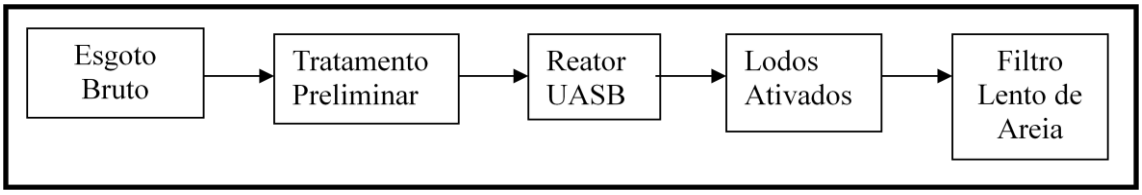


Figura 3.1 - Esquema Geral dos processos de tratamento na ETE (tratamento preliminar e reator UASB) seguida da instalação piloto (lodos ativados e filtro lento de areia).

O tratamento preliminar era composto de: gradeamento, caixa de remoção de areia e gordura. Após essa etapa, o esgoto passava por uma elevatória, sendo bombeado para um tanque de equalização. Depois dele, havia a distribuição de esgoto por gravidade para o reator UASB.

O reator UASB, com as dimensões: base 2m x 2m, altura útil de 4,7 metros, volume útil de 18,8 m³ (figura 3.2), foi operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 12 horas. A partir do reator UASB, parte do esgoto era encaminhada para o

sistema de lodos ativados em escala piloto, o qual pode ser visualizado nas figuras 3.3, 3.4 e 3.5.

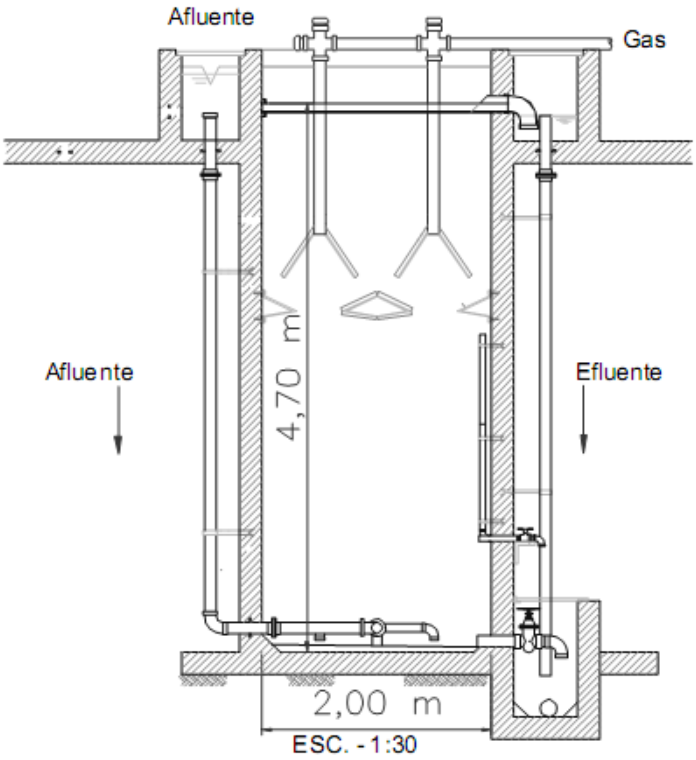


Figura 3.2 - Corte transversal do reator anaeróbio com manta de lodo (UASB) da ETE - USP São Carlos. (PASSIG; CAMPOS, 2005).

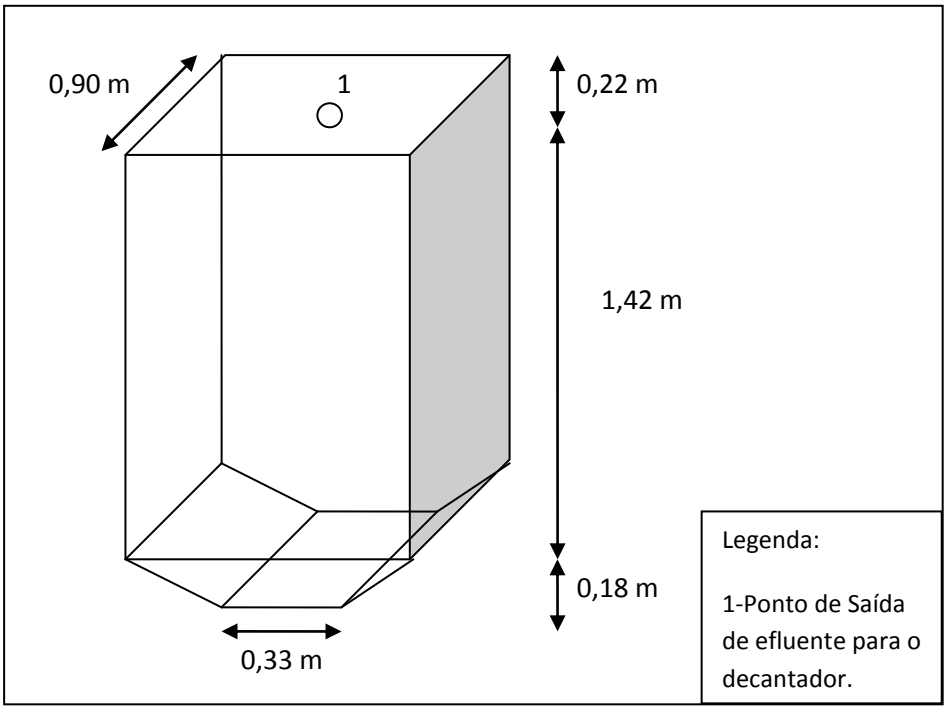


Figura 3.3 - Tanque de aeração do sistema de lodos ativados da ETE - piloto (sem escala).

O sistema de lodos ativados era composto de tanque de aeração e decantador. O tanque de aeração tinha as seguintes dimensões: base 0,90m x 0,90m; altura útil de 1,60m, como pode ser visualizado na figura 3.3. O volume útil era aproximadamente de 1,25 m³. A vazão afluente foi ajustada por bombeamento em 70 L. h^{-1}, resultando em tempo de detenção hidráulica de 18 horas. A aeração era feita por ar proveniente de compressor e difusão por membrana.

O decantador possuía base retangular – 0,20m x 0,40m; altura útil de 1,50m, e volume útil de 112,5 litros, como pode ser visualizado na figura 3.4.

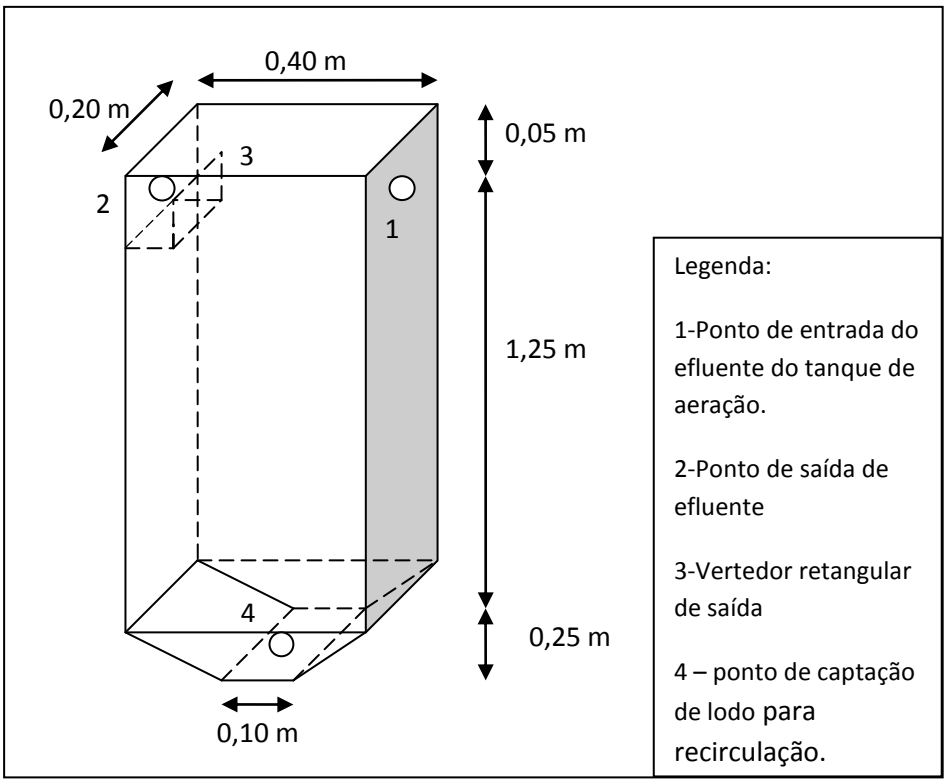


Figura 3.4 - Decantador do sistema de lodos ativados da ETE - piloto (sem escala).

Foi colocado um anteparo (placa de aço) logo na entrada do efluente do tanque de aeração no decantador, que penetrava aproximadamente 60 cm de profundidade, para diminuição de curto-circuito e permitir melhor sedimentação do lodo.

O sistema de lodos ativados foi operado com dois tempos de retenção celular (TRC): próximos a 7 e 20 dias, portanto como sistema convencional e aeração prolongada, respectivamente. Para isso, houve recirculação do lodo sedimentado no decantador para o tanque de aeração e descarte de lodo excedente diretamente do tanque de aeração. Os descartes foram realizados manualmente, através de um registro de

globo, localizado no fundo do tanque de aeração, duas vezes ao dia. A fim de manter o TRC de 7 dias, eram descartados, ao todo, diariamente, 1/7 do volume do tanque de aeração; para TRC de 20 dias, 1/20 do volume.

Para início da operação do sistema, foram acrescentados 80 litros de lodo, proveniente de outro sistema de lodos ativados, no tanque de aeração com efluente do reator UASB. O sistema foi mantido aerado por 24 horas, sem entrada ou saída de esgoto. Após esse tempo, os registros de entrada e saída foram abertos e a bomba de recirculação foi ligada.

Após o decantador, o esgoto era armazenado em um tanque, do qual uma bomba alimentava o filtro lento em areia. Este foi proposto como pós-tratamento do efluente secundário advindo do lodos ativados e possuía formato circular, com 200 mm de diâmetro, como representado na figura 3.5.

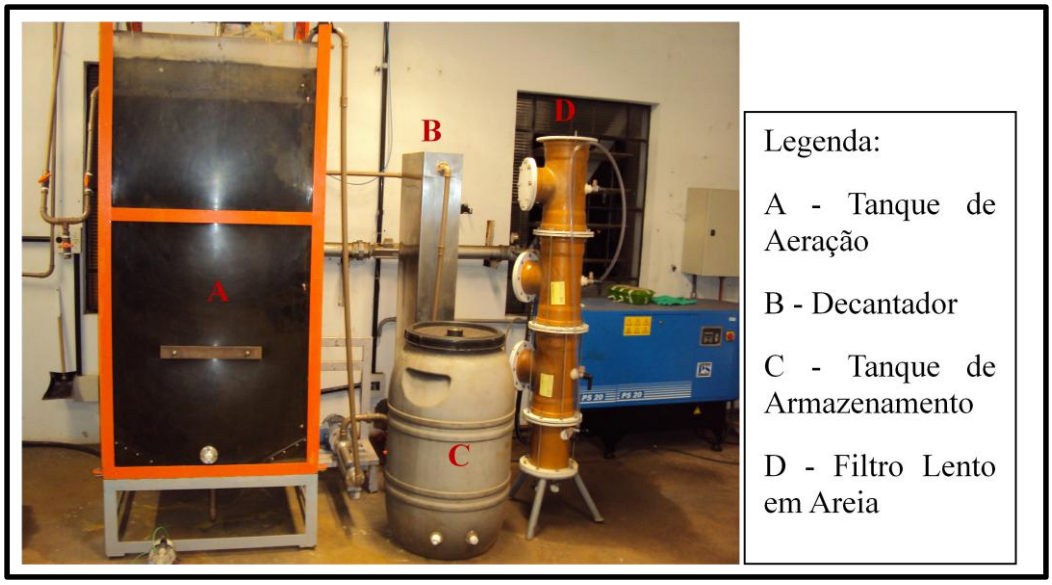


Figura 3.5 - Sistema de Lodos Ativados e filtro lento em areia (ETE - escala piloto).

O filtro lento tinha um fundo falso com 14 cm de altura, separado por placa perfurada. Acima dessa placa foram acrescentados: pedregulho, areia grossa e areia fina, como pode ser visualizado na figura 3.6.

A camada de pedregulho, com altura de 18 cm, foi dividida em três, de acordo com o tamanho do pedregulho:

- Camada Inferior - 12,7 a 19,1 mm;
- Camada intermediária - 6,0 a 12,0 mm;
- Camada superior - 3,0 a 6,0 mm.

Após a camada de pedregulho foi acrescida uma camada de areia grossa com 18 cm de altura, cuja característica granulométrica está apresentada na tabela 3.3.

Figura 3.6 - Esquema de montagem do filtro de areia.

Tabela 3.3 - Característica granulométrica da areia grossa do filtro lento.

Abertura da Malha Peneira (mm)	Resultado (%)	Porcentagem Acumulada (%)
2,360	0,0	100
2,000	1,2	100
1,700	14,2	98,8
1,400	42,8	84,6
1,180	34,8	41,8
1,000	5,6	7,0
0,850	0,8	1,4
0,600	0,6	0,6
0,425	0,0	0,0

Acima da camada de areia grossa, foi acrescentada uma camada de areia fina com altura de 60 cm, cuja característica granulométrica está na tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Característica granulométrica da areia fina do filtro lento.

Abertura Malha Peneira (mm)	Resultado (%)	Porcentagem Acumulada (%)
1,180	0,5	100
0,600	42,5	99,6
0,425	29,2	57,1
0,300	19,5	27,9
0,150	7,7	8,38
0,075	0,62	0,68
Fundo	0,06	0,06

Para a areia fina foram calculados:

- D_{10} (tamanho efetivo) igual a 0,16 mm;
- D_{60} igual a 0,45 mm;
- Coeficiente de desuniformidade (D_{60}/D_{10}) igual a 2,8, o que atendeu às principais especificações de areia utilizada em filtro lento.

Acima do leito de areia fina, foram reservados 15 cm para manutenção da carga hidráulica, cuja principal importância, segundo Langenbach et al. (2010), é proteger a camada biológica - *Schmutzdecke* - de forças de cisalhamento causadas pela vazão afluente; e mais 80 cm para carga hidráulica disponível. Para iniciar a operação do filtro, houve o preenchimento com água no sentido ascendente a uma velocidade de 1,2 m^3/m^2.dia.

Foram testadas duas taxas de filtração - 4,26 e 2,0 m^3/m^2.dia - e dois tipos de afluente ao filtro:

- I - bombeado do tanque de armazenamento do efluente do lodos ativados, após o decantador (baixas carga orgânica e turbidez).
- II - bombeado diretamente do decantador (elevadas carga orgânica e turbidez).

3.3.2 - Amostragem

O tratamento preliminar, o reator UASB e o sistema de lodos ativados foram operados durante 21 meses, de junho de 2011 a março de 2013. O filtro lento de areia foi operado durante os meses de junho e julho de 2012.

As amostras de esgoto foram recolhidas após o tratamento preliminar (considerado como bruto, principalmente pela questão microbiológica), reator UASB, sistema de lodos ativados e filtro lento de areia. Elas eram armazenadas em frascos de 1 litro previamente lavados, desinfetados e enxaguados com solução Tween 80 (0,1%).

3.3.3 - Análises Físico-Químicas

As seguintes análises físico-químicas foram realizadas para caracterização e monitoramento de cada uma das etapas de tratamento da ETE - piloto, como pode ser visualizado na tabela 3.5, as quais seguiram o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Tabela 3.5 - Métodos analíticos empregados para análises físico-químicas de efluentes da ETE.

Variável	Método e Equipamentos
Absorbância em comprimento de onda de 254nm	Espectrofotômetro DR 4000 ou DR 5000.
Alcalinidade Parcial	Titulação potenciométrica com ácido sulfúrico até pH 5,75 (Método 2320B)
Alcalinidade Total	Titulação potenciométrica com ácido sulfúrico até pH 4,3 (Método 2320B)
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	Método colorimétrico em refluxo fechado (5220 D)
pH	Método Potenciométrico. pH meter - Denver Instrument
Sólidos Totais	Método Gravimétrico (2540 B)
Sólidos Suspensos Totais	Método Gravimétrico – filtração em membrana (1,2 μm) (2540 B)
Temperatura	Termômetro de mercúrio
Turbidez	Turbidímetro 2100 P

3.3.4 - Exames Microbiológicos

3.3.4.1 - *Escherichia coli* e coliformes totais

Para a quantificação de *E. coli* e coliformes totais foi utilizada a técnica de "*pour plate*". Esta metodologia foi empregada seguindo sugestão de Lorenção (2009), em

razão de o aporte de sólidos na membrana filtrante, normalmente empregado para amostras de água, dificultar a identificação das colônias.

A partir de diluições decimais, colocava-se 1 mL de amostra em placa de Petri estéril. Logo a seguir, 9 mL do meio Chromocult® Coliform Agar (Merk Cat.No.1.10426) eram acrescentados, ainda líquido, na temperatura de 50 a 55 ºC. As placas eram, então, incubadas a 36 ± 1 ºC por 24 ± 1 hora.

Por esta técnica, as colônias que apresentam coloração azul-escuro/violeta são identificadas como *E. coli*, e as que apresentam coloração salmão/vermelha, somadas às colônias de *E. coli*, são identificadas e quantificadas como coliformes totais. como pode ser visualizado na figura 3.7. Nesses casos, o resultado foi lido como Unidade Formadora de Colônia (UFC) por mL.

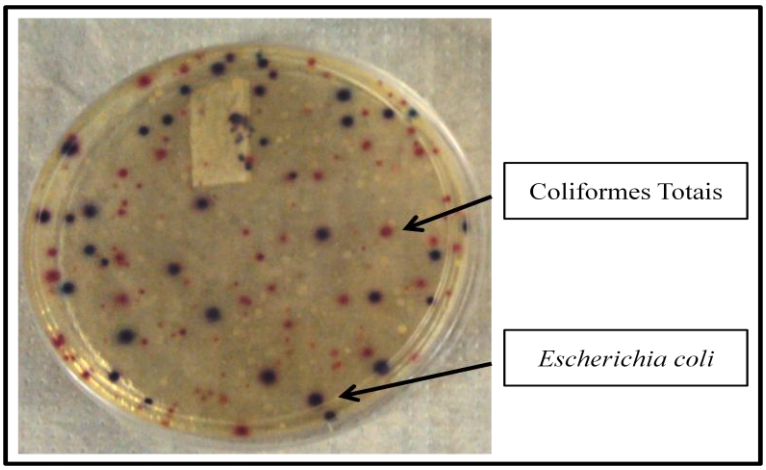


Figura 3.7 - Placa contaminada com colônias típicas de *E. coli* e coliformes totais.

Durante os meses em que o filtro lento foi estudado, coliformes totais e *E. coli* das amostras afluente e efluente dessa unidade de tratamento foram quantificados por membrana filtrante. Neste caso, após a filtração, houve transferência da membrana para placa de Petri contendo meio de cultura Chromocult® Coliform Agar (Merk Cat.No.1.10426) já solidificado. A incubação e leitura foram similares ao relatado anteriormente; no entanto, o resultado foi lido como unidade formadora de colônia (UFC) por 100mL.

3.3.4.2 - *Clostridium perfringens*

A metodologia para quantificação de *Clostridium perfringens* foi seguida de acordo com o método L5.403 (CETESB, 2004), o qual utiliza a técnica de membrana filtrante. De forma geral, são três passos principais:

- Filtração em membrana e inoculação em meio de cultura seletivo;
- Primeira verificação das colônias, em meio Tioglicolato;
- Segunda verificação das colônias, em meio de leite com ferro modificado.

Inicialmente, a amostra em diluições decimais era aquecida em banho-maria a 60 ± 0,5 ºC durante 15 minutos, para eliminar organismos não esporulados e formas vegetativas. A amostra era depois imediatamente resfriada em banho de gelo.

Em seguida, procede-se à filtração da amostra em membrana estéril de nitrato de celulose com 0,45 µm de porosidade (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany).

A membrana era transferida para uma placa de Petri estéril descartável contendo meio de cultura seletivo e diferencial Águar m-CP (Oxoid Ltda, England). Em seguida, as placas eram viradas para baixo e incubadas em jarras de anaerobiose (Permution, Brasil; Gas Pak® System, BBL), por 24 horas a 44,5 ± 0,2 ºC.

A manutenção da atmosfera em anaerobiose foi conseguida com a inserção de um envelope de sistema anaeróbio (BD BBL™ GasPak™ Plus, ref. 271040; Becton, Dickinson and Company, USA). Para verificar anaerobiose, foi inserida uma fita plástica indicadora (BD BBL™, ref. 271051, Becton, Dickinson and Company, USA) a qual passava da coloração azul para incolor, confirmando condição anaeróbia.

Após as 24 horas, as placas foram levadas ao contato com vapores de hidróxido de amônio. Com isso, colônias típicas que apresentavam coloração amarelo palha adquirem coloração rosa escuro ou roxa: são colônias presuntivas de *C. perfringens.*

Com a finalidade de confirmar as colônias de *C. perfringens*, cinco colônias típicas do ensaio presuntivo foram inoculadas, com o auxílio de uma agulha de inoculação, em tubos contendo caldo tioglicolato (CM 0173, Oxoid Ltda, England) e incubadas a 35 ± 0,5 ºC durante 24 horas.

No método L5.403 há o relato de se utilizar 10 colônias, mas optou-se, por questão de trabalho e de tempo, selecionar apenas cinco. Nos ensaios realizados, todas as colônias selecionadas no meio Águar m-CP se mostraram positivas também no caldo tioglicolato.

Dos tubos positivos com caldo tioglicolato foi retirado 1 mL e inoculado em tubos contendo meio de leite com ferro modificado. Para esse meio de cultura, foram utilizados:

- 100 gramas de Leite em Pó Molico (desnatado) Instantâneo (Nestlé®);
- 1 grama de sulfato de ferro heptahidratado ($FeSO_4$ $7H_2O$);
- 1000 mL de água desionizada.

O modo de preparo foi seguido conforme o método L5.403 (CETESB, 2004). Os tubos foram incubados a 44,5 ± 0,2 ºC durante 2 horas.

As principais etapas de quantificação e confirmação de colônias de *Clostridium perfringens* podem ser observadas na figura 3.8.

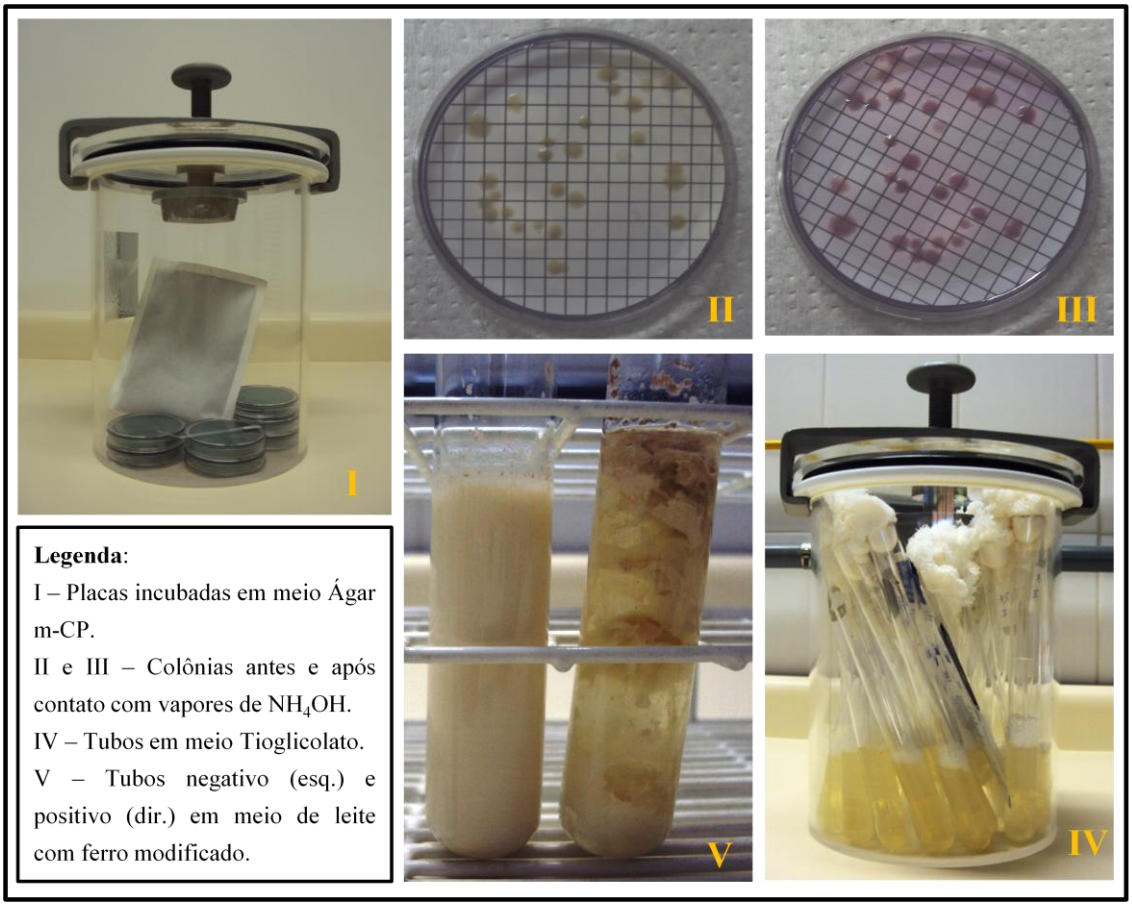


Figura 3.8 - Etapas para a quantificação e confirmação de *Clostridium perfringens*.

A leitura do teste confirmativo foi efetuada com tubos positivos que apresentaram produção de fermentação turbulenta no meio de leite com ferro modificado, com formação de coágulos. O resultado foi lido como nº de colônias confirmadas como *C. perfringens* em 100 mL.

3.3.4.3 - *Giardia* spp. *e Cryptosporidium* spp.

A análise de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* foi realizada de duas maneiras diferentes: caso a amostra apresentasse média ou elevada turbidez (acima de 25 UNT), utilizava-se o método da tripla centrifugação, como relatado no capítulo 2, no item 2.3.2.1.1; porém, com baixa turbidez, foi empregado o método da filtração em membrana, como relatado no capítulo 2, no item 2.3.2.3.

Depois da etapa inicial de concentração da amostra, foi utilizada a Reação por imunofluorescência direta (RID), com o kit Merifluor, como relatado no capítulo 2, no item 2.3.5. No entanto, antes de colocar o meio de montagem, foram acrescentados de 30 a 50 μL do corante DAPI (utilizado para confirmação dos cistos e oocistos) nos poços da lâmina, deixando por 30 minutos em temperatura ambiente; com posterior dupla lavagem com 100 μL de água deionizada.

A viabilidade dos cistos e oocistos foi inferida através da coloração diferencial com iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, USA), de acordo com Campbell et al. (1992). Esse reagente, responsável pela emissão de fluorescência vermelha (λ = 510 a 550 nm), penetra apenas nos microrganismos com membrana danificada (células mortas). Para isso, foram acrescentados de 20 a 50 μL de solução de PI nos poços da lâmina, deixando por 15 minutos em temperatura ambiente; com posterior dupla lavagem com 100 μL de água deionizada, para só assim, adicionar o meio de montagem e a lamínula. Cistos e oocistos sem penetração do corante (PI-) foram considerados viáveis, e os que apresentaram penetração do corante (PI+), inviáveis.

As amostras foram examinadas em microscópio de imunofluorescência (Olympus BX51) sob aumento de 400X a 800X. Para o cálculo da concentração de (oo)cistos por litro, foi utilizada a equação de Cantusio Neto (2004) (3.1):

$$\frac{\text{n° de (oo)cistos detectados x } 10^6 \text{ x volume total do sedimento (mL)}}{\text{volume de sedimento na lâmina (μL) x volume da amostra (mL)}} \qquad (3.1)$$

3.3.5 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com a ajuda do software STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc, 2004). Os dados, quando necessários, foram transformados a fim de apresentarem distribuição normal – verificada por teste Shapiro-Wilk; a homogeneidade de variâncias foi verificada por teste de Levene e as comparações entre médias foram

feitas utilizando o teste "t" de Student. Quando os dados não puderam ser transformados, foram aplicados testes não-paramétricos de Wilcoxon para variáveis dependentes ou o teste de Mann-Whitney para variáveis independentes. Para avaliar a correlação de parâmetros, o coeficiente "r" de Spearman foi encontrado. Em todos os testes, quando $p < 0,05$, a diferença entre as variáveis foi considerada significante.

3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão divididos em três seções principais. Primeiramente, serão relatados os resultados obtidos no monitoramento de variáveis físicas e químicas do reator UASB e para o sistema de lodos ativados, operado em aeração prolongada e convencional; depois o monitoramento microbiológico para essas mesmas etapas de tratamento. Por fim, serão apresentados os resultados do filtro lento em areia, tanto para variáveis físicas e químicas, quanto microbiológicas.

3.4.1 - Monitoramento de variáveis físicas e químicas

Os resultados do monitoramento das variáveis físicas e químicas da ETE - piloto estão sintetizados nas tabelas 3.6 e 3.7.

Tabela 3.6 - Resumo estatístico dos dados obtidos durante o monitoramento da ETE - piloto para o afluente bruto e efluente do reator UASB.

Variável	Afluente Bruto					Efluente UASB					Eficiência média de Remoção
	N° amostras	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	N° amostras	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	
pH	21	6,55	0,35	5,67	6,97	21	6,81	0,32	6,32	7,42	
Temperatura (° C)	21	22,8	2,1	18,4	25,5	21	22,8	2,0	18,6	25,4	
AP (mg $CaCO_3.L^{-1}$)	21	78	29	34	141	21	191	50	77	271	
AT (mg $CaCO_3$ $.L^{-1}$)	21	184	60	105	321	21	285	75	167	510	
Abs 254 nm	20	1,420	0,778	0,727	4,000	20	0,671	0,187	0,360	1,182	45 %
Turbidez (uT)	20	432	790,3	79,6	3520	20	132	68,4	63,9	351	37 %
DQO ($mg.L^{-1}$)	21	1131	1197	310	4628	21	316	158	94	575	57 %
ST ($mg.L^{-1}$)	17	1112	1042	310	4368	17	390	100	250	572	46 %
SST ($mg.L^{-1}$)	18	501	833	59	3494	18	103	52	28	212	48 %
SDT ($mg.L^{-1}$)	17	579	581	124	2197	17	297	68	206	435	25 %

Nota: AP: alcalinidade parcial; AT: alcalinidade total; DQO: demanda química de oxigênio; ST: sólidos totais; SST: sólidos suspensos totais; SDT: sólidos dissolvidos totais.

Tabela 3.7 - Resumo estatístico dos dados obtidos durante o monitoramento da ETE - piloto para o efluente do sistema de lodos ativados.

Variável	Efluente Lodos Ativados (Aeração Prolongada)							Efluente Lodos Ativados (Convencional)						
	Nº amostras	**Média**	**Desvio Padrão**	**Valor Mínimo**	**Valor Máximo**	**Eficiência média de Remoção (LA)**	**Eficiência média de Remoção (UASB + LA)**	**Nº amostras**	**Média**	**Desvio Padrão**	**Valor Mínimo**	**Valor Máximo**	**Eficiência média de Remoção (LA)**	**Eficiência média de Remoção (UASB + LA)**
pH	14	7,16	0,53	6,34	7,93			7	6,82	0,84	5,60	7,64		
Temperatura (° C)	14	21,8	2,1	18,3	24			7	24,5	0,9	23,3	25,6		
AP (mg $CaCO_3.L^{-1}$)	14	90	70	8,0	224			7	89	83	0	194		
AT (mg $CaCO_3$ $.L^{-1}$)	14	119	87	18	281			7	117	105	3	252		
Abs 254 nm	13	0,384	0,101	0,213	0,557	47%	71%	7	0,212	0,034	0,163	0,269	61%	79%
Turbidez (uT)	13	24,5	7,9	11,0	37,0	84%	87%	7	18,0	21,3	6,3	65,3	77%	86%
DQO ($mg.L^{-1}$)	14	148	55	66	234	59%	79%	7	70	24	45	116	57%	87%
ST ($mg.L^{-1}$)	10	296	99	97	420	27%	67%	7	284	83	102	336	19%	38%
SST ($mg.L^{-1}$)	11	46	24	20	97	61%	77%	7	31	16	14	60	54%	82%
SDT ($mg.L^{-1}$)	10	250	93	52	353	19%	51%	7	261	76	97	315	17%	13%

Nota: AP: alcalinidade parcial; AT: alcalinidade total; DQO: demanda química de oxigênio; ST: sólidos totais; SST: sólidos suspensos totais; SDT: sólidos dissolvidos totais; LA: lodos ativados.

3.4.1.1 - pH

O potencial hidrogeniônico é importante para a caracterização de esgotos sanitários, pois pode influenciar em diversos equilíbrios químicos e na diversidade do ecossistema microbiano nos processos biológicos de tratamento (METCALF; EDDY, 2003; PIVELI; KATO, 2005). Em processos anaeróbios, o pH ótimo depende do tipo de microrganismo e do substrato; bactérias acidogênicas têm crescimento ótimo na faixa de pH de 5,0 a 6,0, enquanto que bactérias metanogênicas, entre 6,6 e 7,4 (CHERNICHARO, 2007).

Os valores encontrados ficaram próximos à neutralidade durante os processos de tratamento, o que ajudou a manter o bom funcionamento dos processos biológicos de tratamento.

3.4.1.2 - Temperatura

A temperatura influencia a velocidade das reações bioquímicas de decomposição de compostos orgânicos presentes na água residuária, bem como na seleção de espécies microbianas (CHERNICHARO, 2007). A temperatura mais baixa registrada foi de 18,3°C, o que para reatores anaeróbios (reator UASB), permite a operação à temperatura ambiente, e na faixa ótima de grupos microbianos mesofílicos como os acetoclásticos e hidrogenotróficos formadores de metano (METCALF; EDDY, 2003; PIVELI; KATO, 2005; CHERNICHARO, 2007).

3.4.1.3 - Alcalinidade

Parâmetro de extrema importância no monitoramento de reatores biológicos para produção de efeito tampão que consiga impedir queda brusca de pH em caso de desequilíbrio (METCALF; EDDY, 2003; PIVELI; KATO, 2005). Observa-se que o reator UASB produziu alcalinidade, o que se correlaciona ao aumento de pH registrado após o tratamento anaeróbio. Esta produção de alcalinidade se torna necessária também para manter o pH próximo à neutralidade no sistema de lodos ativados, onde a oxidação de nitrogênio amoniacal produz ácidos. Na grande maioria das amostras não foi verificado decréscimo dos valores de pH.

A alcalinidade total pode ser expressa como a soma das alcalinidades parcial e intermediária. A primeira se refere praticamente à alcalinidade bicarbonato, enquanto a última está relacionada à alcalinidade de ácidos orgânicos voláteis. Para reatores

anaeróbios, o acúmulo de ácidos orgânicos voláteis pode representar desequilíbrio no sistema ao indicar baixa atividade de arqueas metanogênicas. Dessa forma, relação entre alcalinidades intermediária e parcial superior a 0,3 pode indicar distúrbios no processo anaeróbio. Porém, a estabilidade do processo pode ocorrer em valores diferentes de 0,3 (CHERNICHARO, 2007).

Na figura 3.9 podem ser visualizados os valores dessa relação, encontrados no efluente do reator UASB.

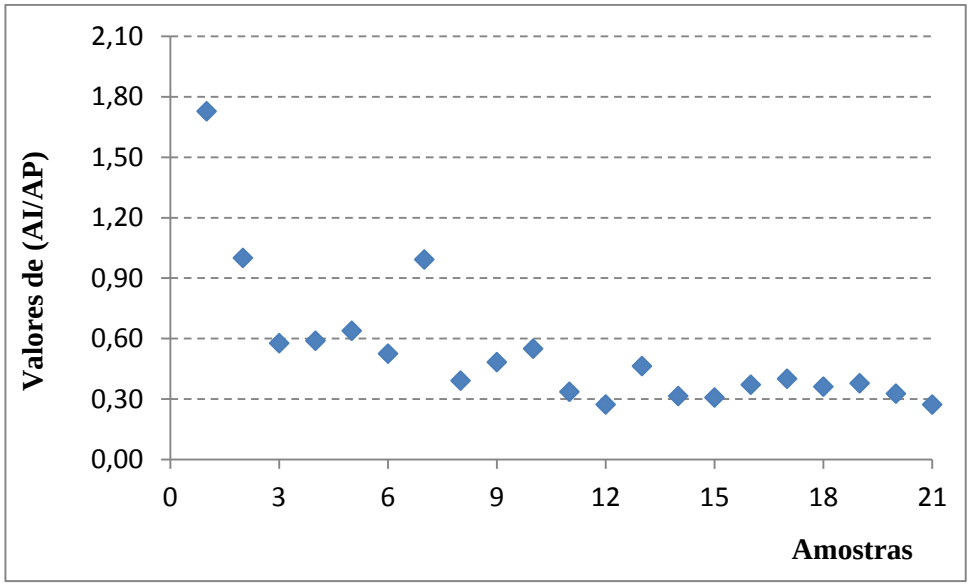


Figura 3.9 - Relação entre alcalinidades intermediária e parcial (AI/AP) nas amostras de efluente do reator UASB.

Poucas foram as amostras que apresentaram AI/AP menores que 0,3, porém mais de 80% das amostras, os valores foram menores que 0,6. Observa-se também que a partir da terceira amostragem, aproximadamente dois meses após o início do controle operacional, o reator mostrou tendência à estabilização.

3.4.1.4 - Absorbância em 254 nm

Este parâmetro de fácil monitoramento foi realizado devido a um dos pós-tratamentos do efluente do sistema de lodos proposto ser a desinfecção por radiação ultravioleta. Neste caso, o tempo necessário para se atingir uma dose específica de radiação depende do valor de absorbância do efluente no comprimento de onda de 254 nanômetros.

A contínua diminuição dos valores de absorbância pode ser verificada à medida que se avança no tratamento do efluente, chegando próximo a 80% de redução.

3.4.1.5 - Turbidez

A turbidez é o grau de atenuação da intensidade luminosa que um feixe de luz sofre ao atravessar uma amostra líquida, devido à presença de sólidos suspensos. Esta variável física foi monitorada com o intuito de associá-la à concentração e à remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium.*

No afluente, foram verificados valores elevados em algumas amostras, até mesmo mais de 3.000 uT. O reator UASB não apresentou remoção significativa, possivelmente devido ao arraste de sólidos por bolhas de gases para o efluente deste reator. Com relação aos sistemas de lodos ativados, as remoções acima de 85% evidenciam a presença de flocos biológicos com boa sedimentação no decantador secundário.

3.4.1.6 - Demanda Química de Oxigênio

A DQO no afluente foi bastante variável, com valores acima de 4.000 $mg.L^{-1}$, sendo válido relatar que aconteceram alguns episódios de entrada de efluentes de origem desconhecida, como pode ser visualizado na figura 3.10.

Figura 3.10 - Exemplos de episódios da entrada de efluentes de origem desconhecida na ETE - piloto (USP - São Carlos).

Este fato pode explicar a variabilidade do reator UASB em remover a DQO; no entanto a média de remoção ficou próxima à relatada por Oliveira e von Sperling (2005)

de 59%. Mesmo assim, após os sistemas de lodos ativados, observam-se remoções médias de 79 e 87%, para aeração prolongada e convencional, respectivamente. Em artigo de revisão sobre reatores UASB, Chong et al. (2012) relatam que, quando o sistema de lodos ativados é utilizado como pós-tratamento, há remoções entre 84 e 99 % de DQO, enquanto Mungray e Patel (2011) citam valores médios de remoção de DQO de 82 e 86% de duas ETEs (UASB + lodos ativados), valores próximos aos encontrados neste trabalho.

3.4.1.7 - Sólidos

Os sólidos apresentaram grande variabilidade no afluente, o que possivelmente explica a variabilidade de DQO, turbidez, absorbância em 254 nm. A remoção média de sólidos suspensos totais pelo reator UASB ficou abaixo da relatada por Oliveira e von Sperling (2005), de 67 %. O lodo ativado operado tanto em aeração prolongada, quanto no convencional, apresentou remoções bastante similares, principalmente de sólidos suspensos totais. Ao se analisar o reator UASB somado ao sistema de lodos ativados, observa-se que a aeração prolongada proporcionou remoções de ST, SDT e SST acima de 50%. No entanto, o sistema convencional de lodo ativado junto com o reator UASB mostrou remoção "satisfatória" apenas dos sólidos suspensos totais. Chong et al. (2012) relatam remoções entre 62 e 98%, enquanto Mungray e Patel (2011), 60 e 64% para a mesma configuração de tratamento: UASB seguido de lodos ativados.

3.4.2 - Monitoramento microbiológico

3.4.2.1 - Microrganismos Indicadores

As figuras 3.11, 3.12 e 3.13 representam, respectivamente, as concentrações de coliformes totais, *E. coli* e *Clostridium perfringens* encontradas durante o tratamento de esgoto.

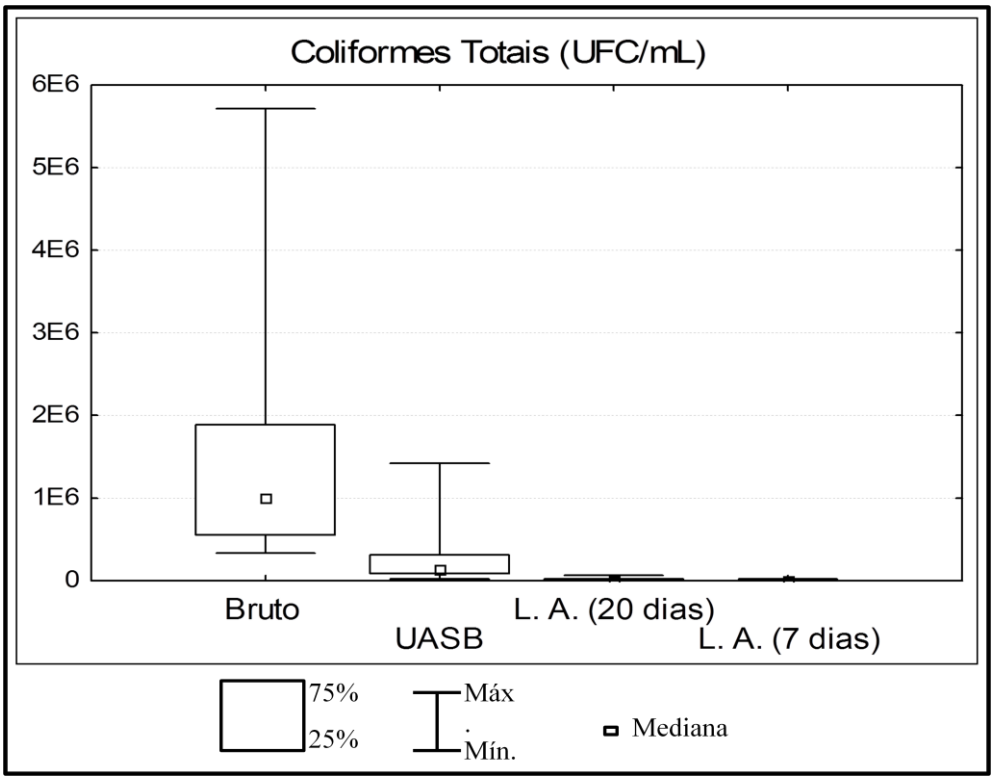


Figura 3.11 - Concentração de coliformes totais nas unidades de tratamento da ETE - piloto.

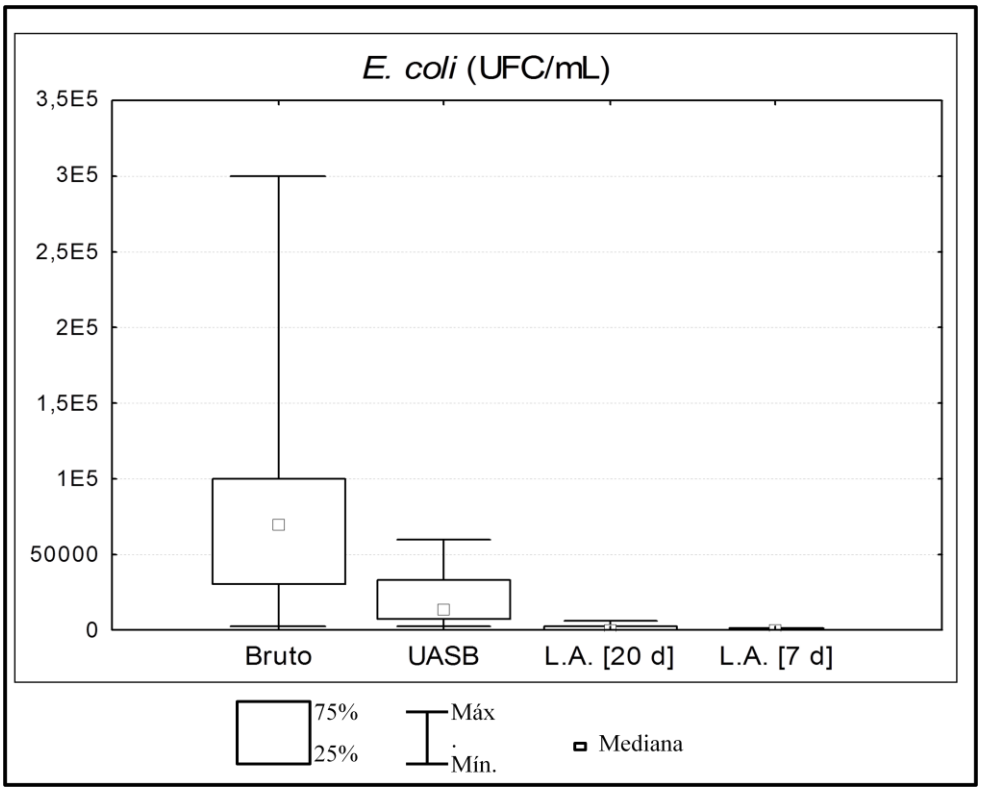


Figura 3.12 - Concentração de *Escherichia coli* nas unidades de tratamento da ETE - piloto.

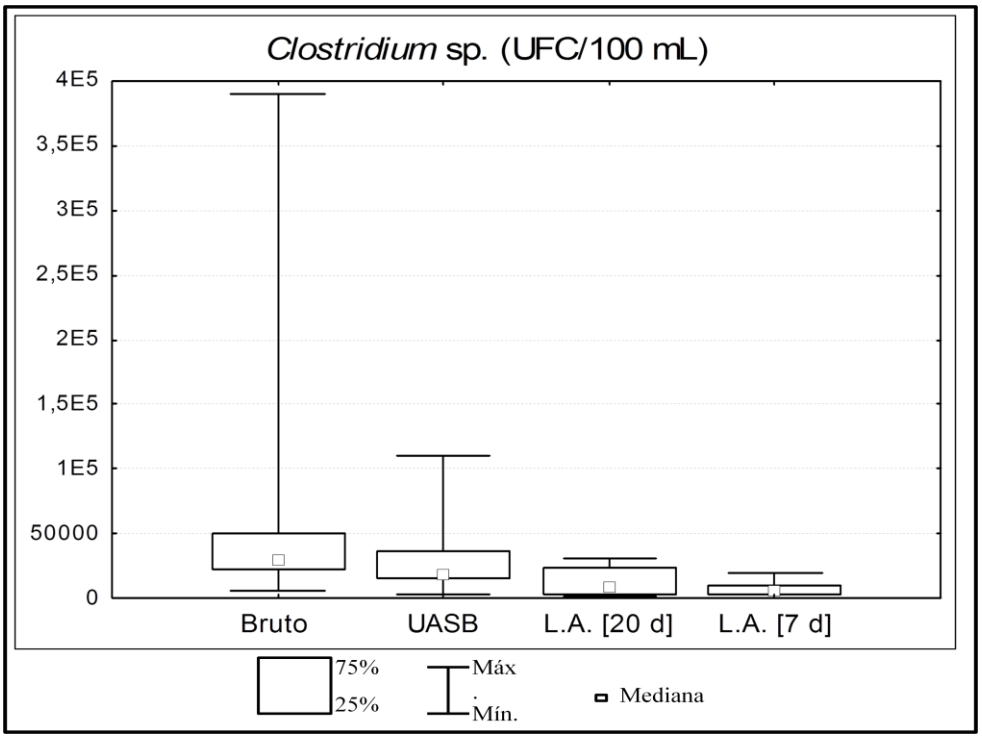


Figura 3.13 - Concentração de *Clostridium perfringens* nas unidades de tratamento da ETE - piloto.

Podem ser verificadas altas concentrações dos indicadores de contaminação fecal - coliformes totais, *E. coli* e *C. perfringens* - no esgoto bruto, com médias geométricas de: 1,2 x 10^6 por mL; 5,0 x 10^4 por mL e 3,8 x 10^4 por 100 mL, respectivamente. Oliveira e von Sperling (2005) citam valor médio de 9,4 x 10^7 coliformes fecais em 100 mL para afluentes de 166 ETEs em operação no país. Kistemann et al. (2008) encontram concentrações médias para esgoto bruto, 0,3 a 1,3 x 10^7 *E. coli* por 100 mL; 1,2 a 6,4 x 10^7 coliformes totais por 100 mL e de 0,5 a 3,3 x 10^5 *Clostridium perfringens*, por 100 mL de amostra.

Elevadas concentrações desses três indicadores também foram encontradas no efluente do reator UASB, com médias geométricas de: 1,5 x 10^5 de coliformes totais por mL, 1,4 x 10^4 de *E. coli* por mL e 1,8 x 10^4 de *C. perfringens* por 100 mL. Oliveira e von Sperling (2005) relatam valores entre 4 x 10^6 e 7 x 10^7 coliformes fecais em 100 mL para efluentes de 10 reatores UASB em operação no país.

Mesmo após o tratamento pelo sistema de lodos ativados, foram encontradas concentrações de coliformes totais de 1,1 x 10^4 por mL (aeração prolongada) e 2,2 x 10^3 por mL (convencional). Quanto à *E. coli*, 3,6 x 10^2 por mL para a operação em aeração

prolongada e 1,3 x 10^2 por mL, quando operado com tempo de retenção celular do modo convencional.

Oliveira e von Sperling (2005) relatam valores entre 3 x 10^4 e 3 x 10^5 coliformes fecais em 100 mL para efluentes de 13 ETEs com sistema de lodos ativados em operação no país. Chong et al. (2012) descrevem que efluentes de lodos ativados operados após reatores UASB conseguiram remoção média de 2,5 log, com efluente final contendo 9 x 10^4 coliformes fecais por 100 ml de amostra.

As médias geométricas das concentrações de *Clostridium perfringens* encontradas no efluente dos sistemas de lodos ativados (aeração prolongada e convencional) foram, respectivamente, de: 7,2 x 10^3 e 5,8 x 10^3 UFC por 100 mL.

As remoções médias de microrganismos indicadores, conseguidas através dos processos biológicos de tratamento, podem ser visualizadas na tabela 3.8.

Tabela 3.8 - Remoção de coliformes totais, *E. coli* e *Clostridium perfringens* no reator UASB e nos dois sistemas de Lodos Ativados - aeração prolongada e convencional, na ETE - piloto.

	UASB		**Lodos Ativados A.P.**		**Lodos Ativados Conv.**	
	n	Média (log) [min - máx]	n	Média (log) [min - máx]	n	Média (log) [min - máx]
Coliformes totais	21	0,90 [0,4 a 2,0]	14	1,15 [0,11 a 2,18]	7	1,76 [0,74 a 3,06]
Escherichia coli	21	0,57 [0,02 a 2,15]	14	1,45 [0 a 2,64]	7	2,30 [1,54 a 3,21]
Clostridium perfringens	17	0,36 [0 a 1,17]	10	0,47 [0,16 a 0,87]	7	0,41 [0 a 0,96]

Nota: A.P.: aeração prolongada; Conv.: convencional; n : número de amostras.

Oliveira e von Sperling (2005) encontraram eficiência de remoção de até 1,3 log para coliformes fecais em 10 reatores UASB em operação no país e 1,4 a 2,8 log em sistemas de lodos ativados, convencional e aeração prolongada respectivamente, em operação no país.

Wen et al. (2009), ao analisar reatores em escala de laboratório, relatam que a baixa remoção de esporos de *Clostridium perfringens* foi devida à adsorção irreversível aos flocos de lodo que ao saírem junto com o efluente também carreiam concentrações elevadas desse microrganismo.

3.4.2.2 - Protozoários patogênicos

As concentrações de cistos de *Giardia* encontradas durante o tratamento podem ser visualizadas na figura 3.14.

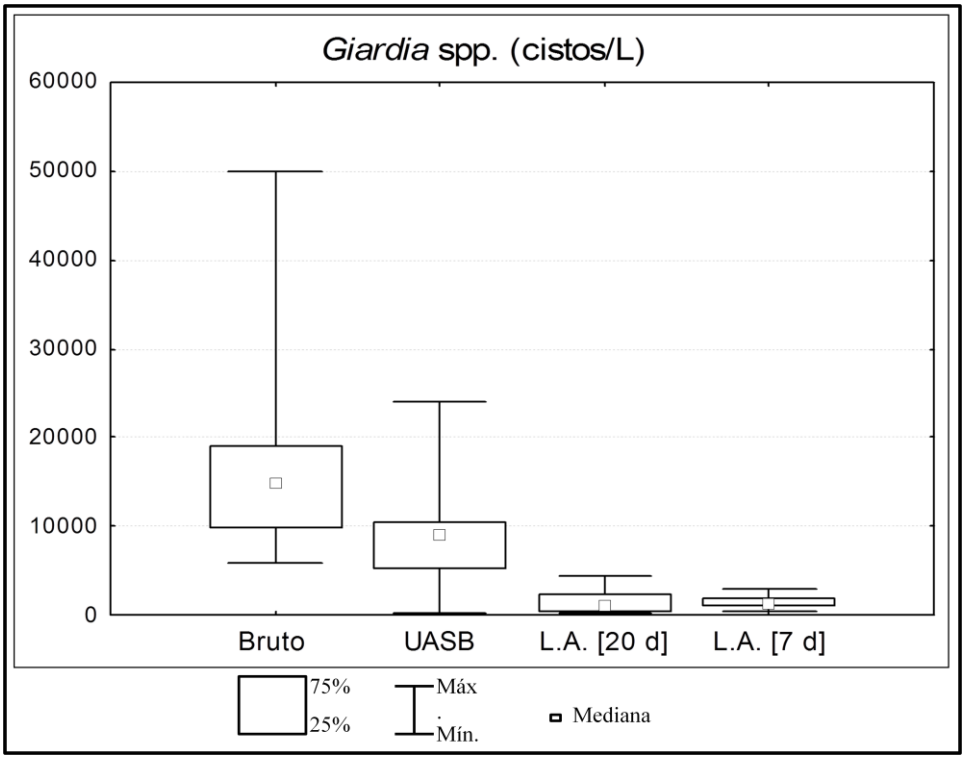


Figura 3.14 - Concentração de cistos de *Giardia* nas unidades de tratamento da ETE - piloto.

Primeiramente, vale ressaltar que todas as amostras analisadas (51), sejam do afluente bruto ou efluentes tratados, foram positivas para cistos de *Giardia*. No esgoto bruto foram encontradas elevadas concentrações de cistos de *Giardia*, com média geométrica de 1,5 x 10^4 por litro. As concentrações de cistos se mantiveram altas após o tratamento anaeróbio por reator UASB - 6,6 x 10^3 por litro - pois houve decréscimo, em média, de apenas 0,36 log. No efluente do sistema de lodos ativados por aeração prolongada, em média, foram contabilizados 1,0 x 10^3 cistos por litro; no entanto, quando ocorreu a mudança de operação para convencional, foram encontrados 1,3 x 10^3 cistos por litro.

Oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados em 16 das 51 amostras pesquisadas (31,4%). As concentrações médias e a porcentagem de amostras positivas de cada efluente estão apresentados na tabela 3.9.

Tabela 3.9 - Distribuição de amostras positivas e a média geométrica das amostras positivas encontradas para oocistos de *Cryptosporidium*.

Tipo de Efluente	**n° amostras analisadas**	**Porcentagem de amostras positivas**	**Média Geométrica (oocistos por litro)**
Bruto	17	41% (7/15)	$3,1 \times 10^2$
UASB	17	23,5% (4/15)	$2,0 \times 10^2$
LA - aeração prolongada	10	20 % (2/10)	$1,2 \times 10^2$
LA - convencional	7	44 % (3/7)	$3,4 \times 10^1$

Nota: LA: Lodos Ativados.

Resultados para *Giardia* e *Cryptosporidium* encontrados neste estudo são mais agravantes do que os relatados por Ottoson et al. (2006). Esses autores detectaram oocistos de *Cryptosporidium* em 26,3% com 5 oocistos, em média, por litro das amostras de esgoto bruto e em apenas (1/18) das amostras de esgoto tratado por sistema de lodos ativados. Ao mesmo tempo, foram encontrados em média 1300 cistos de *Giardia* por litro no esgoto bruto e (2/18) amostras foram positivas para *Giardia* após sistema de lodos ativados.

As concentrações de oocistos em esgoto bruto foram próximas as encontradas por Farias et al. (2002), de 80 a 912 oocistos de *Cryptosporidium* por litro. No entanto, um pouco superior aos resultados de Montemayor et al. (2005), os quais relatam média de 103 a 139 oocistos/L em esgoto bruto e de 1,8 a 5,6 oocistos por litro em efluente tratado por lodos ativados em cinco ETEs na Espanha.

Moulin et al. (2010), na França, encontraram, em esgoto não tratado, cistos de *Giardia* em 100% das amostras e *Cryptosporidium* em 86%, com concentração média de $1,8 \times 10^4$ cistos em amostras de 10 litros e $1,8 \times 10^2$ oocistos em 10 litros. Para esgoto tratado por lodos ativados, *Giardia* estava presente em 86% das amostras e *Cryptosporidium* em 32%, em concentrações médias de 59 cistos em 10 litros e 4,9 oocistos em 10 litros de amostra.

Bonatti et al. (2007) reportaram amostras de efluente de lodos ativados contaminadas por *Giardia* ($1,0 \times 10^5$ cistos.L^{-1}) e *Cryptosporidium* ($3,6 \times 10^3$ oocistos.L^{-1}). Santos et al. (2004), encontraram em amostras de efluente de lodos ativados, em média, $5,8 \times 10^5$ cistos de *Giardia* por litro, e $1,0 \times 10^4$ oocistos de *Cryptosporidium* por litro, em ETE da região de Campinas - SP; resultados de concentração superiores aos encontrados no presente estudo.

Há estudos conduzidos por outros autores em países como Espanha, Malásia e Tunísia, onde Castro-Hermida et al. (2008), Lim et al. (2007) e Ben- Ayed et al. (2009) encontraram cistos de *Giardia* em 100% das amostras de esgoto bruto. Castro-Hermida et al. (2008) relatam ainda positividade de 100% amostras de esgoto bruto e tratado para oocistos de *Cryptosporidium* , enquanto Lim et al. (2007), positividade para esse micro-organismo em 50% das amostras de esgoto bruto e 25% das de esgoto tratado. Em ambos os casos, o tratamento utilizado era lodos ativados.

Reinoso et al. (2008) encontraram, em esgoto bruto, média de 280,9 cistos por litro e de 45,7 oocistos por litro, enquanto Chávez et al. (2011) encontraram de 70 a 5567 cistos de *Giardia* por litro.

Segundo Castro - Hermida et al. (2008), existe a possibilidade de os sistemas de aeração no lodos ativados resuspenderem (oo)cistos, favorecendo com que eles saiam no efluente. Neste caso, o tempo de detenção hidráulica no decantador pode não ser suficiente, visto que (oo)cistos possuem baixa velocidade de sedimentação.

As concentrações de cistos de *Giardia* em esgoto bruto e tratado relatadas no presente trabalho estiveram sempre um pouco superiores às da literatura, com exceção ao trabalho de Bonatti et al. (2007). Esta afirmação não se confirma quanto à concentração de oocistos de *Cryptospordium*.

A alta concentração de cistos de *Giardia* presente no esgoto reflete a incidência desse parasito na população (OTTOSON et al., 2006; CHENG et al., 2009; NASSER et al., 2012) e pode ser explicada pelo fato da giardíase ser endêmica no Brasil (BONATTI et al., 2007). Apesar de não existir nenhum dado oficial de surto no país, há estudos que revelam alta prevalência deste parasita na população, principalmente em áreas com condições sanitárias precárias (RAZZOLINI et al., 2011), como também pode ser visto no capítulo 1 deste trabalho.

As remoções de cistos de *Giardia* conseguidas através do tratamento biológico promovido pelo reator UASB e sistema de lodos ativados podem ser visualizadas na figura 3.15.

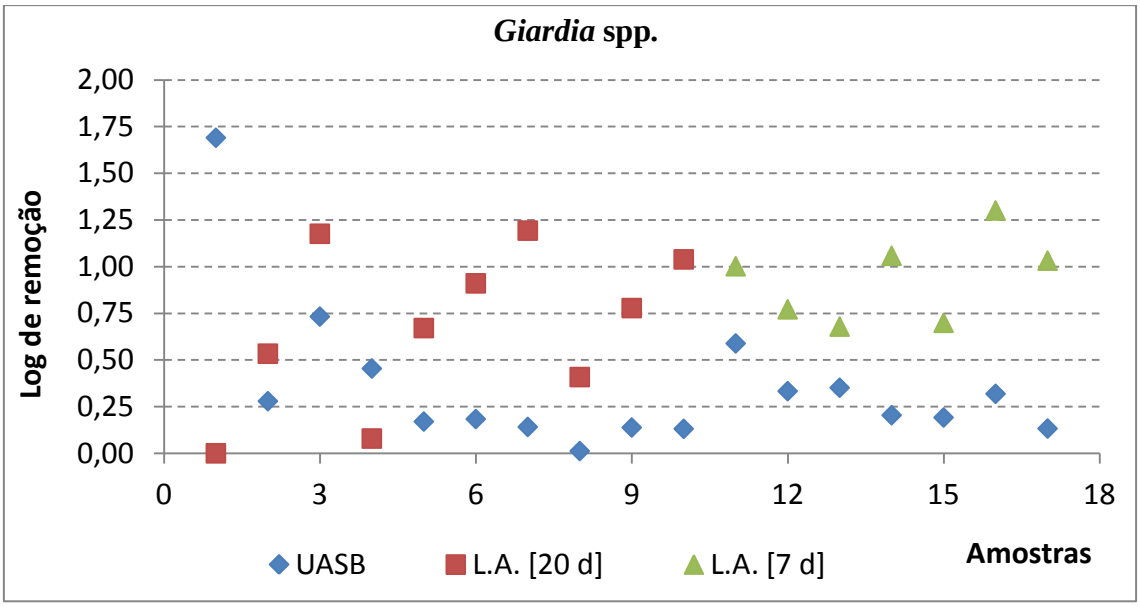


Figura 3.15 - Remoção de cistos de *Giardia* no reator UASB e na operação do sistema de Lodos Ativados (L.A.) com dois tempos de residência celular - 7 e 20 dias - na ETE - piloto.

Foram encontradas remoção média de cistos de *Giardia* promovida pelo reator UASB de 0,36 (0,01 a 1,69) log; o sistema de lodos ativados por aeração prolongada conseguiu 0,68 (0 a 1,19) log de remoção e o de lodos ativados convencional, 0,93 log (0,68 a 1,30), valores próximos aos relatados por Robertson et al. (2000), Lim et al. (2007) e Gallas-Lindemann et al. (2013) e inferiores aos descritos por Cantusio Neto et al. (2006).

Mesmo com o tratamento, a concentração final de protozoários patogênicos no efluente do lodos ativados ainda se mostrou elevada, podendo ser perigosa fonte de contaminação, devido principalmente à presença de (oo)cistos viáveis, como pode ser visto na figura 3.16.

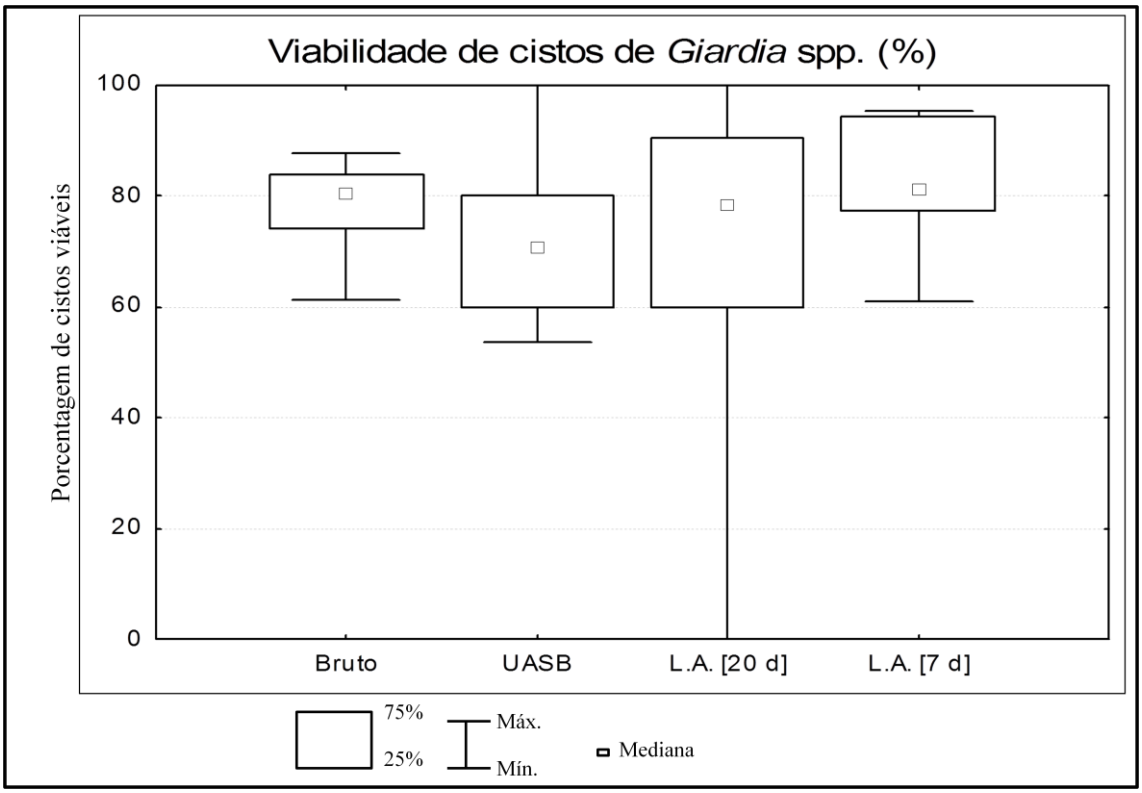


Figura 3.16 - Viabilidade de cistos de *Giardia* nas unidades de tratamento da ETE - piloto.

Não houve diferença estatística entre as porcentagem viáveis dos mesmos ($p > 0,05$, testes de Wilcoxon e Mann-Whitney), alcançando valores de 0 a 100% em efluente de lodos ativados com aeração prolongada e entre 61 e 95% para cistos de *Giardia* avaliados após lodos ativados convencional. A grande maioria dos oocistos de *Cryptosporidium*, contabilizados nos diferentes efluentes do tratamento, estavam viáveis (90,5%), inferida pela não penetração do iodeto de propídeo no oocisto.

Montemayor et al. (2005), ao analisarem a viabilidade de oocistos de *Cryptosporidium* com DAPI e iodeto de propídeo de cinco ETEs na Espanha, verificaram que, em média, 35,2% estavam viáveis em amostras de esgoto bruto; e que de 26 a 35% estavam viáveis em amostras de efluentes secundários após tratamento por lodos ativados.

Robertson et al. (1999) descrevem cistos viáveis de *Giardia* em maior porcentagem no efluente que no afluente, o que indicaria que os cistos não estão sendo inativados e o tratamento está sendo seletivo na remoção de cistos não viáveis. Ainda segundo os autores, isso pode ser devido ao fato de serem mais facilmente agregados aos sólidos e por consequência, mais facilmente sedimentados no decantador. O relato

desses autores pode explicar a elevada fração de cistos viáveis encontrada no efluente do sistema de lodos ativados no presente estudo.

3.4.2.3 - Comparação de concentrações e remoções de microrganismos

Primeiramente, não foi realizada análise de correlação para *Cryptosporidium* por causa dos poucos dados com resultado positivo para a presença desse microrganismo.

Os reatores conseguiram remover tanto microrganismos indicadores quanto cistos de *Giardia*; visto que, a partir dos dados, as concentrações afluente e efluente de microrganismos em cada reator da etapa de tratamento foram significativamente diferentes ($p < 0,05$, testes de Wilcoxon e Mann-Whitney).

A eficiência total de remoção do sistema composto por reator UASB e lodos ativados variou conforme o microrganismo, como pode ser visualizado nas figuras 3.17 e 3.18.

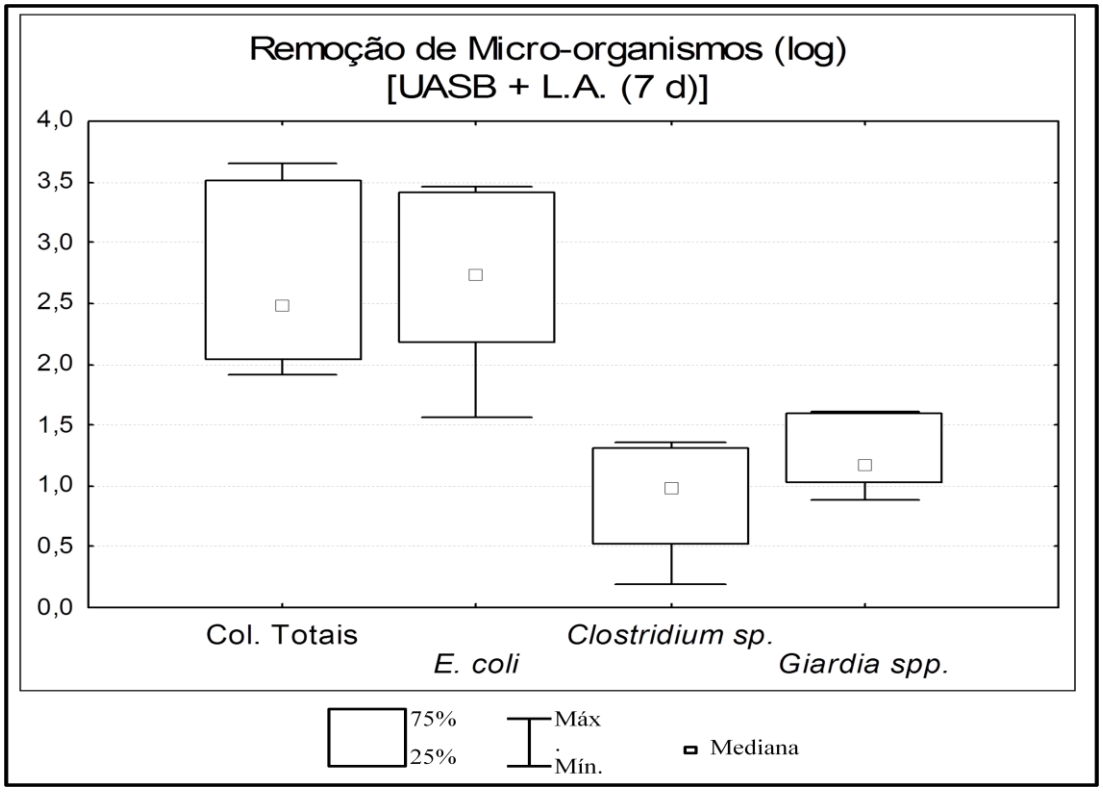


Figura 3.17 - Eficiência da ETE - piloto (UASB seguido de lodos ativados convencional) em remover microrganismos indicadores e cistos de *Giardia*.

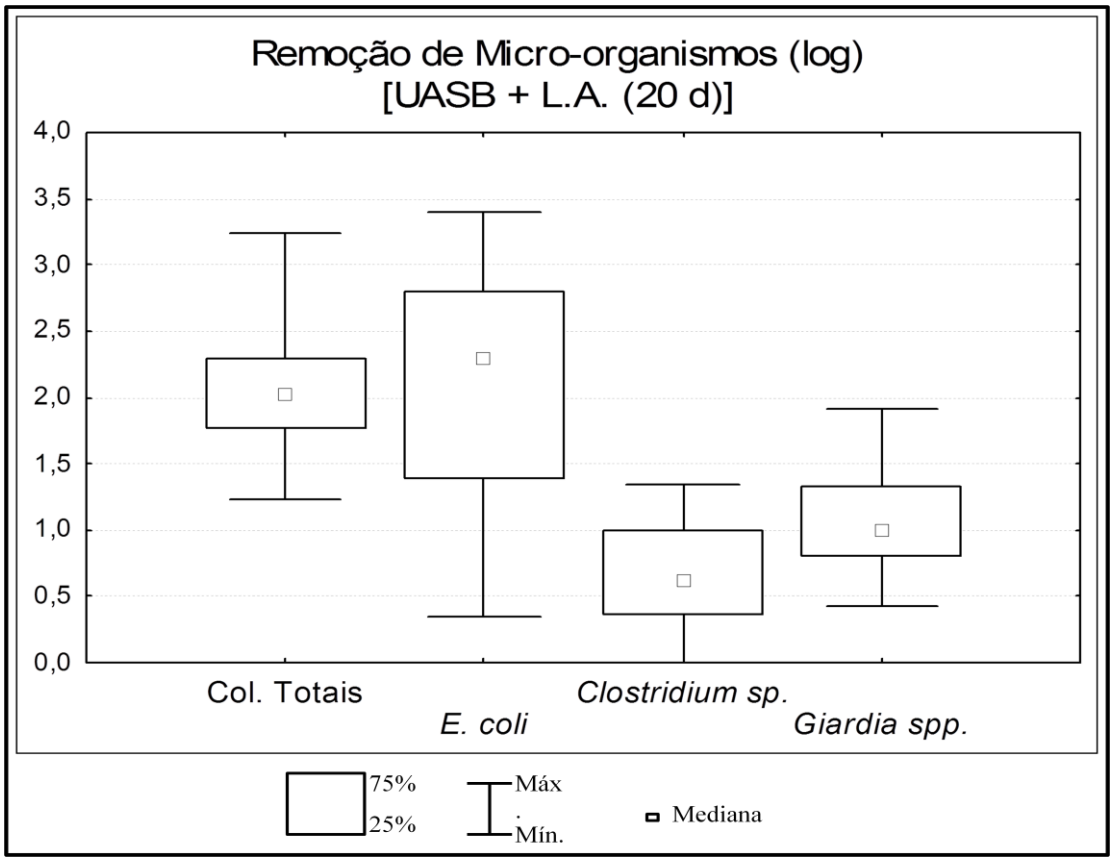


Figura 3.18 - Eficiência da ETE - piloto (UASB seguido de lodos ativados por aeração prolongada) na remoção de microrganismos indicadores e cistos de *Giardia*.

De modo geral, os tratamentos biológicos estudados (UASB seguido de lodos ativados aeração prolongada), juntos, obtiveram remoções médias de: 2,06 log (1,24 a 3,24) para coliformes totais, 2,10 log (0,35 a 3,40) para *E. coli*, 0,68 log (0 a 1,35) para *Clostridium* sp. e 1,04 log (0,42 a 1,91) para cistos de *Giardia* spp.

No outro caso, UASB e lodos ativados - convencional, as remoções médias foram de: 2,62 log (1,91 a 3,66) para coliformes totais; 2,67 log (1,56 a 3,46) para *E. coli*; 0,88 log (0,19 a 1,37) para *Clostridium perfringens* e 1,24 log (0,89 a 1,62) para cistos de *Giardia* spp..

Ao se avaliar os dois tipos de sistemas de lodos ativados empregados, as remoções de micro-organismos não mostram diferenças significativas ($p > 0,05$, teste t), exceto para *E. coli*, cuja remoção através do sistema de lodos ativados por aeração prolongada foi menor que a remoção do sistema convencional ($p = 0,019$, teste t).

Zhang e Farahbakhsh (2007) relatam média de 1,9 log de remoção para coliformes totais em sistema de lodos ativados. Mungray e Patel (2010) relatam remoção de coliformes totais de até 3 unidades logarítmicas, para ETE com reator

UASB seguido de lodos ativados, enquanto que Francy et al. (2012) encontraram remoções médias de *E. coli* de 3,04 log (2,28 a 3,84) e de coliformes totais de 2,89 log (1,96 a 3,37), próximos aos do presente estudo.

Observam-se também nas figuras 3.17 e 3.18 remoções de microrganismos mais resistentes à desinfecção – *Giardia* e *C. perfringens* - estatisticamente menores que as remoções de coliformes totais e *E. coli* ($p < 0,05$, teste t) para os dois sistemas de lodos ativados, aeração prolongada e convencional.

São poucos os estudos existentes a mostrar o decaimento da concentração de microrganismos patogênicos e indicadores no tratamento de esgoto convencional (CHENG et al., 2009; WEN et al., 2009; LEVANTESI et al., 2010).

Wen et al. (2009) encontraram 2,41 log de remoção para *Cryptosporidium* e 2,49 log para *Giardia* em tratamento por lodos ativados em escala de bancada, superiores aos resultados encontrados no presente estudo. Segundo os autores, a remoção desses protozoários é devida principalmente a sua fixação ao floco biológico em suspensão que posteriormente é sedimentado no decantador. Esses mesmos autores relatam que a temperatura também pode afetar a remoção de bactérias e de (oo)cistos de protozoários à medida que influencia na viscosidade do esgoto e na adsorção física e química dos microrganismos ao floco.

Cheng et al. (2009) relatam que agitação física promovida por sistemas de aeração pode causar rompimento mecânico de cistos e oocistos. Esses autores encontraram até 2 log de remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em ETEs na Irlanda operadas com lodos ativados por aeração prolongada. Levantesi et al. (2010) encontraram de 1 a 2 log de remoção de (oo)cistos em sistema de lodo ativado convencional na Espanha.

No estudo de Castro-Hermida et al. (2008), a eficiência média de remoção das ETEs pesquisadas foi de 16 a 86% para oocistos de *Cryptosporidium* e entre 2 e 90% para cistos de *Giardia*. Lim et al. (2007) obtiveram remoção de 96% de cistos de *Giardia* e 73% de oocistos de *Cryptosporidium* em lodos ativados com aeração prolongada.

Foi realizado teste estatístico no intuito de se busca correlação entre as concentrações de microrganismos indicadores e o protozoário patogênico *Giardia* spp., como é mostrado na tabela 3.10.

Há uma tendência significativa de os dados de concentração de *E. coli* no esgoto bruto e nos efluentes do reator UASB e lodos ativados (aeração prolongada) estarem

correlacionados aos de coliformes totais, resultado similar aos de Mungray e Patel (2011), o mesmo não ocorrendo para os outros micro-organismos. Wen et al. (2009) relatam que a bactéria *Clostridium perfringens* também não esteve correlacionada aos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium*.

Tabela 3.10 - Resultados de correlação (coeficiente r - Spearman, teste não-paramétrico) entre concentrações de *Giardia* spp. e indicadores fecais para diferentes efluentes.

Correlações	**Bruto**	**UASB**	**Lodo Ativado (Aer. Prol.)**	**Lodo Ativado (Conv.)**
Coliformes totais x *E. coli*	**0,67**	**0,51**	**0,63**	0,71
Coliformes totais x *Clostridium*	0,31	0,30	0,56	0,54
Clostridium x *Giardia*	0,12	0,15	-0,27	0,21
E. coli - *Clostridium*	0,05	0,20	0,17	0,58
E. coli x *Giardia*	-0,02	0,31	-0,42	-0,29
Clostridium x *Giardia*	0,40	-0,15	0,14	0,16

Nota: Aer. Prol.: Aeração prolongada; Conv.: convencional.

Em negrito, valores de correlação significativos ($p < 0,05$)

Também foi realizado teste estatístico para buscar correlação entre as remoções (em unidades logarítmicas) de microrganismos indicadores e o protozoário patogênico *Giardia* spp., como é mostrado na tabela 3.11.

Tabela 3.11 - Resultados de correlação (coeficiente r - Spearman, teste paramétrico) entre as remoções (em log) de *Giardia* spp. e indicadores fecais.

Correlações	**UASB**	**L.A. (A.P)**	**UASB + L.A. (A.P.)**	**L.A. (Conv.)**	**UASB + L.A. (Conv.)**
Col. totais x *E. coli*	**0,70**	0,29	**0,67**	0,64	0,60
Col. totais x *Clostridium*	0,06	-0,04	0,18	-0,15	0,45
Clostridium x *Giardia*	-0,12	0,53	-0,50	-0,05	0,35
E. coli - *Clostridium*	-0,12	-0,19	0,12	0,39	0,15
E. coli x *Giardia*	-0,08	0,38	-0,40	0,51	-0,21
Clostridium x *Giardia*	-0,03	0,56	-0,42	**0,96**	**0,79**

Nota: L.A.: Lodos Ativados; A.P..: Aeração prolongada; Conv.: convencional. Col.: Coliformes.

Em negrito, valores de correlação significativos ($p < 0,05$).

Ao se analisar os resultados de correlação das remoções em unidades logarítmicas, houve significativas correlações, em poucos casos, entre coliformes totais e *E. coli*, e entre *Clostridium perfringens* e *Giardia* spp.

Diferentemente dos resultados encontrados por Reinoso et al. (2008) e Levantesi et al. (2010), foram poucas as correlações entre indicadores fecais e o protozoário patogênico *Giardia*. Isso pode ser devido às diferentes constantes de decaimento dos microrganismos no decorrer do tratamento biológico, como citado por Reinoso et al. (2008).

Em se tratando de correlações entre as concentrações de microrganismos indicadores e *Giardia* spp. com variáveis físicas, as tabelas 3.12, 3.13 e 3.14 mostram os resultados dos testes estatísticos para turbidez, absorbância 254 nm e sólidos suspensos totais, respectivamente.

Tabela 3.12 - Resultados de correlação (coeficiente r - Spearman, teste não-paramétrico) entre os valores de turbidez e as concentrações de microrganismos.

Correlações	**Bruto**	**UASB**	**Lodo Ativado (Aer. Prol.)**	**Lodo Ativado (Conv.)**
Turbidez x Coliformes totais	**0,75**	0,42	0,47	0,39
Turbidez x *E. coli*	0,37	-0,22	-0,06	-0,04
Turbidez x *Clostridium* sp.	0,35	0,45	0,41	0,61
Turbidez x *Giardia* spp.	0,20	-0,49	0,07	0,43

Nota: Aer. Prol.: Aeração prolongada; Conv.: convencional.

Em negrito, valores de correlação significativos ($p < 0,05$).

Tabela 3.13 - Resultados de correlação (coeficiente r - Spearman, teste não-paramétrico) entre os valores de absorbância 254 nm e as concentrações de microrganismos.

Correlações	**Bruto**	**UASB**	**Lodo Ativado (Aer. Prol.)**	**Lodo Ativado (Conv.)**
Abs 254 x Coliformes totais	**0,67**	**0,58**	**0,59**	**0,93**
Abs 254 x *E. coli*	0,33	0,06	0,42	0,64
Abs 254 x *Clostridium* sp.	0,14	**0,65**	0,45	0,56
Abs 254 x *Giardia* spp.	0,08	-0,35	-0,40	0,21

Nota: Abs 254: Absorbância em 254 nm; Aer. Prol.: Aeração prolongada; Conv.: convencional.

Em negrito, valores de correlação significativos ($p < 0,05$).

Tabela 3.14 - Resultados de correlação (coeficiente r - Spearman, teste não-paramétrico) entre concentrações de sólidos suspensos totais e as de microrganismos.

Correlações	**Bruto**	**UASB**	**Lodo Ativado (Aer. Prol.)**	**Lodo Ativado (Conv.)**
SST x Coliformes totais	**0,72**	0,42	0,27	0,11
SST x *E. coli*	0,35	-0,11	-0,01	-0,04
SST x *Clostridium* sp.	0,36	0,39	0,15	**0,76**
SST x *Giardia* spp.	0,30	-0,27	-0,12	0,54

Nota: Aer. Prol.: Aeração prolongada; Conv.: convencional; SST: sólidos suspensos totais.
Em negrito, valores de correlação significativos (valor $p < 0,05$).

A variável turbidez esteve correlacionado significativamente apenas à concentração de coliformes totais e somente no esgoto bruto. Os valores de absorbância 254 nm foi o parâmetro que mostrou maior número de correlações significativas, com coliformes totais no decorrer de todo o tratamento e para a concentração de *Clostridium perfringens* no efluente do reator UASB. Ao correlacionar às concentrações de sólidos suspensos totais, apenas as concentrações de coliformes totais no esgoto bruto e de *Clostridium* no efluente do lodos ativados convencional foram significativas.

3.4.3 - Pós-Tratamento de Efluente de Lodos Ativados com Filtro Lento de Areia.

Para o efluente do sistema de lodos ativados, foi proposta a filtração lenta em areia como pós-tratamento. Para isso, foram testados dois tipos de afluente ao filtro, com: carga orgânica e turbidez elevadas e baixas, cujas características estão apresentadas na tabela 3.15.

Tabela 3.15 - Características do esgoto tratado do lodos ativados por aeração prolongada e afluente ao filtro lento de areia.

Variáveis	**BCOT (média ± DP)**	**ACOT (média ± DP)**
pH	6,93 ± 0,68	7,11 ± 0,12
Temperatura (º C)	21,9 ± 2,43	22,2 ± 1,65
Alcalinidade total (mg $CaCO_3.L^{-1}$)	104 ± 59	96 ± 38
Alcalinidade parcial (mg $CaCO_3.L^{-1}$)	139 ± 74	132 ± 52
Absorbância 254 nm	0,218 ± 0,038	0,274 ± 0,046
Turbidez (uT)	11,84 ± 9,43	56,27 ± 16,12
DQO ($mg.L^{-1}$)	55 ± 22	122 ± 22
Coliformes totais (UFC/100mL)*	$1,2 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$
E. coli (UFC/100mL)*	$2,7 \times 10^4$	$5,3 \times 10^4$
Clostridium sp. (UFC/100mL)*	$3,9 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4$
Giardia spp. ($cistos.L^{-1}$)*	$6,0 \times 10^2$	$1,9 \times 10^3$
Cryptosporidium spp. ($oocistos.L^{-1}$)*	7,3	48

Nota: BCOT (baixas carga orgânica e turbidez); ACOT (altas carga orgânica e turbidez); DP: desvio padrão; DQO: demanda química de oxigênio; UFC: unidade formadora de colônias. uT: unidades de turbidez. * média geométrica.

3.4.3.1 - Efluente com Carga Orgânica e Turbidez Baixas

Este efluente foi bombeado de um tanque de armazenamento (figura 3.5, C) que recebia esgoto tratado do lodos ativados - após o decantador. Como o tempo de detenção hidráulica neste tanque era de aproximadamente uma hora, permitia sedimentação de sólidos suspensos ainda presentes e consequentemente de microrganismos associados, o que acarretou carga orgânica e turbidez baixas, conforme apresentado na tabela 3.15. O pós-tratamento foi dividido em duas carreiras: carreira 1 - com taxa de filtração de 4,26 m^3/m^2.dia, que teve duração de 75 horas e carreira 2 - com taxa de filtração de 2 m^3/m^2.dia, com duração de 216 horas.

3.4.3.1.1 - Turbidez

Os valores de turbidez das amostras durante o monitoramento de ambas carreiras de filtração podem ser visualizados nas figuras 3.19 e 3.20, para as carreira 1 e 2, respectivamente.

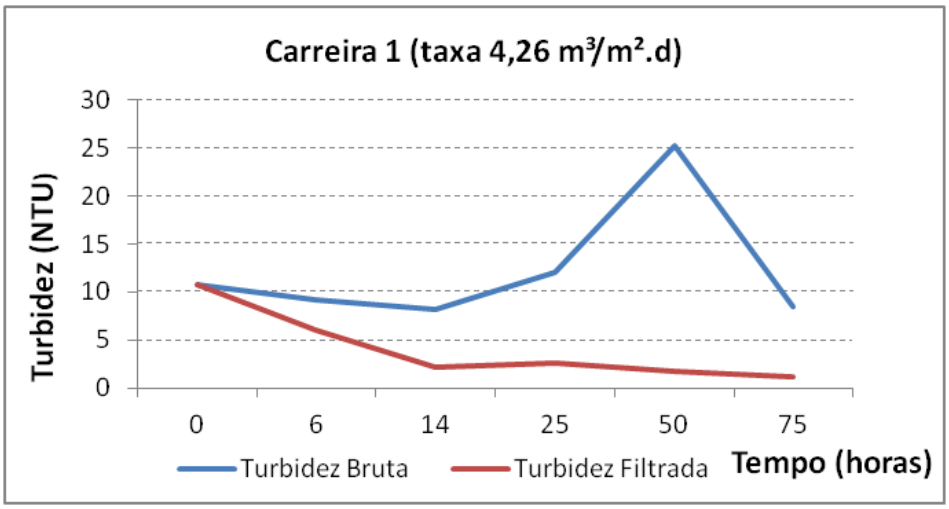


Figura 3.19 - Desempenho da carreira 1 do filtro lento recebendo baixas concentração orgânica e turbidez na remoção de turbidez.

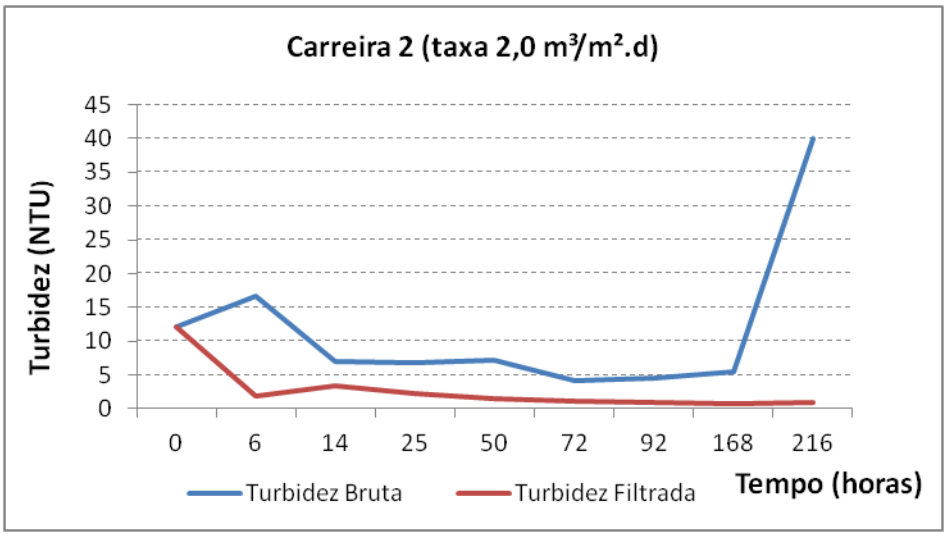


Figura 3.20 - Desempenho da carreira 2 do filtro lento recebendo baixas concentração orgânica e turbidez na remoção de turbidez.

Pode-se observar que, para as duas carreiras, a turbidez alcançou valores menores que 2 uT a partir da 25ª hora, atingindo valores no final da carreira 1 de 1,18 UNT e de 0,88 uT, no final da carreira 2. Além disso, não mostrou alterações durante as carreiras, mesmo com eventuais variações bruscas de turbidez do afluente ao filtro. Resultados semelhantes foram encontrados por Jenkins et al. (2011) onde, a partir da filtração lenta em areia do afluente com turbidez próxima a 50 uT, o efluente filtrado manteve turbidez de 1,24 ± 0,53 uT.

3.4.3.1.2 - DQO

A DQO média no efluente filtrado, durante a carreira 1, foi de 14 (± 1) $mg.L^{-1}$, o que representou remoção média de 73,5%, conforme figura 3.21. Com relação à carreira 2, a DQO média no efluente filtrado foi de 25,7 (± 4) $mg.L^{-1}$, com remoção média de 54,1%, conforme 3.22.

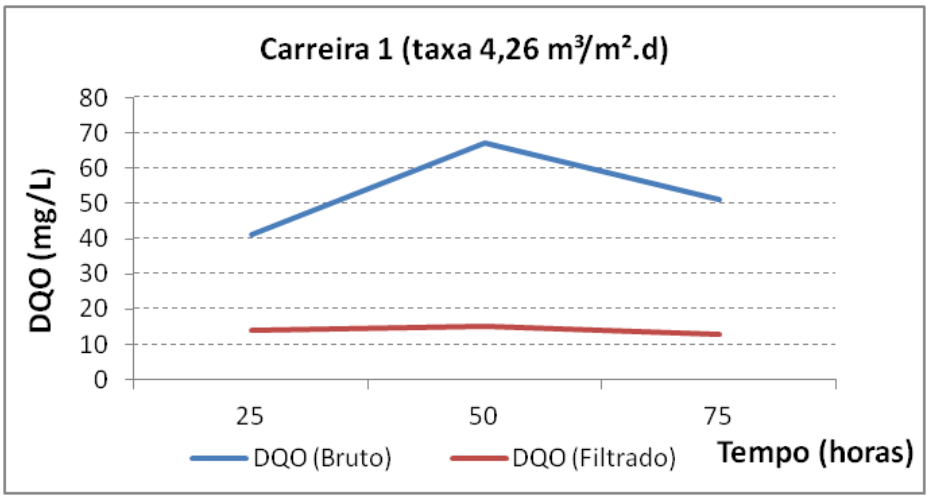


Figura 3.21 - Desempenho da carreira 1 do filtro lento recebendo baixas concentração orgânica e turbidez na remoção de DQO.

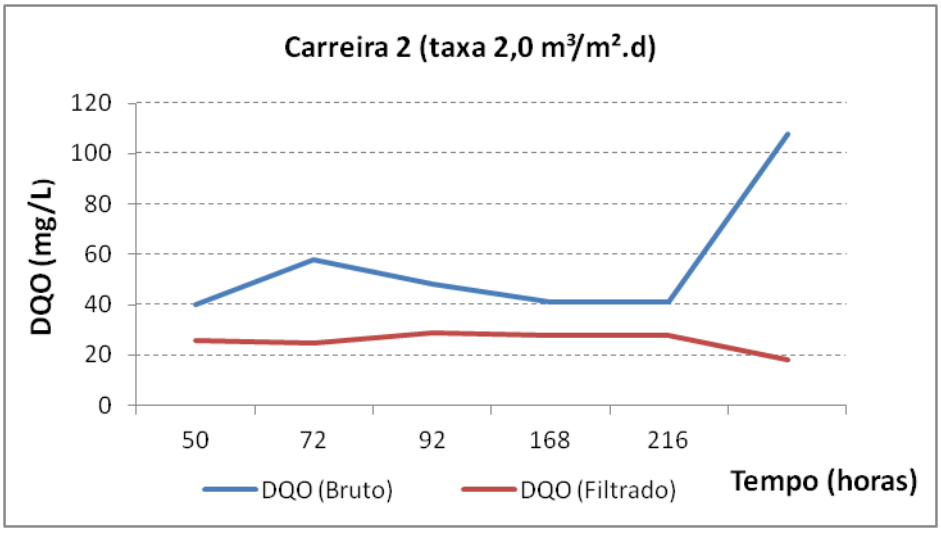


Figura 3.22 - Desempenho da carreira 2 do filtro lento recebendo baixas concentração orgânica e turbidez na remoção de DQO.

De igual modo que para a turbidez, o filtro lento em areia foi capaz de manter a DQO no efluente final praticamente constante, durante as duas carreiras, mesmo na ocorrência de picos de carga orgânica no afluente.

3.4.3.1.3 - Microrganismos Indicadores e Protozoários Patogênicos

Para análise microbiológica de *Giardia* e *Cryptosporidium* foi utilizada a técnica de filtração em membrana (detalhada no capítulo 2), pois o afluente e o efluente apresentavam baixa turbidez, o que permitiu utilizar volume maior de amostra que resulta em limite menor de detecção do método.

No efluente filtrado das carreiras 1 e 2, não foram encontrados cistos e oocistos, sendo o resultado de remoção calculado a partir do limite mínimo de detecção, o qual depende diretamente do volume de amostra filtrado. Os resultados de remoção de microrganismos indicadores e de cistos de *Giardia* para as carreiras 1 e 2, podem ser vistos nas figuras 3.23 e 3.24.

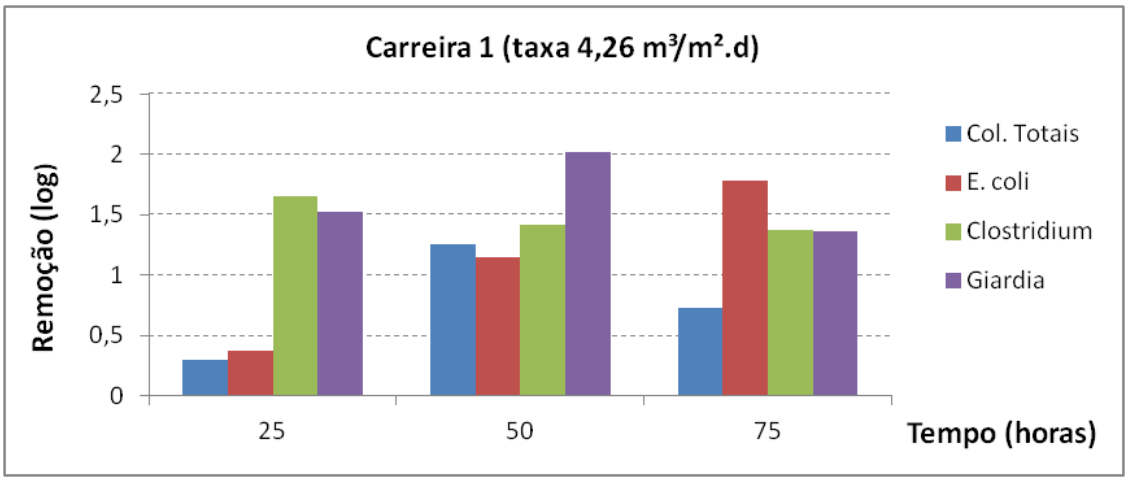


Figura 3.23 - Desempenho da carreira 1 do filtro lento recebendo baixas concentração orgânica e turbidez na remoção de microrganismos.

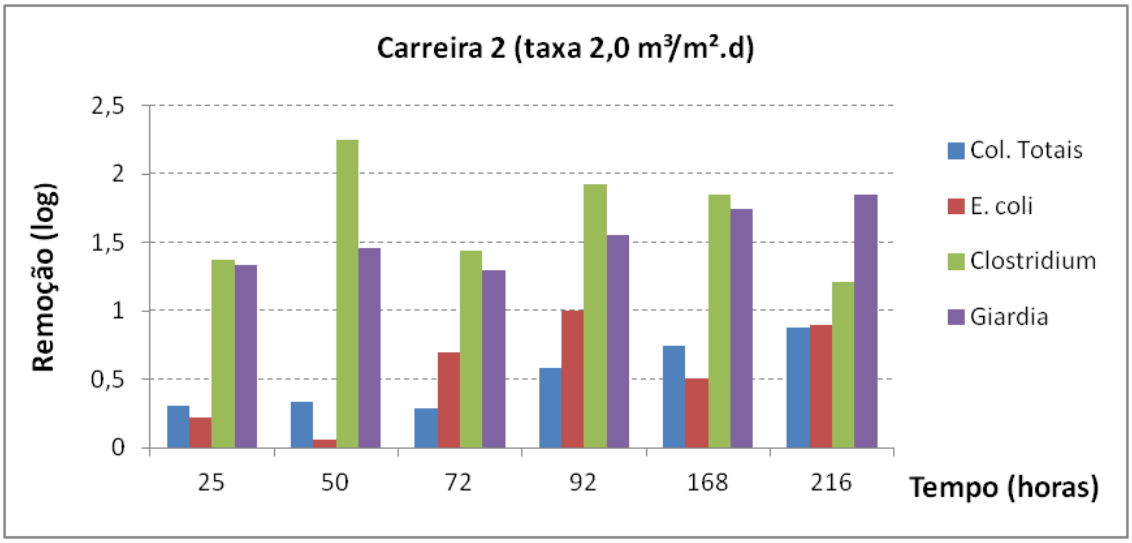


Figura 3.24 - Desempenho da carreira 2 do filtro lento recebendo baixas concentração orgânica e turbidez na remoção de microrganismos.

Observa-se que *Clostridium perfringens* e cistos de *Giardia* foram removidos mais facilmente, por serem maiores e com tamanho suficiente para serem retidos nos vazios do leito de areia. Ressalta-se a importância desse resultado pois se tratam de microrganismos resistentes aos desinfetantes comumente utilizados, como cloro e radiação ultravioleta.

No entanto, para *E. coli* e coliformes totais, de acordo com o tempo, há maior tendência de remoção, devido a uma maior atuação da camada biológica do filtro que em relação à ação física (MURTHA; HELLER, 2003). Os resultados para coliformes totais e *E. coli* foram inferiores ao encontrados por Bauer et al. (2011); porém, próximos aos encontrados por Ellis (1987) e Jenkins et al. (2011). Esses últimos relatam ainda que maior tempo de contato (taxa de filtração menor) promoveu maiores remoções de microrganismos e turbidez.

Oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados em duas amostras do afluente (uma em cada carreira) e, de mesmo modo que os cistos de *Giardia*, não foram verificados em nenhuma amostra filtrada.

3.4.3.2 - Efluente com Carga Orgânica e Turbidez Elevadas

Este efluente foi bombeado diretamente da saída do decantador para o filtro lento. O pós-tratamento também foi dividido em duas carreiras: carreira 3 - com taxa de filtração de 4,26 m^3/m^2.dia, que teve duração de 25 horas e carreira 4 - com taxa de filtração de 2 m^3/m^2.dia, com duração de 48 horas.

3.4.3.2.1 - Turbidez

Os valores de turbidez das amostras encontrados durante o monitoramento de ambas carreiras de filtração podem ser visualizados nas figuras 3.25 e 3.26, para carreiras 3 e 4, respectivamente.

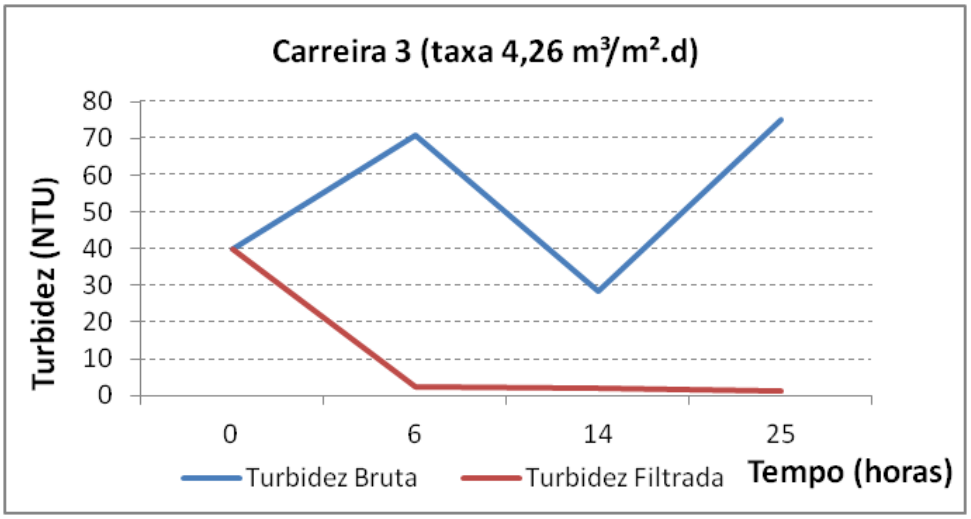


Figura 3.25 - Desempenho da carreira 3 do filtro lento recebendo altas concentração orgânica e turbidez na remoção de turbidez.

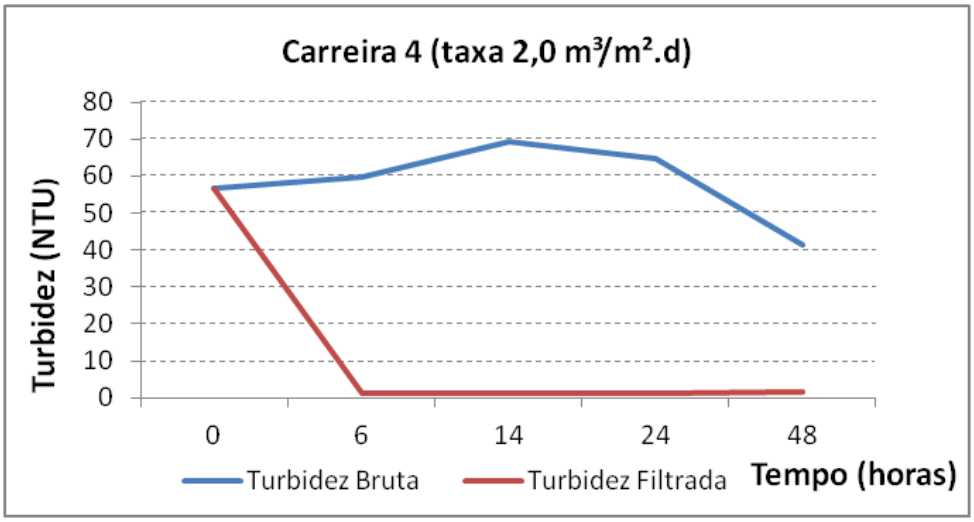


Figura 3.26 - Desempenho da carreira 4 do filtro lento recebendo altas concentração orgânica e turbidez na remoção de turbidez.

Para ambos efluentes filtrados, a turbidez se manteve menor que 2 uT e, de mesmo modo quando aplicada menores carga orgânica e turbidez, não oscilaram com o decorrer das carreiras de filtração.

3.4.3.2.2 - DQO

A DQO no efluente filtrado, durante a carreira 3, foi de 18 $mg.L^{-1}$, o que representa remoção de aproximadamente 85%. Com relação à carreira 4, a DQO no efluente filtrado foi de 21 $mg.L^{-1}$, com remoção média de 83%; ambos superiores aos resultados relatados por Tyagi et al. (2009). Em comparação às carreiras 1 e 2, as

remoções foram maiores, podendo ser devido ao amadurecimento mais rápido da camada biológica do filtro durante as carreiras 3 e 4.

3.4.3.2.3 - Microrganismos Indicadores e Protozoários Patogênicos

No efluente filtrado das carreiras 3 e 4, novamente, não foram encontrados cistos e oocistos, sendo o resultado de remoção também calculado a partir do limite mínimo de detecção. Os resultados de remoção de microrganismos indicadores e de cistos de *Giardia* para as carreiras 3 e 4, podem ser vistos nas figuras 3.27 e 3.28.

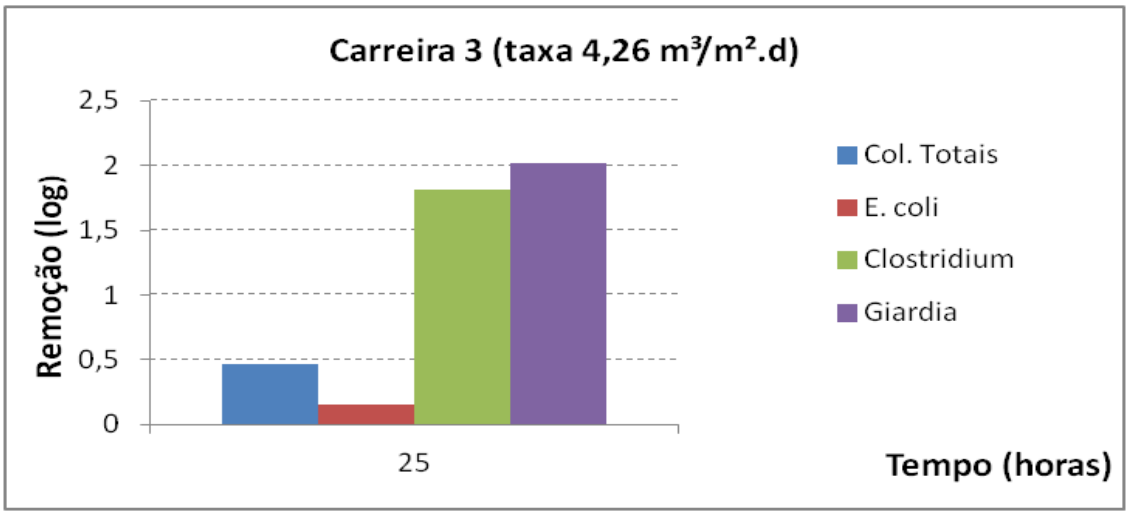


Figura 3.27 - Desempenho da carreira 3 do filtro lento recebendo altas concentração orgânica e turbidez na remoção de microrganismos.

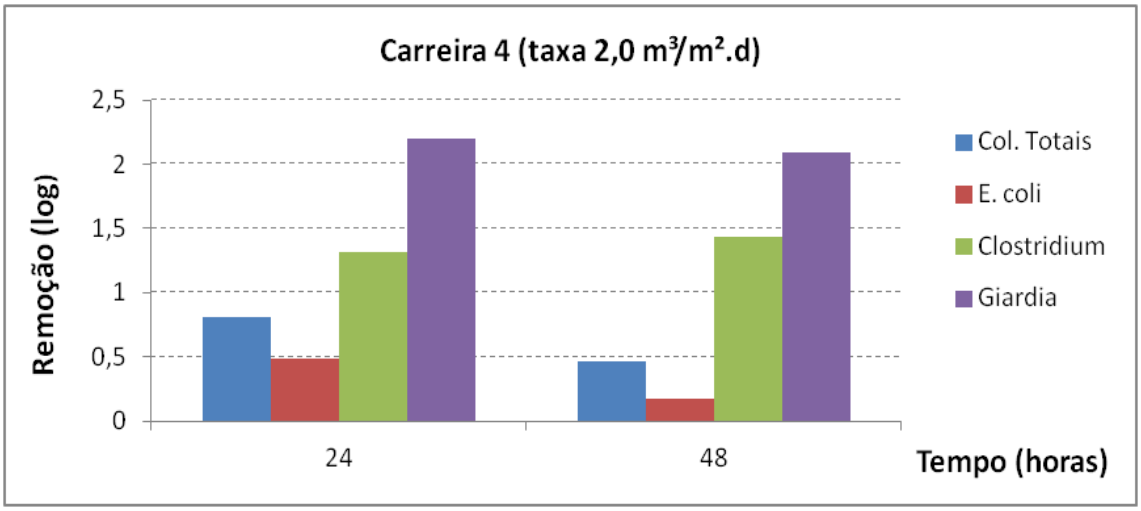


Figura 3.28 - Desempenho da carreira 4 do filtro lento recebendo altas concentração orgânica e turbidez na remoção de microrganismos.

Pode-se perceber que a remoção de cistos de *Giardia* nas carreiras 3 e 4 foram maiores que 99% (2 log) e para *Clostridium perfringens*, acima de 90%. As remoções de coliformes totais e *E. coli* foram baixas quando comparadas a resultados de Ellis (1987), Langenbach et al. (2010) e Tyagi et al. (2009). Esses últimos autores relatam ainda que a eficiência de remoção de micro-organismos por filtração lenta em areia é devido, principalmente: à taxa de filtração baixa, ao tamanho efetivo da areia também baixo e à atividade biológica do "*schmutzdecke*".

Zhang e Farahbakhsh (2007) e Kistemann et al. (2008) verificaram que ETEs com tratamento terciário com filtração em areia conseguiram melhorar consideravelmente a eficiência de remoção de microrganismos.

Nas carreiras 3 e 4, oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados em duas amostras brutas (uma em cada carreira), mas, novamente, não foram constatados em nenhuma amostra filtrada, assim como cistos de *Giardia*.

3.4.3.3 - Camada biológica do Filtro Lento

O filtro lento em areia foi operado de forma contínua e, após a finalização de cada carreira, a camada biológica (*Schmutzdecke*) era raspada - 3 a 5 cm - para dar início a uma nova carreira de filtração. Esta camada é formada praticamente por material de origem orgânica, com inúmeros microrganismos (WHO, 1974). Amostras dessa camada foram analisadas por microscopia, como pode ser visualizado na figura 3.29, sendo encontrados grandes número e diversidade de microrganismos, muitos deles predadores que ajudam na remoção de microrganismos presentes no esgoto sanitário. Entre os identificados, têm-se:

- Bactérias: *Spirillum*, bem como cocos e bacilos.
- Protozoários flagelados, a exemplo, colônias de *Poteriodendrom*;
- Protozoários ciliados, como a *Vorticella* (reconhecidamente predadores de bactérias em suspensão (LLOYD, 1973));
- Protozoários: Amebas, entre outras, *Arcella* e *Euglypha*.

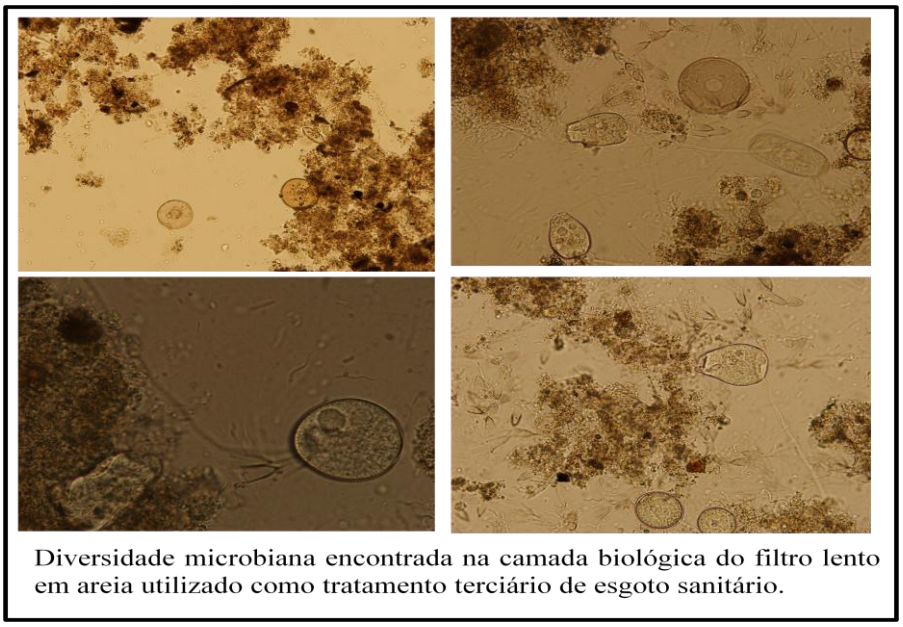


Figura 3.29 - Diversidade microbiana na camada biológica do filtro lento em areia.

3.4.3.4 - Remoção de variáveis físicas, químicas e microbiológicos na ETE com tratamento terciário.

A remoção global da ETE piloto provida de tratamento preliminar, tratamento primário (reator UASB), tratamento secundário (sistema de lodos ativados) e tratamento terciário (filtração lenta em areia), para parâmetros físico-químicos e microbiológicos a partir da média dos dados de caracterização do esgoto bruto e dos dados finais de cada da filtração lenta, estão apresentados na tabela 3.16.

Tabela 3.16 - Remoções médias de variáveis físicas, químicas e microbiológicas da ETE - piloto para cada carreira do filtro lento em areia.

Parâmetro	**Carreira 1**	**Carreira 2**	**Carreira 3**	**Carreira 4**
Turbidez	99,6 %	99,7 %	99,7 %	99,7 %
Absorbância 254 nm	88,7 %	86,8 %	88,2 %	88,9 %
DQO	98,8%	97,7 %	98,4 %	98,1 %
Coliformes totais	3,64	3,56	3,00	2,98
Escherichia coli	2,82	3,19	2,38	2,28
Clostridium sp.	2,37	2,67	2,05	1,59
Giardia spp.	2,97	3,01	2,95	3,00
Cryptosporidium spp.	2,49	2,49	2,49	2,49

Nota: remoção de microrganismos em unidades logarítmicas.

3.5 - CONCLUSÃO

As concentrações encontradas de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* na ETE - piloto podem mostrar de maneira indireta a incidência desses protozoários na população.

A ETE piloto do Campus da USP São Carlos operando com o reator UASB seguido de sistema de lodos ativados obteve aproximadamente duas unidades logarítmicas de remoção para coliformes totais e *E. coli*, enquanto que para *Clostridium perfringens* e cistos de *Giardia* spp., 1 unidade logarítmica. Cistos de *Giardia* foram encontrados em 100 % das amostras pesquisadas e oocistos de *Cryptosporidium* em 31,4 %, o que ressalta preocupação quanto à Saúde Pública, pois esses protozoários se apresentaram em elevadas concentrados até mesmo no efluente tratado.

A mudança do tempo de residência celular no sistema de lodos ativos não promoveu melhoras significativas na remoção de (oo)cistos de protozoários, de microrganismos indicadores e das variáveis físicas e químicas utilizadas neste trabalho.

O acréscimo de unidade de filtração lenta em areia apresentou melhora significativa da qualidade do efluente, tanto para variáveis físicas e químicas, quanto microbiológicas. Não foram constatados cistos de *Giardia* ou oocistos de *Cryptosporidium* no efluente desta unidade de tratamento, mesmo com modificação da taxa de filtração e da qualidade do efluente de entrada ao filtro. Deve-se, no entanto, refletir sobre a viabilidade de utilizar a filtração lenta como pós-tratamento, principalmente, em relação ao custo e à área necessária; podendo ser interessante alternativa, principalmente, para ETEs de pequeno porte.

Nos processos de tratamento avaliados neste trabalho, não houve correlação de coliformes totais, *E. coli* e *Clostridium perfringens* e de variáveis físicas e químicas com cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., o que levanta ressalvas quanto à utilização dessas bactérias como microrganismos indicadores de protozoários patogênicos para amostras de esgoto sanitário, sendo, portanto, necessário o estudo de novos indicadores.

Capítulo 4

Quantificação e avaliação da viabilidade de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em lodo de ETEs.

Com vista à utilização de subprodutos do tratamento de esgoto sanitário, a questão microbiológica do lodo é extremamente importante, pois revela riscos diretos e indiretos quanto a sua manipulação e uso inadequados. Neste capítulo são relatadas quantificação e avaliação da viabilidade de (oo)cistos de protozoários patogênicos em lodo de ETE.

4.1 - INTRODUÇÃO

4.1.1 - Produção e Destinação Final de Lodo de Esgoto

O lodo de esgoto é definido pela Resolução CONAMA 375 (2006) e EPA (2003) como sendo o resíduo gerado nos processos de tratamento de esgoto sanitário. O termo "lodo" é geralmente utilizado em conjunto com o processo que o originou (exemplo, lodo primário) e é usado antes de o seu beneficiamento (METCALF; EDDY, 2003). Quando o lodo de esgoto se encontra higienizado, estabilizado e seco, e apresenta características químicas e biológicas que garantam segurança ambiental e sanitária, ele passa a ser denominado biossólido (ANDREOLI et al., 2001; ONU, 2008). Dessa maneira, o lodo passa a ser visto como insumo a ser utilizado e não apenas um simples rejeito, e, assim, mais aceito pelo público que ao ser chamado de lodo (ONU, 2008).

Segundo Bueno (2001), a quantidade de lodo produzido depende do sistema de tratamento de esgoto, como pode ser visualizado na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Sistemas de tratamento de esgoto e respectivos volumes de lodo produzido (Arceivala (1981), EPA (1979, 1981, 1992), Metcalf; Eddy (1991), Vieira (1993), Von Sperling (1995) e Nascimento (1997) *apud* Bueno, 2001)).

Sistema de Tratamento	**Volume de Lodo Produzido (m^3/hab.ano)**
Filtro biológico de alta taxa	1,1 a 1,5
Reator UASB	0,07 a 0,1
Lodo Ativado convencional	1,1 a 1,5
Lodo Ativado aeração prolongada	0,7 a 1,2
Lagoa Anaeróbia	0,01 a 0,04
Lagoa Facultativa	0,03 a 0,08
Lagoa Aerada Facultativa	0,03 a 0,08

A quantidade total de lodo de esgoto tem aumentado no Brasil, devido, principalmente, ao crescimento populacional e de indústrias, e a implantação de novas ETEs. A quantidade e qualidade do lodo produzido varia de lugar para lugar e depende do processo de tratamento de esgoto, do processo de tratamento do lodo e ainda da população contribuinte e/ou dos efluentes industriais que são lançados na rede coletora (ANDREOLI et al., 2008; CHAGAS, 2000).

Na tabela 4.2 pode ser visualizado o levantamento de dados realizado por Machado (2001), em 275 ETEs do Brasil.

Tabela 4.2 - Produção de lodo de ETE por região brasileira.

Região do Brasil	**N° de ETEs**	**Pop. com Tratamento de Esgoto (hab.)**	**Produção de Lodo informada(ton/ano)**
Norte	03	56.000	-
Nordeste	66	1.620.906	-
Centro-Oeste	66	2.025.252	11.385
Sudeste	48	7.286.044	274.719
Sul	92	1.789.772	22.529

Quanto à disposição final de lodo de esgoto, tem-se: uso agrícola, recuperação de áreas degradadas, florestas, processos industriais (industria de cerâmica, por exemplo), recuperação energética, aterro sanitário, incineração (ANDREOLI et al., 2001, 2008).

Em pesquisa realizada por Machado (2001), das 275 ETEs analisadas, 50% do volume de lodo produzido era encaminhado a aterros sanitários, 15,1%, para agricultura e 34,9% para locais indefinidos.

4.1.2 - Legislação Ambiental Aplicada

Entre as legislações pertinentes à questão do lodo de esgoto, no Brasil e em outros países, algumas merecem destaque:

- Norma Técnica P4.230 da CETESB (1999): é um manual técnico sobre a aplicação de lodos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas com critérios para projeto e operação. Quanto à presença e tratamento de redução de micro-organismos patogênicos, esta norma classifica o lodo em duas classes, A e B, conforme tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Classificação e processos de redução de patógenos.

Classe	Concentração de patógenos	Processos de Redução de patógenos
A	Coliformes fecais: < 10^3 NMP/g de ST *Salmonella*: < 3 NMP em 4g de ST	Compostagem, Secagem térmica, Tratamento térmico, Digestão aeróbia termofílica, Irradiação, Pasteurização.
B	Coliformes Termotolerantes: < 2 x 10^6 NMP/g de ST, sendo que este resultado deve vir de uma média geométrica de sete amostras.	Digestão aeróbia, Secagem, Digestão anaeróbia, Compostagem, Estabilização com cal.

Nota: ST: Sólidos totais; NMP: número mais provável.

- ABNT (2004) - NBR 10.004: Estabelece os critérios de classificação e os códigos para a identificação dos resíduos de acordo com suas características. Os resíduos são classificados em: classe I - perigosos ; classe II - não perigosos, IIa - não inertes; IIb inertes. O lodo de ETE pertence à classe I.
- Resolução CONAMA 375 (2006): Define critérios e procedimento para uso agrícola de lodos de esgoto gerados em ETE e seus produtos derivados. Relata a urgência de solucionar a questão de disposição de lodo de ETE, visto que a produção do mesmo é intrínseca aos processos de tratamento de esgoto. Além disso, considera o lodo de ETE, fonte de potencial risco à saúde pública e ao ambiente, devido à presença de organismos patogênicos e metais pesados, principalmente; mas que ao mesmo tempo, reforça o uso agrícola como alternativa de destino final.

  Os lodos para serem aplicados na agricultura deverão ser submetidos a processos de redução de patógenos e da atratividade de vetores. Esta resolução só se aplica para lodo de ETE doméstico e não ao lodo de ETE de processos industriais. Também veta o uso de lodo de ETE de instalações hospitalares e de efluentes de portos e aeroportos, resíduos de gradeamento e desarenador, material lipídico sobrenadante de decantadores primários, das caixas de gordura de reatores anaeróbios, lodo de sistema de tratamento individual, lodo de esgoto não estabilizado.

Por fim, classifica o lodo de esgoto em duas classes, de acordo com a concentração de patógenos, conforme tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Limites máximos permitidos para patógenos e parasitos em lodos e biossólidos.

Classe	Concentração de patógenos
A	Coliformes Termotolerantes: $< 10^3$ NMP/g de ST Ovos viáveis de helmintos: < 0,25 ovo/g de ST *Salmonella*: ausência em 10g de ST Virus: < 0,25 UFP/g de ST
B	Coliformes Termotolerantes: $< 10^6$ NMP/g de ST Ovos viáveis de helmintos: < 10 ovos/g de ST

Nota: ST: Sólidos totais; NMP: número mais provável; UFP: Unidade formadora de placa.

A resolução limita as culturas que podem receber lodo de esgoto A e B, bem como o local e aptidão do solo nas áreas de aplicação. Os processos de redução de patógenos relatados nesta Resolução, são: digestão aeróbia, secagem em leitos de areia, digestão anaeróbia, compostagem e estabilização com cal.

Segundo Bastos et al. (2013), há uma abordagem de dupla barreira de proteção à saúde (tratamento do lodo e restrições de uso de biossólidos), estabelecendo dois níveis de qualidade de biossólidos. Os mesmos autores relatam que a CONAMA 375/2006 parece ser muito conservadora, com exceção do padrão bastante permissivo de ovos de helmintos. E, portanto, uma adequada apropriação e aplicação de uma metodologia de Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM) poderia ajudar no processo continuado de sua revisão e atualização.

- Instrução Normativa 25, Ministério da Agricultura (2009): Classifica os fertilizantes orgânicos simples, mistos, compostos e organominerais de acordo com as matérias-primas utilizadas na sua produção em quatro classes, sendo de classe "D" onde a matéria-prima oriunda de tratamento de despejos sanitários se encontra.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-004-SEMARNAT-2002): Detalha especificações e limites máximos permitidos de contaminantes para aproveitamento e disposição final de lodos e biossólidos, conforme tabela 4.5.

Ainda de acordo com essa Norma, o aproveitamento do biossólido pode ser realizado de acordo com a sua classe. Sendo assim:

- Classe C: usos florestais, melhoramento de solos e usos agrícolas;
- Classe B: usos urbanos sem contato público durante sua aplicação e os usos da classe C;
- Classe A: os usos das classes B e C e também para usos urbanos com contato público direto durante sua aplicação.

Tabela 4.5 - Limites máximos permitidos para patógenos e parasitos em lodos e biossólidos (Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002).

Classe	Indicador Bacteriológico de Contaminação*	Patógenos**	Parasitos***
A	Menor que 10^3	Menor que 3	Menor que 1
B	Menor que 10^3	Menor que 3	Menor que 10
C	Menor que 2×10^6	Menor que 3×10^2	Menor que 35

Nota: *Coliformes Fecais (número mais provável (NMP)/g de lodo seco); ***Salmonella* spp. (NMP/g de lodo seco); ***Ovos de Helmintos viáveis/g de lodo seco.

- <u>Norma da USEPA (2003):</u> o lodo de esgoto é dividido em duas categorias, de acordo com a redução de patógenos requerida:

- classe A - redução de patógenos abaixo do nível de detecção, que são:
  - *Salmonella* sp.: < 3 NMP / 4 gramas de sólidos totais secos.
  - Vírus Entéricos: < 1 UFP / 4 gramas de sólidos totais secos.
  - Ovos viáveis de helmintos: < 1 ovo viável de helminto / 4 gramas de sólidos totais secos.
- classe B - redução de patógenos a um nível tal que não haja ameaça à saúde pública e ao ambiente de acordo com a condições específicas de uso. Pode conter alguns patógenos. Necessidade de restringir o acesso público, pastoreio por animais, e produção agrícola por certo período de tempo, para permitir que fatores ambientais atuem na redução da concentração de patógenos. Para isso, existem três alternativas:
  - pode ser realizado o monitoramento de coliformes fecais a partir de sete amostras retiradas a cada quinze dias, as quais devem fornecer média

geométrica menor que 2 x 10^6 NMP ou UFC por grama de sólidos totais secos.

- o lodo é considerado de classe B caso seja tratado por um dos "Processos para Reduzir Patógenos Significativamente" - sigla PSRPs em inglês (*Processes to Significantly Reduce Pathogens*). Esses processos são: digestão aeróbia, secagem ao ar, digestão anaeróbia, compostagem, estabilização com cal.
- outra alternativa é tratar o lodo de esgoto por processo que tenha remoção equivalente aos PSRPs.

4.1.3 - Métodos de Análise de Protozoários em Lodo de Esgoto

Segundo Sidhu e Toze (2009), devido a limitações metodológicas e à presença esporádica de certos patógenos em biossólido, grande parte das pesquisas se concentra na ocorrência de micro-organismos indicadores. Como resultado, há uma lacuna em relação ao potencial risco à saúde pública principalmente, de protozoários e vírus.

Com relação aos métodos de análise microbiológica de protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* empregados para lodo de esgoto, não há um consenso entre os autores. Dessa forma, são encontradas inúmeras metodologias na literatura, dentre as quais podem ser citadas:

- Konoté et al. (2013): utilizaram uma combinação de sedimentação (por centrifugação) e filtração com solução de eluição (acetato de sódio 15g, ácido acético 20 mL, formaldeído 40%, 40 mL e água destilada 925mL) para enumerar cistos de protozoários.
- Khouja et al. (2010): coletaram 100g de lodo para análise. Centrifugaram amostras segundo o método MBM - método Bailenger modificado, de acordo com Ben Ayed et al. (2009). Paralelamente, utilizaram o método 1623 da USEPA (2005) que se constitui de separação imunomagnética (IMS) seguido de reação de imunofluorescência direta (IFA). Com o MBM, detectaram (oo)cistos de protozoários em duas de quatro amostras. Como o IMS seguido de IFA, encontraram *Cryptosporidium* em 1 de 5 amostras e nenhuma *Giardia* estava presente. Os autores comentam que, segundo Yu et al. (2002), isso pode ser atribuído ao processo de desidratação pelo qual o lodo é submetido, o que pode afetar a morfologia ou a superfície epítopos/glicoproteínas dos (oo)cistos que são alvo dos anticorpos utilizados em ensaios imune.

- Ben Ayed et al. (2009): também utilizaram o método MBM, que é especifico para ovos de helmintos; entretanto, ao mesmo tempo, permite detecção de cistos de protozoários. É um método simples, rápido, reprodutível e barato. Porém, ocorre muita presença de impurezas e sólidos suspensos que podem prejudicar na visualização de ovos e cistos. Além disso, não é possível diferenciar espécies e genótipos e não dá informação sobre a viabilidade dos parasitas. Os autores deixavam 5 L de amostra para sedimentar por 24h. Depois o sobrenadante era retirado e o sedimento centrifugado a 1.000 *x g* por 15 minutos. Depois o pellet era resuspenso por igual volume com solução tampão de ácido acético (pH = 4,5). Depois dois volumes de éter eram adicionados e a amostra era misturada por 10 minutos. Havia nova centrifugação a 1.000 *x g* por 15 minutos. Depois de anotar o volume de pellet, ele era resuspenso em cinco volumes de solução de sulfato de zinco com densidade de 1,3 (densidade de 33%) e misturado vigorosamente. Rapidamente, 50 microlitros eram transferidos para contagem microscópica. Os autores encontraram recuperações de 36 e 20 % em água destilada, 20 e 12% em esgoto bruto e 24 e 16% em esgoto tratado para *Giardia* e *Cryptosporidium*, respectivamente.
- Graczyk et al. (2008): utilizaram FISH (*Fluorescence in situ hydridization*) e IFA (*Immunofluorescence Assay*) ou reação de imunofluorescência direta (RID) e demonstraram que a maioria dos (oo)cistos estavam potencialmente viáveis.
- Graczyk et al. (2007): As amostras foram deixadas "overnight" para sedimentarem. Depois 50 mL foram coletados na camada superior do sedimento e centrifugados a 3.000 *x g* por 5 minutos. O pellet resultante foi transferido para tubos plásticos de 1,5 mL de capacidade. A solução foi misturada com igual volume de 75% de etanol e estocada a 4 ºC. O álcool foi retirado por meio de centrifugação (10.000 *x g* por 10 minutos) duas vezes em PBS estéril, o pellet resultante foi então levado à flotação por açúcar-fenol. O pellet era dividido em duas alíquotas: uma para verificação de (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* através da combinação de hibridização *in situ* (FISH) e IFA e a outra para apenas hibridização *in situ*, afim de pesquisar sobre microsporídeos.
- McCuin e Clancy (2005): Compararam IMS com flutuação em sacarose para melhorar a recuperação de oocistos de *Cryptosporidium*. Também analisaram a interferência da quantidade de lodo utilizado no ensaio: 5, 10 e 15 gramas. A

porcentagem de recuperação de oocistos foi maior ao avaliarem 5 gramas de lodo.

4.1.4 - Características do Lodo de Esgoto

Pouco se conhece sobre a caracterização química e microbiológica do lodo gerado em ETEs, o que suscita preocupações quanto aos efeitos agudos e crônicos para a saúde humana e ao ambiente. Para uma melhor estimativa do risco associado à utilização do lodo, uma das primeiras etapas é a caracterização do perigo, ou seja, caracterizar e quantificar os contaminantes químicos e micro-organismos patogênicos presentes (SALVADOR, 2011).

Pela própria forma como é originado - a partir do tratamento de esgoto - o lodo é o concentrador de nutrientes, matéria orgânica, metais pesados, organismos patogênicos e de outros elementos que podem oferecer riscos ao meio ambiente e à saúde publica. As características físicas, químicas e biológicas do lodo são muito variáveis, dependendo do processo de tratamento e do seu caráter sazonal (ANDREOLI et al., 2008; SANTOS, 2009).

O lodo possui grandes quantidades de nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio, enxofre (macronutrientes), além de micronutrientes como, por exemplo, zinco, ferro, cobre, manganês, boro, molibdênio e cloro (ANDREOLI et al., 2001, 2008; MELO; MARQUES, 2001). Segundo Tsutiya (2001), a matéria orgânica dos biossólidos, que varia de 40 a 70%, favorece a formação de agregados no solo, o que facilita a penetração de raízes e a vida microbiana, fornece nutrientes para as plantas e para os organismos do solo, além de atuar como condicionador do solo.

De acordo com Chagas (2000), o lodo pode ser uma fonte importante de matéria orgânica, micro e macronutrientes ao solo, conferindo maior capacidade de retenção de água, maior resistência à erosão. No entanto, os biossólidos podem conter patógenos humanos que serão incorporados aos solos, além de ser fonte de metais pesados, que podem reduzir a biomassa microbiana do solo e inibir a fixação de N_2. (MARQUES et al., 2001).

As espécies e concentrações de patógenos presentes no lodo de esgoto são bastante variáveis e dependem de (ANDRAUS et al., 1999; EPA, 2003; LOPES et al., 2005; SIDHU; TOZE, 2009; SALVADOR, 2011):

- condições socioeconômicas da população;
- condições sanitárias da região;

- condições de saúde da comunidade atendida pela ETE;
- tipo de tratamento empregado para o lodo;
- época do ano;
- presença de hospitais e de abatedouros na área.

Durante o tratamento de águas residuárias, os patógenos ficam concentrados no lodo produzido. Há pouca informação sobre o número e sobrevivência de patógenos em biossólidos devido à dificuldade com métodos de detecção, especialmente para vírus e protozoários (SIDHU; TOZE, 2009).

Os principais patógenos encontrados no lodo, segundo Lopes et al. (2005), são: ovos de helmintos, cistos de protozoários, bactérias e vírus entéricos. As concentrações de agentes patogênicos em lodo de esgoto podem ser verificadas na tabela 4.6. Os autores encontraram por volta de 14 oocistos / grama; e de 26 cistos por grama.

Além desses autores, Konoté et al. (2013) observaram acúmulo de cistos de protozoários em três diferentes tipos de lagoa de estabilização - anaeróbia, facultativa e de maturação. Todas as espécies pesquisadas de protozoários, entre elas *Giardia*, foram encontradas no lodo da lagoa anaeróbia, e somente cistos de *Entamoeba coli* foram encontrados na lagoa facultativa. Constataram também maior destruição de cistos de acordo com a profundidade do lodo amostrado da lagoa anaeróbia.

A comparação dos dados encontrados com outros trabalhos é difícil devido a metodologias diferentes, amostragem inconsistentes e diferentes tipos de lodo. Os protozoários patogênicos *Giardia* e *Cryptosporidium* não são produto de caracterização do lodo, segundo a Resolução CONAMA 375 (2006), exceto quando solicitado por órgão ambiental competente.

Tabela 4.6 - Caracterização microbiológica de diferentes tipos de lodo de esgoto.

Agente patogênico	**Concentração**	**Observações**
Bactérias	10^1 a 8,8 x 10^6 /kg	[1]
	10^8 /kg	ETE Belém - Curitiba[1]
Vírus	3,8 x 10^3 a 1,2 x 10^5 /L	Lodo Primário[1]
	10^1 a 10^3 /L	Lodo Digerido[1]
	10^1 a 8,8 x 10^6 /L	Lodo Biológico[1]
	até 12,5 UFP /g	*Enterovirus*, em 83% das amostras[4]
Cistos de Protozoários	7,7 x 10^4 a 3 x 10^6 /kg	Lodo Primário[1]
	3 x 10^4 a 4,1 x 10^6 /kg	Lodo Digerido[1]
	7 x 10^1 a 10^2 /kg	Lodo Desidratado[1]
	5,6 x 10^4 /kg	Cistos de *Giardia*[2]
	2,4 x 10^2 /100g	Cistos de *Giardia*, em 40% das amostras[3]
	8 a 1,6 x 10^2 /100g	Cistos de *Entamoeba coli*, em 50% das amostras[3]
	Até 1540 cistos e 650 oocistos / L	*Giardia* e *Cryptosporidium*, respectivamente no lodo de L.A.[5]
	Até 114 cistos e 110 oocistos / kg	Torta de lodo secundário[5]
	1,1 x 10^2 cistos / L	*Giardia*[6]
	14 oocistos e 26 cistos /g	*Cryptosporidium e Giardia*, respectivamente[7]
	14 cistos / L	*Giardia*[8]
Ovos de Helmintos	10^3 a 10^4 /kg	Lodo Primário[1]
	10^2 a 10^3 /kg	Lodo Digerido[1]
	10^1 a 10^3 /kg	Lodo Semi desidratado[1]
	1,85 x 10^3 /kg	Lodo Semi desidratado - ETE Belém - Curitiba[1]

Nota: UFP: Unidade Formadora de Placa; L.A.: Lodos Ativados

Referências: [1]Soccol e Paulino (2000); [2]Andreoli et al. (2008); [3]Khouja et al. (2010); [4]Salvador (2011); [5]Graczyk et al. (2007); [6]Chauret et al. (1999); [7]Graczyk et al. (2008); [8]Paulino e Soccol (2001).

Este capítulo teve por objetivo analisar a presença e verificar a viabilidade de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em lodo de esgoto sanitário de duas ETEs com sistema de lodos ativados e averiguar se há diferença em concentração e viabilidade de (oo)cistos em sistemas de lodos ativados operados de modo convencional (tempo de residência celular de 7 dias) dos operados com aeração prolongada (tempo de residência celular de 20 dias).

4.2 - MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 - Amostragem

Amostras de lodo de esgoto foram coletadas em duas ETEs:

- ETE - Campus da Universidade de São Paulo, na cidade de São Carlos - SP, a qual possui tratamento preliminar, seguido de reator UASB seguido de unidade piloto de sistema de tratamento por Lodos Ativados. Esse último sistema foi operado com dois tempos de residência celular (TRC), 20 e 7 dias, vindo a caracterizá-lo como aeração prolongada e convencional, respectivamente.
- ETE em escala plena, localizada no município de Limeira - SP, a qual possui tratamento preliminar, reator UASB, sistema de lodos ativados e unidade de desinfecção com radiação UV.

Para o estudo forma retiradas amostras das linhas de retorno de lodo do sistema de lodos ativados de ambas ETEs, em frascos previamente lavados, desinfetados e enxaguados com solução Tween 80 (0,1%). Foram realizadas cinco coletas de lodo para cada TRC na ETE - Campus da USP em São Carlos, e quatro coletas na ETE de Limeira - SP.

4.2.2 - Processamento das amostras

Foram centrifugados 50 mL da amostra a 1500 *x g*, por 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e descartado. Ao pellet final, com menos de 5 mL, foram adicionados 10 mL de solução de eluição - Tween 80 (0,1%). Após homogeneização em vórtex por 30 segundos, houve nova centrifugação (1500 *x g*, por 15 min.), com retirada e descarte de sobrenadante. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de água deionizada e outra homogeneização em vórtex. Após a terceira centrifugação (1500 *x g*,

por 15 min.), o sobrenadante foi retirado e descartado, sendo deixado pellet de 5mL, o qual foi levado ao vortéx e mantido "overnight" a 7,5 ± 2,5 ºC.

Para quantificação da massa da amostra, 50 mL de lodo foram levados à estufa (105 - 110 ºC) para análise de sólidos totais: Método Gravimétrico (APHA, 2005).

4.2.2.1 - Detecção e Identificação de (oo)cistos

A partir de duas alíquotas de 10 µL de pellet (réplicas), por amostra, a enumeração de cistos e oocistos foi realizada por reação de imunofluorescência direta (RID) com utilização de kit Merifluor (Meridien Bioscience Diagnostics, Cincinnatti, Ohio).

Primeiramente, as alíquotas foram colocadas nas placas e deixadas para secar a temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos). Em seguida, houve adição de 10 a 30 µL de metanol, deixando secar por 10 minutos.

Após essa etapa, houve acréscimo de uma gota do reagente de detecção e uma gota do contra-corante, ambos presentes no kit Merifluor; e as placas foram levadas a 37ºC, por 30 minutos, em câmara úmida e no escuro.

Para lavagem, aplicaram-se 100 µL de água deionizada no poço da placa, e a mesma foi inclinada a 45º.

4.2.2.2 - Avaliação da viabilidade de (oo)cistos

A viabilidade dos cistos e oocistos foi inferida através da coloração diferencial com iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, USA), segundo Campbell et al. (1992). Esse reagente, responsável pela emissão de fluorescência vermelha (λ = 510 a 550 nm), penetra apenas nos microrganismos com membrana danificada (células mortas).

Para isso, foi aplicada uma gota do corante em cada poço da placa, deixando por 15 minutos. Depois foi realizada nova lavagem com aplicação de 100 µL de água deionizada no poço da placa, e a mesma foi inclinada a 45º. Aplicou-se uma gota de meio de montagem presente no kit Merifluor e, por fim, foi colocada a lamínula. Na figura 4.1, pode-se observar uma placa com amostras de lodo para análise de protozoários patogênicos.

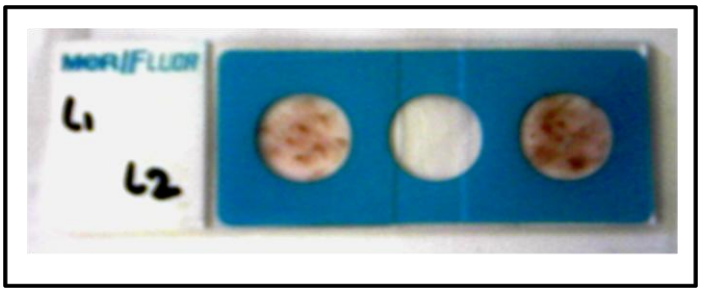


Figura 4.1: Placa com amostras de lodo para análise de *Giardia* e *Cryptosporidium*.

As amostras foram examinadas em microscópio de imunofluorescência (Olympus BX51) sob aumento de 400X a 800X.

Para o cálculo da concentração de (oo)cistos por grama de lodo, foi utilizada a seguinte equação (4.1), modificada de Bonatti (2007).

$$\text{N° (oo)cistos por grama de sólidos totais} = \frac{\text{N° (oo)cistos contabilizados na lâmina x VSF}}{\text{VSL x MA x } 10^{-3}} \qquad (4.1)$$

VSL = volume de sedimento examinado na lâmina (10µL);

MA = massa da amostra (g);

VSF = volume de sedimento final (5 mL).

4.2.3 - Análise Estatística

A análise estatística dos dados encontrados foi realizada utilizando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc, 2004). A homogeneidade de variância foi verificada através do teste de Lévene e para comparação de médias foi aplicada ANOVA, com teste t de Student.

4.3 - RESULTADOS

4.3.1 - ETE - Campus da USP, São Carlos - SP

Na ETE localizada no Campus da USP, em São Carlos, foram realizadas cinco coletas de lodo para cada tempo de residência celular (TRC): aeração prolongada - 20 dias - e convencional - 7 dias, cujas contagens de cistos e oocistos estão reportadas nas figuras 4.2 e 4.3.

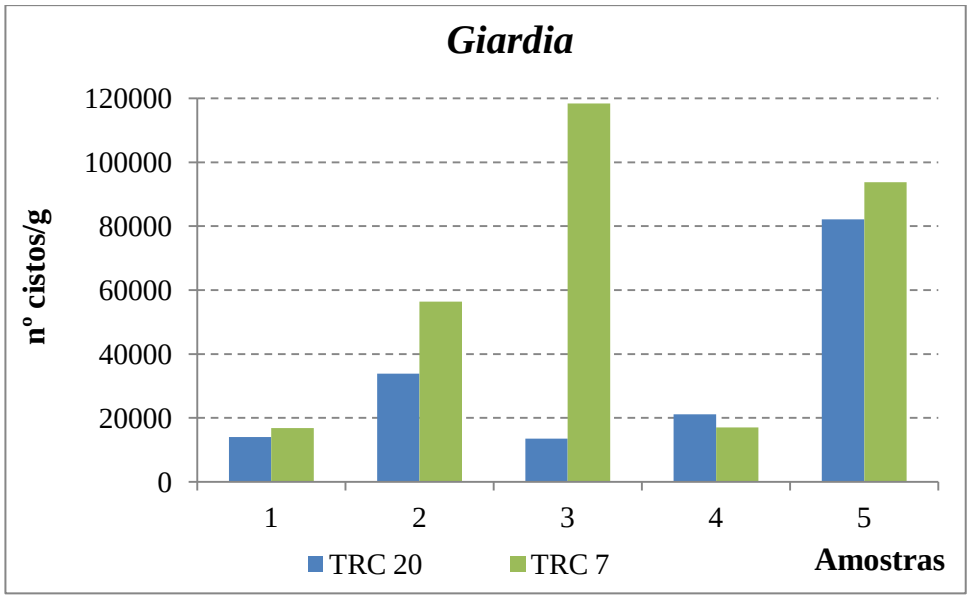


Figura 4.2 - Concentração de cistos de *Giardia* spp. em lodo de esgoto proveniente de sistema de Lodos Ativados.

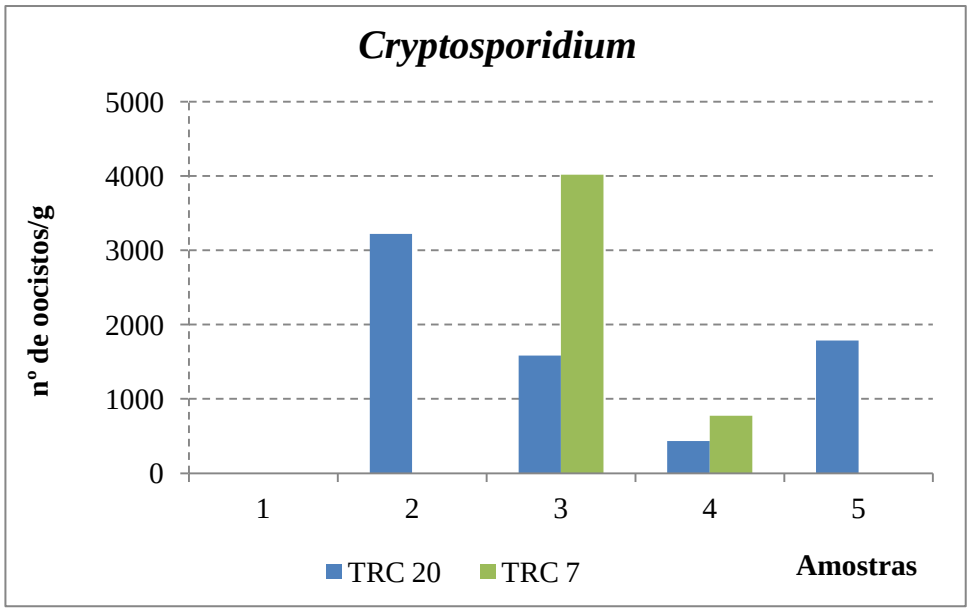


Figura 4.3 - Concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em lodo de esgoto proveniente de sistema de Lodos Ativados (não foram detectados oocistos na coleta 1).

Pode-se observar que cistos de *Giardia* foram encontrados em 100% (10/10) das amostras analisadas com média de 32.916 cistos por grama quando o sistema foi operado em aeração prolongada e de 60.509 cistos por grama, no convencional. Oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados em 60% (6/10) das amostras, resultados superiores aos encontrados por Bonatti (2007), com média de 1405 oocistos por grama, quando em aeração prolongada e de 958 oocistos por grama, no convencional. Ainda com relação a apenas *Cryptosporidium*, foi menor se comparada às

porcentagens de amostras positivas relatadas por Iacovski *et al.* (2004). Houve diferença estatística entre a concentração de cistos e a de oocistos ($p < 0,05$). No entanto, não foram verificadas diferenças entre as concentrações de cistos, ao se comparar o sistema operado em aeração prolongada e de modo convencional ($p = 0,4109$).

Os resultados mostram ainda concentração expressiva de cistos e oocistos no lodo, superiores aos dados encontrados por Graczyk et al. (2008) de aproximadamente 27 cistos de *Giardia* e 14 oocistos de *Cryptosporidium* por grama de lodo de ETE; aos de Bonatti (2007), de até 4800 cistos de *Giardia* por grama e de Gerba et al. (2011), cujas concentrações se mostraram: para *Giardia*, de 10 a 1000 cistos por grama e *Cryptosporidium*, de 100 a 2000 oocistos por grama.

De acordo com Iacovski et al. (2004), a variação tanto da concentração de cistos e oocistos, quanto da porcentagem de amostras positivas depende das características da população servida pela ETE como, por exemplo, o nível de infecção dos indivíduos por esses protozoários. Há que se relatar ainda a extrapolação dos resultados, pois são retirados 10 µL de amostra para leitura de um volume de sedimento de 5 mL, conforme a equação 4.1.

Com relação à viabilidade dos oocistos de *Cryptosporidium*, para o TRC de 20 dias, 88% se apresentaram viáveis, enquanto que para o TRC de 7 dias, 100%. A viabilidade dos cistos de *Giardia* pode ser verificada na figura 4.4. Exemplos de cistos de *Giardia*, viável e não viável, podem ser visualizados na figura 4.5.

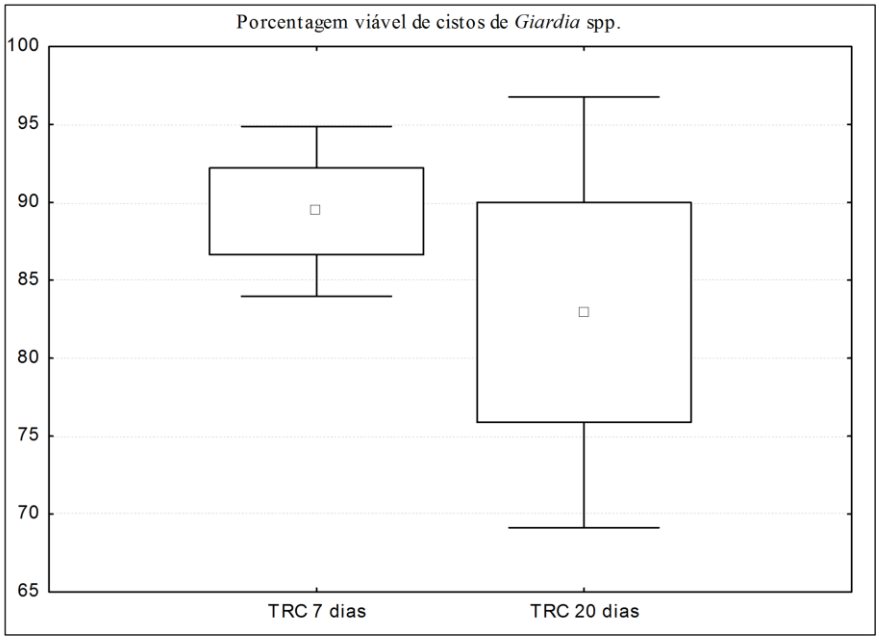
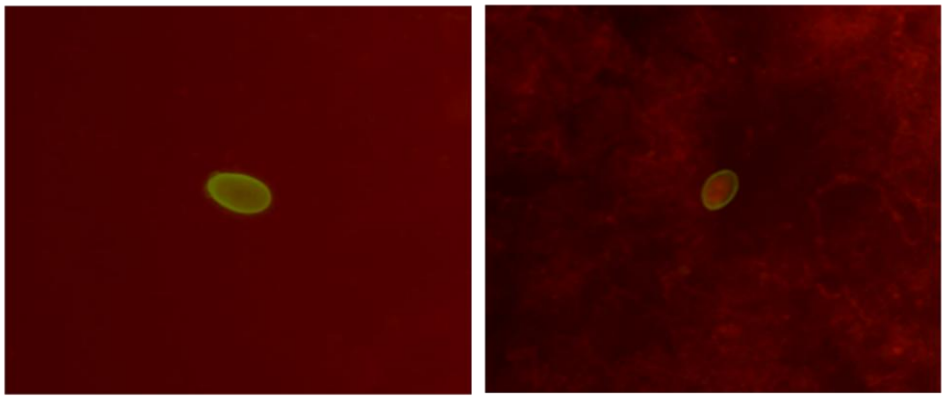


Figura 4.4 - Viabilidade de cistos de *Giardia* spp. em lodo de esgoto proveniente de sistema de lodos ativados (ETE - piloto).



Legenda:

I – cisto de *Giardia* viável (Aumento de 500x)

II – cisto de *Giardia* não viável. (Aumento de 400x).

Figura 4.5 - Exemplos de cistos de *Giardia* spp. viável e não viável em lodo de esgoto.

Não foi encontrada diferença estatística quanto à viabilidade dos cistos e dos oocistos em relação aos tempos de residência celular empregados.

4.3.2 - ETE - em escala plena, do município de Limeira - SP

As amostras de lodo foram 100% positivas para *Giardia* e 25%, para *Cryptosporidium* e as médias das concentrações de cistos e oocistos encontradas no lodo da ETE - Limeira foram:

- 32816 para cistos de *Giardia* por grama, sendo 92% deles viáveis;
- 994 para oocistos de *Cryptosporidium*, sendo que 75% apresentaram viáveis.

Tanto as médias de cistos como as de oocistos foram próximas às encontradas na ETE - USP São Carlos. Nestes casos, não houve diferenças estatísticas entre as médias e entre as porcentagens de viabilidade da duas ETEs - escala plena e escala piloto.

Graczyk et al. (2007) encontraram concentrações de até 114 cistos de *Giardia* e 110 oocistos de *Cryptosporidium*, na torta de lodo proveniente de sistema de lodos ativados. Os mesmos autores também relatam que a grande maioria dos (oo)cistos contabilizados estavam viáveis (> 99%).

Os resultados encontrados suscitam preocupação devido à potencial contaminação do lodo destinado à aplicação no solo, sendo necessário tratamento. Como um dos principais destinos do lodo de esgoto é o uso na agricultura, devem ser

ressaltados os riscos diretos e indiretos, como: contaminação do solo, da água, das plantações, etc.. Além disso, deve-se atentar ao manejo do lodo para preservar a saúde dos trabalhadores e outras populações expostas.

4.4 - CONCLUSÃO

A mudança de operação do sistema de lodos ativados, de aeração prolongada para convencional, na ETE - USP São Carlos, não ocasionou diferença na concentração de (oo)cistos dos protozoários pesquisados no lodo e nem de sua viabilidade.

As concentrações de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* observadas no lodo em ambas ETEs ressaltam riscos potenciais à saúde humana, caso ocorra utilização de lodo de esgoto sem tratamento, pois grande parte ainda se encontra viável.

Capítulo 5

Remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em ETE em escala plena.

O intuito deste capítulo foi avaliar a remoção e a viabilidade de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em diferentes processos de tratamento de esgoto sanitário em uma ETE em escala plena.

5.1. INTRODUÇÃO

A concentração desses microrganismos no afluente da ETE está diretamente relacionada à prevalência de infecção na população (KISTEMANN et al., 2008). Sendo assim, a eficiência da ETE em remover microrganismos é uma das mais importantes barreiras para reduzir o aporte de (oo)cistos em corpos receptores (SYKORA et al., 1991).

O esgoto sanitário pode se transformar em potencial fonte de protozoários patogênicos, caso ainda haja presença de cistos e oocistos na fase líquida (efluente final) e/ou na fase sólida (lodo). No entanto, essa eficiência depende do sistema de tratamento empregado (SANTOS et al., 2004; LIM et al., 2007; KISTERMANN et al., 2008; CHENG et al., 2009).

O esgoto sanitário é fonte de cistos e pode ter papel significativo na transmissão de doenças veiculadas pela água. O que torna o cenário mais crítico é que, atualmente, águas residuárias tratadas em ETE são despejadas frequentemente em água de rios que serão utilizados para abastecimento público, irrigação, recreação, mais a jusante. Estes efluentes de ETEs contendo patógenos como *Giardia* e *Cryptosporidium*, pois não foram suficientemente tratados, podem aumentar o risco de infecção em humanos e animais. Segundo Santos et al. (2004), dados da ocorrência e concentração de (oo)cistos no esgoto, no Brasil, são ainda escassos.

5.2. OBJETIVO

O presente estudo tentou elucidar o desempenho de uma ETE em escala plena, que contém tratamento preliminar, reator UASB, sistema de lodos ativados e etapa de desinfecção por radiação ultravioleta, na remoção de protozoários patogênicos.

Como objetivos específicos:

- Avaliar a remoção e a viabilidade dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nos diferentes processos de tratamento;
- Avaliar a remoção de microrganismos indicadores – coliformes totais, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* - nos diferentes processos de tratamento;

- Analisar os impactos da radiação ultravioleta na viabilidade de cistos e oocistos.
- Comparar os dados de remoção de microrganismos encontrados na ETE em escala plena com os da ETE em escala piloto.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 - A ETE

A ETE em escala plena, que serviu de estudo, está situada no município de Limeira, no estado de São Paulo, Brasil, e trata, em média, 90 litros por segundo de esgoto, praticamente, todo doméstico. O esgoto bruto chega à ETE e, por uma estação elevatória, é bombeado à entrada do tratamento preliminar composto de: grades, peneiras e caixa aerada de remoção de areia.

Após essa etapa, o esgoto é encaminhado aos reatores UASB e em seguida, ao sistema de lodos ativados, composto por tanque de aeração e decantador. O efluente do tratamento secundário passa, antes de ser lançado ao corpo receptor, através da unidade de desinfecção composta por lâmpadas que emitem radiação ultravioleta.

As principais unidades de tratamento que compõem a ETE podem ser visualizadas da figura 5.1.

Figura 5.1 - Principais unidades de tratamento da ETE situada no município de Limeira - SP. I- caixa aerada de remoção de areia; II - reatores UASB; III - Lodos Ativados e IV: desinfecção com radiação ultravioleta.

5.3.2 - Amostragem

Foram realizadas quatro coletas entre os meses de setembro de 2012 e fevereiro de 2013. As amostras de esgoto bruto, do efluente do tratamento preliminar, reator UASB, sistema de lodos ativados e desinfecção por radiação ultravioleta, foram recolhidas no período da manhã, por volta das 9 horas e eram armazenadas em frascos de 1 litro previamente lavados, desinfetados e enxaguados com solução Tween 80 (0,1%). As amostras foram transportadas em isopor com gelo para serem analisadas no Laboratório de Tratamento Avançado e Reúso de Águas (LATAR), na USP - Campus São Carlos.

5.3.3 - Análises Físico-Químicas

As análises físico-químicas realizadas para caracterização e monitoramento de cada uma das etapas de tratamento da ETE estão apresentadas na tabela 5.1, as quais seguiram o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Tabela 5.1 - Métodos analíticos empregados para análises físico-químicas de efluentes da ETE - escala plena, situada no município de Limeira - SP.

Variável	**Método e Equipamentos**
Absorbância em comprimento de onda de 254nm	Espectrofotômetro DR 4000 ou DR 5000.
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	Método colorimétrico em refluxo fechado (5220 D)
pH	Método Potenciométrico. pH meter - Denver Instrument
Sólidos Totais	Método Gravimétrico (2540 B)
Sólidos Suspensos Totais	Método Gravimétrico – filtração em membrana (1,2 μm) (2540 B)
Turbidez	Turbidímetro 2100 P

5.3.4 - Exames Microbiológicos

As análises de coliformes totais, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* decorreram conforme relatado no capítulo 3, itens 3.3.4.1 e 3.3.4.2, respectivamente.

A análise de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* foi realizada de duas maneiras diferentes: caso a amostra apresentasse média ou elevada turbidez (acima de 25 uT), utilizava-se o método da tripla centrifugação, como relatado no capítulo 2, no item 2.3.2.1.1. Porém, caso a turbidez fosse baixa, era empregado o método da filtração em membrana, como relatado no capítulo 2, no item 2.3.2.3; sendo realizado, principalmente, para amostras de efluente do lodos ativados e da unidade de desinfecção.

Depois da etapa inicial de concentração da amostra, foi utilizada a reação por imunofluorescência direta (RID), com o kit Merifluor, como relatado no capítulo 2, no item 2.3.5. A viabilidade dos cistos e oocistos foi inferida através da coloração diferencial com iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, USA), conforme relatado no capítulo 3, item 3.3.4.3.

Fagnani (2010) avaliou cistos e oocistos submetidos ao processo oxidativo avançado composto de peróxido de hidrogênio com radiação ultravioleta e os classificou em quatro classes diferentes (A, B, C e D) relacionadas a danos morfológicos e fluorescência após a RID. De acordo com a autora, a RID baseia-se em reações de anticorpos monoclonais anti-*Giardia* e anti-*Cryptosporidium* com epítopos

presentes na paredes dos (oo)cistos, os quais sob irradiação em 490 nm, apresentam coloração verde-maçã brilhante, conforme o esquema apresentado na figura 5.2.

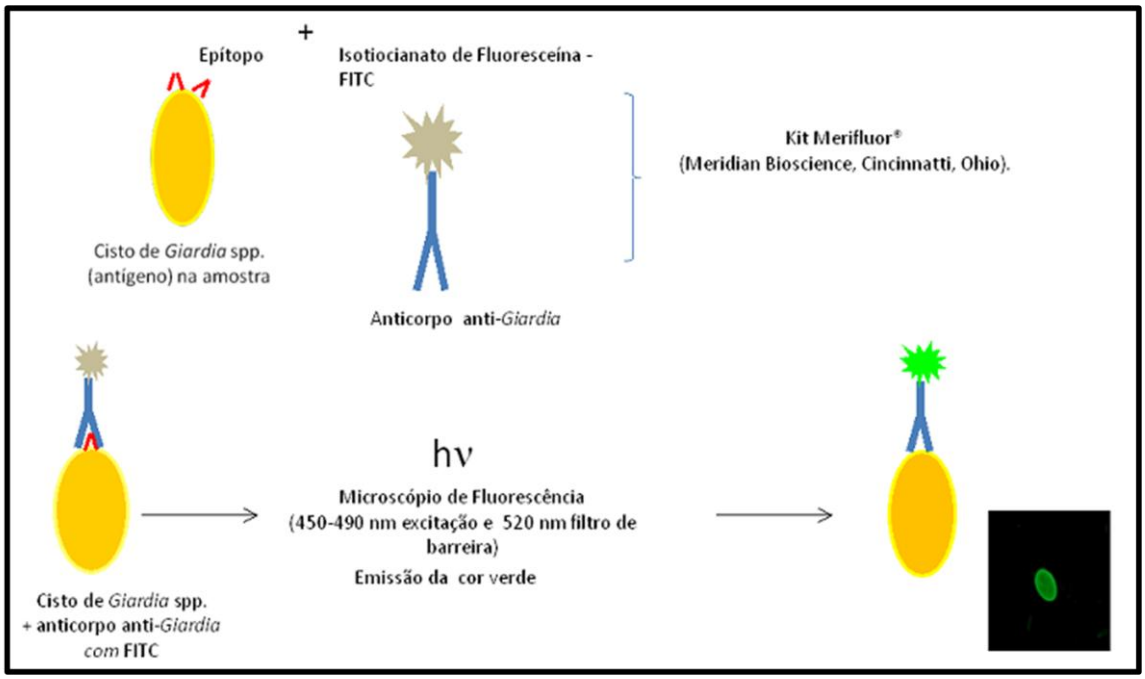


Figura 5.2 - Reação de Imunofluorescência Direta (Fonte: FAGNANI, 2010).

No presente estudo, a partir de observações iniciais de (oo)cistos na ETE - piloto (USP - São Carlos), optou-se em verificar alterações da fluorescência para (oo)cistos nas amostras coletadas na ETE em escala plena. Sendo assim, foram classificados em:

- (oo)cistos viáveis com fluorescência padrão (figura 5.3-II)
- (oo)cistos viáveis com fluorescência alterada (figura 5.3-I)
- (oo)cistos inviáveis (penetração de iodeto de propídeo)

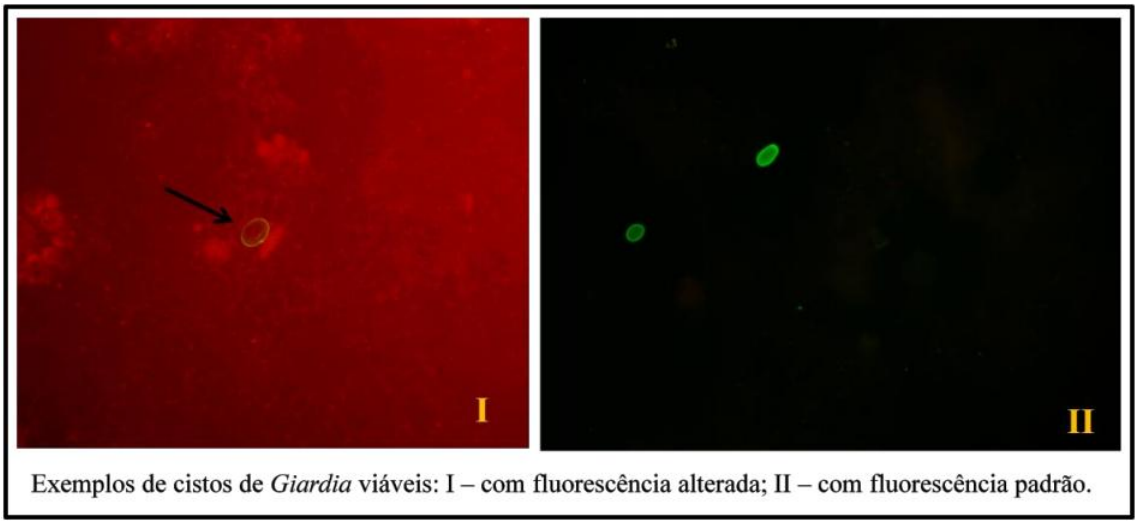


Figura 5.3 - Classificação de cistos viáveis de *Giardia* de acordo com a fluorescência (400x)

Ao contrário de Fagnani (2010), que avaliou a presença ou ausência de danos morfológicos, no presente trabalho foi inferido que estes danos, quando expressivos, permitiriam a penetração do corante iodeto de propídeo, sendo, portanto, contabilizados como (oo)cistos inviáveis e quando não expressivos, provocariam apenas alteração na fluorescência dos (oo)cistos viáveis.

As alterações da fluorescência foram confirmadas por microscopia de campo claro, pois assim, segundo Fagnani (2010), poderia ser verificada se a alteração da fluorescência foi devida a destruições de epítopos de ligação com o anticorpo monoclonal ou se havia estruturas aderidas aos (oo)cistos que não permitiram a ligação anticorpo - epítopo.

As amostras foram examinadas em microscópio de imunofluorescência (Olympus BX51) sob aumento de 400X a 800X. Para o cálculo da concentração de (oo)cistos por litro, foi utilizada a equação (5.1) de Cantusio Neto (2004).

$$\frac{\text{n° de (oo)cistos detectados x } 10^6 \text{ x volume total do sedimento (mL)}}{\text{volume de sedimento na lâmina (µL) x volume da amostra (mL)}} \qquad (5.1)$$

5.3.5 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada empregando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc, 2004). Os dados, quando necessários, foram transformados a fim de apresentarem distribuição normal – verificada por teste Shapiro-Wilk; a homogeneidade de variâncias foi verificada por teste de Levene e as comparações entre médias foram feitas utilizando o teste "t" de Student. Quando os dados não puderam ser transformados, foram aplicados testes não-paramétricos de Wilcoxon para variáveis dependentes ou o teste de U de Mann-Whitney para variáveis independentes. Em todos os testes, a diferença entre as variáveis foi considerada significante quando $p < 0,05$.

5.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 - Monitoramento de variáveis físicas e químicas

O monitoramento dos parâmetros físico-químicos da ETE - escala plena, do município de Limeira, está apresentado nas tabelas 5.2 e 5.3.

Primeiramente, vale ressaltar que o aumento do pH no tratamento preliminar foi devido à adição de cal junto à caixa aerada de remoção de areia, a qual auxiliava na homogeneização e, por fim, garantia alcalinidade suficiente para o bom funcionamento do reator UASB.

Através do teste "t" para amostras dependentes, foi verificado que o afluente bruto e o efluente do tratamento preliminar apresentam características similares de turbidez, absorbância 254nm, DQO, ST, SST e SDT. Essa igualdade também foi significativa para os efluentes do lodos ativados e da unidade de desinfecção (iguais, pH, absorbância 254 nm, DQO, ST, SST e SDT).

Os reatores UASB e o sistema de lodos ativados apresentaram boas remoções nas características físicas e químicas analisadas, permitindo que o efluente chegasse à unidade de desinfecção com baixas turbidez, absorbância 254nm, DQO e SST, principalmente, o que facilita a penetração da radiação ultravioleta no efluente para atingir o microrganismos alvo.

Ao comparar os resultados de remoção encontrados para as ETEs, escala plena e piloto (USP- São Carlos), através da aplicação do teste "t" para amostras independentes, verificou-se que:

- O reator UASB da ETE escala real foi significativamente mais eficiente apenas na diminuição de absorbância 254 nm (valor - p = 0,031);
- O sistema de lodos ativados da ETE escala plena foi significativamente mais eficiente na remoção de turbidez e de DQO (valor - p = 0,014 e 0,016; respectivamente);
- E a remoção geral nos reatores biológicos - UASB + lodos ativados - na ETE escala plena foi significativamente maior para turbidez, absorbância 254 nm e DQO (p = 0,04, 0,018 e 0,032; respectivamente).

Tabela 5.2 - Resultado do monitoramento físico-químico da ETE em escala plena, situada no município de Limeira - SP (afluente bruto, após tratamento preliminar; após reator UASB).

Variável	Afluente Bruto				Efluente Tratamento Preliminar				Efluente reator UASB			
	Média	**Desvio Padrão**	**Valor Mínimo**	**Valor Máximo**	**Média**	**Desvio Padrão**	**Valor Mínimo**	**Valor Máximo**	**Média**	**Desvio Padrão**	**Valor Mínimo**	**Valor Máximo**
pH	7,18	0,26	6,82	7,43	8,46	027	8,10	8,75	7,22	0,10	7,11	7,31
Turbidez (uT)	389	166,5	236	626	285,3	52,5	233	346	83,8	30,8	61,4	127
Abs 254 nm	2,243	0,325	1,835	2,630	1,925	0,215	1,721	2,227	0,571	0,081	0,491	0,643
DQO ($mg.L^{-1}$)	1079	418	721	1679	724	74	625	805	168	24	148	197
ST ($mg.L^{-1}$)	989	320	669	1433	895	101	753	971	534	101	424	655
SST ($mg.L^{-1}$)	373	145	230	574	301	69	245	401	41	6,0	37	50
SDT ($mg.L^{-1}$)	616	176	439	859	594	76	508	691	493	101	384	618

Nota: AP: alcalinidade parcial; AT: alcalinidade total; DQO: demanda química de oxigênio; ST: sólidos totais; SST: sólidos suspensos totais; SDT: sólidos dissolvidos totais.

Tabela 5.3 - Resultado do monitoramento físico-químico da ETE em escala plena, situada no município de Limeira - SP (efluente do sistema de lodos ativados e após desinfecção com radiação UV).

Variável	Efluente Lodos Ativados				Efluente Desinfecção com UV				Eficiência Remoção				
	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Tratamento Preliminar	Reator UASB	Lodos Ativados	Desinfecção UV	Global
pH	6,33	0,15	6,19	6,51	7,11	0,25	6,91	7,46	-	-	-	-	-
Turbidez (uT)	4,25	0,63	3,57	4,80	4,01	0,75	3,17	4,70	21,1	70,6	94,4	6,2	98,8
Abs 254 nm	0,227	0,021	0,199	0,251	0,232	0,022	0,202	0,253	13,3	70,3	59,9	0	89,6
DQO ($mg.L^{-1}$)	37	12	22	47	41	20	22	66	26,9	76,7	78,3	3	96,3
ST ($mg.L^{-1}$)	347	256	64	685	340	239	65	648	9,5	40,4	36,8	1,4	60,7
SST ($mg.L^{-1}$)	9,0	5,0	5,0	14	13	15	1,0	32	18,4	85,8	77,5	40	96,3
SDT ($mg.L^{-1}$)	339	253	59	674	328	233	65	632	8,0	17,6	34,5	2,8	42,3

Nota: AP: alcalinidade parcial; AT: alcalinidade total; DQO: demanda química de oxigênio; ST: sólidos totais; SST: sólidos suspensos totais; SDT: sólidos dissolvidos totais.

5.4.2 - Monitoramento microbiológico

O resultado do monitoramento dos microrganismos indicadores e dos dois protozoários patogênicos pode ser visualizado na tabela 5.4.

São verificadas elevadas concentrações dos indicadores de contaminação fecal - coliformes totais, *E. coli* e *Clostridium perfringens* - e de protozoários patogênicos - *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. - no esgoto bruto.

Ao se comparar com o efluente da ETE - USP São Carlos, as concentrações de *Giardia* spp., *Clostridium* sp., coliformes totais e *E. coli* no esgoto bruto foram superiores significativamente (valor - p = 0,0001; 0,002; 0,0001 e 0,0001, respectivamente).

Com relação aos protozoários pesquisados, vale ressaltar que todas as amostras analisadas (20), sejam do afluente bruto, efluentes tratados e desinfetados, foram positivas para cistos de *Giardia*, porcentagem similar à encontrada na ETE piloto da USP São Carlos e em 95% das amostras, (19/20), para oocistos de *Cryptosporidium* (porcentagem superior à encontrada na ETE piloto).

Como relatado no capítulo 3, as altas concentrações de (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* presentes no esgoto refletem a incidência na população (OTTOSON et al., 2006; CHENG et al., 2009; NASSER et al., 2012). Apesar de não existir nenhum dado oficial de surto no país, há estudos que revelam alta prevalência destes parasitas na população brasileira, principalmente em áreas com condições sanitárias precárias (RAZZOLINI et al., 2011), como também pode ser visto no capítulo 1 deste trabalho.

Ao comparar as remoções de micro-organismos na ETE escala real com a ETE piloto (USP São Carlos), foram encontrados os seguintes resultados:

- O reator UASB operado na ETE em Limeira apresentou remoções significativamente maiores (Teste Mann-Whitney, valor $p < 0,05$) para *E. coli*, *Clostridium perfringens* e cistos de *Giardia*. Enquanto que a remoção de coliformes totais foram estatisticamente iguais para ambas ETEs.
- Ao analisar apenas os sistemas de lodos ativados, a ETE em escala plena obteve maiores remoções de coliformes totais e *Clostridium perfringens* (Teste Mann-Whitney e teste "t", respectivamente; $p < 0,05$).

Tabela 5.4 - Resultado do monitoramento microbiológico da ETE em escala plena, situada no município de Limeira - SP.

Variável	Afluente Bruto	Efluente Tratamento Preliminar		Efluente Reator UASB		Efluente Lodos Ativados		Efluente Desinfecção UV		Remoção (UASB + Lodos Ativados)	Remoção Global
	Média geométrica	Média geométrica	Remoção (log)	Média geométrica	Remoção (log)	Média geométrica	Remoção (log)	Média geométrica	Remoção (log)		
***Escherichia coli* ***	$7,3 \times 10^{7}$	$4,0 \times 10^{7}$	0,26	$4,0 \times 10^{6}$	1,00	$3,1 \times 10^{4}$	2,11	$4,2 \times 10^{3}$	0,86	3,38	4,24
Coliformes totais *	$2,4 \times 10^{8}$	$2,1 \times 10^{8}$	0,08	$1,5 \times 10^{7}$	1,15	$1,9 \times 10^{5}$	1,89	$3,4 \times 10^{4}$	0,74	3,11	3,85
***Clostridium* sp. ***	$4,4 \times 10^{5}$	$2,9 \times 10^{5}$	0,18	$7,0 \times 10^{4}$	0,63	$8,7 \times 10^{3}$	0,91	$6,0 \times 10^{3}$	0,16	1,71	1,87
Giardia* spp. *	$7,0 \times 10^{4}$	$3,7 \times 10^{4}$	0,27	$7,0 \times 10^{3}$	0,73	$1,1 \times 10^{3}$	0,78	$1,0 \times 10^{3}$	0,04	1,79	1,82
Cryptosporidium* spp.*	$5,1 \times 10^{2}$	$4,6 \times 10^{2}$	0,04	$1,8 \times 10^{2}$	0,40	$6,0 \times 10^{1}$	0,47	$3,3 \times 10^{1}$	0,27	0,91	1,18

Nota: *UFC/100 mL; **(oo)cistos/L. Os valores apresentados de remoção dos micro-organismos, em unidades logarítmicas, são a média de remoção a partir das quatro coletas de amostra realizadas.

Não obstante, a remoção de *E. coli* e de cistos de *Giardia* foram estatisticamente iguais.

- Quanto ao tratamento biológico composto por reator UASB seguido pelo sistema de lodos ativados, houve remoção estatisticamente maior na ETE em escala plena para coliformes totais e *Clostridium perfringens*. Para *E. coli* e cistos de *Giardia*, ambas ETEs apresentaram remoções similares.

Através do teste estatístico de Mann-Whitney foi constatado que as remoções de *E. coli* e coliformes totais foram maiores quando comparados a *Clostridium perfringens*, cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* ao analisar os reatores biológicos (UASB seguido de lodos ativados), resultado similar ao encontrado na ETE - piloto (USP - São Carlos) e também na inativação pela desinfecção por radiação ultravioleta e na remoção global promovida pela ETE em escala plena. Ressalta-se a importância desses resultados pois são microrganismos de difícil inativação por desinfecção.

Wen et al. (2009) também encontraram diferenças significativas ao analisar ETE - piloto e ETE em escala plena, ambas com sistema de lodos ativados. Esses autores constataram remoções similares para *E. coli* e coliformes totais; porém, menores para *Clostridium perfringens* e cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* na ETE em escala plena.

A ETE - Limeira apresentou remoções de (oo)cistos de protozoários, através do sistema de lodos ativados, próximas às relatadas por Lim et al. (2007), na Malásia; Castro-Hermida et al. (2008), na Espanha; Wen et al. (2009), na Austrália; Cheng et al. (2009), na Irlanda; porém, menores que os encontrados por Montemayor et al. (2005), na Espanha e Moulin et al. (2010), na França.

A ETE em estudo também apresentou remoção de esporos de *Clostridium perfringens* e *E. coli*, através do reator UASB, próxima à encontrada por Ottoson et al. (2006). Remoções de esporos de *Clostridium perfringens*, *E. coli* e coliformes totais, pelo sistema de lodos ativados, foram similares às encontradas por Wen et al. (2009) e um pouco menores quando comparadas às relatadas por Ottoson et al. (2006) e Moulin et al. (2010).

Além disso, a porcentagem de cistos de *Giardia* viáveis não variou significativamente durante o tratamento ($p > 0,05$; teste de Wilcoxon), representando risco à saúde humana, como pode ser visto na figura 5.4.

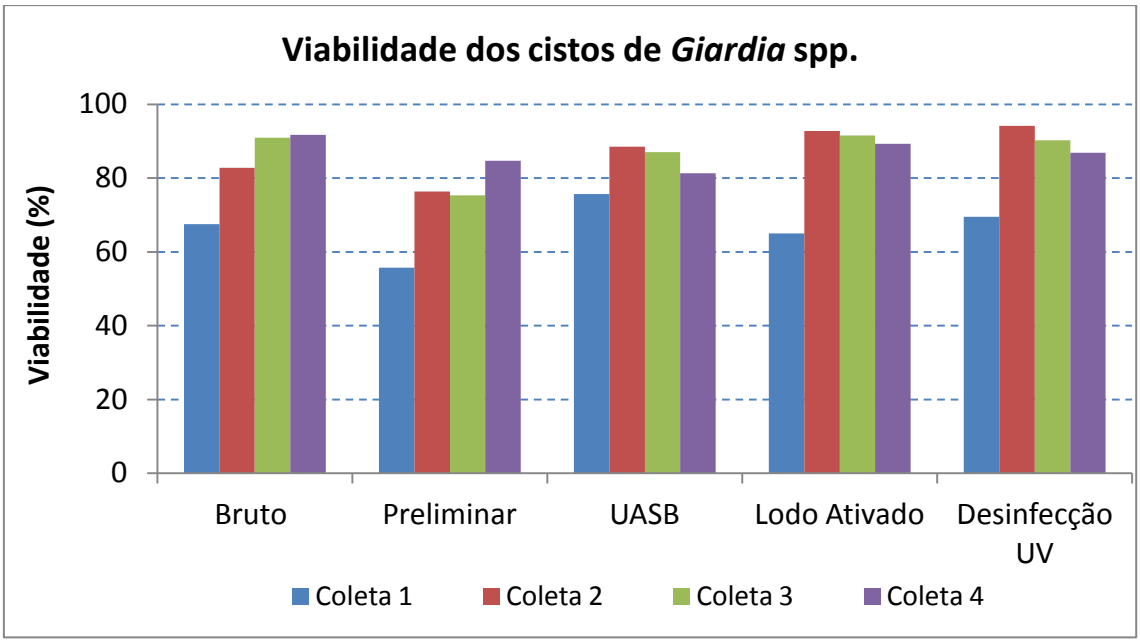


Figura 5.4 - Viabilidade dos cistos de *Giardia* spp. no decorrer do tratamento da ETE em escala plena, situada no município de Limeira - SP.

Os valores de porcentagem de cistos viáveis variou de 56% (efluente do tratamento preliminar, na primeira coleta) a 94% em efluente após a desinfecção ultravioleta, na segunda coleta). Com relação aos oocistos de *Cryptosporidium*, a viabilidade variou de 50 a 100% nos diferentes efluentes do tratamento. Pode-se inferir que os processos de tratamento retiveram principalmente os (oo)cistos não viáveis.

Nas amostras de efluente da ETE - escala plena, não só a inferência de viabilidade foi analisada, mas também a alteração de fluorescência dos cistos e oocistos viáveis encontrados nos diferentes efluentes coletados durante o tratamento, como pode ser visualizado na figura 5.5.

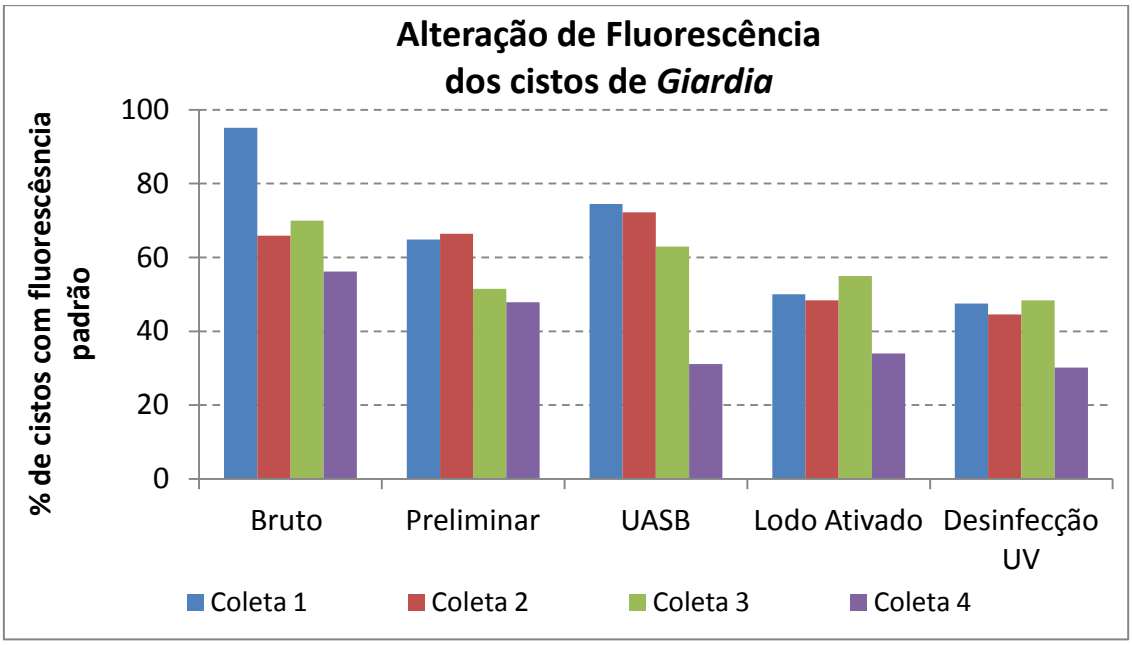


Figura 5.5 - Avaliação da alteração da fluorescência dos cistos de *Giardia* em amostras de efluentes bruto e tratados de uma ETE em escala plena, situada no município de Limeira - SP.

Pode-se observar declínio da porcentagem de cistos com fluorescência padrão, o qual se acentua, principalmente a partir o tratamento aeróbio por lodos ativados e na desinfecção por radiação ultravioleta, confirmado estatisticamente pelo teste "t".

Ainda com relação à etapa de desinfecção, a dose aplicada contribuiu pouco para a inativação de microrganismos indicadores e protozoários patogênicos, mas suficiente para garantir que o efluente atendesse à legislação pertinente. Quanto aos (oo)cistos, não foram encontradas diferenças entre a porcentagem viável e alteração da fluorescência dos (oo)cistos viáveis entre amostras de lodo ativado e as de desinfecção por radiação ultravioleta.

5.5 - CONCLUSÕES

O estudo do comportamento de reatores em ETE de escala plena proporcionou elucidar diferenças e similaridades nos resultados de remoção microbiológica e físico-química quando comparados a reatores da ETE piloto, da USP São Carlos.

A remoção de cistos e oocistos foram menores que 2 log, bem como de esporos de *Clostridium perfringens*. No entanto, as remoções médias de coliformes totais e *E. coli* foram próximas a 4 unidades logarítmicas. Esses resultados foram similares a outros trabalhos pesquisados na literatura.

Foram encontradas concentrações de microrganismos indicadores e protozoários patogênicos no esgoto estatisticamente superiores aos resultados da ETE piloto, o que pode refletir a contribuição de número maior de indivíduos com giardíase e criptosporidiose, dependendo da localidade.

Apesar de a porcentagem viável de cistos de *Giardia* não se modificar durante o tratamento, foi constatada alteração de fluorescência dos cistos viáveis, o que mostra que os processos de tratamento estão causando danos morfológicos na parede de cistos e oocistos, mas ainda não tão "profundos" para deixá-los inviáveis.

Capítulo 6

Pós-tratamento de efluente secundário por desinfecção: ensaios individuais e sequenciais em batelada

O intuito deste capítulo foi avaliar a ação dos desinfetantes - cloro, ozônio e radiação ultravioleta - na inativação de coliformes totais, *Escherichia coli* e *Clostridium perfingens*, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., a partir de ensaios individuais e sequenciais, em batelada.

6.1. INTRODUÇÃO

A gestão de recursos hídricos precisa ser estendida até o lançamento de esgotos tratados e desinfetados, pois esgotos não desinfetados quando lançados nos corpos d´água, ou reutilizados, podem representar riscos à saúde pública (LI et al., 2009; WANG et al., 2012; ROBERTSON et al., 2000). Além disso, o conceito de barreiras múltiplas envolve desde a proteção dos mananciais (superficiais e subterrâneos) até a otimização dos processos de tratamento de água e de sistemas de distribuição (EDZWALD; KELLEY, 1998).

O lançamento de esgoto *in natura* em corpos d´água é um dos principais problemas de saúde pública e investimentos em reúso direto de águas residuárias devem fazer parte de metas de gestão de recursos hídricos (ROSE, 2007). Por conseguinte, um eficiente processo de tratamento de esgoto, com alta eficiência na remoção e inativação de microrganismos, diminui o aporte de patógenos aos mananciais. (CASTRO-HERMIDA et al., 2008; EDZWALD; KELLEY, 1998).

Os cistos e oocistos são detectados em águas superficiais devido ao descarte de efluentes domésticos, tratados e não tratados, águas pluviais provenientes de áreas agrícolas, chegando a mananciais utilizados para balneabilidade, abastecimento de água para consumo humano, irrigação, dessedentação de animais, vindo a manter o ambiente sempre contaminado (MEDEMA et al., 1997; CARRARO et al., 2000).

6.2. DESINFECÇÃO DE ESGOTO SANITÁRIO

A desinfecção é a inativação de microrganismos capazes de causar doenças a um nível que não seja mais significante à saúde pública. A desinfecção de água para abastecimento público é provavelmente a medida de prevenção de doenças mais significativa na história humana (BITTON, 2011).

Robert Koch foi o responsável pelos primeiros experimentos de desinfecção, usando culturas puras de bactérias, ao estudar os efeitos do fenol e do dióxido de enxofre em esporos de *Bacillus anthracis* em 1886. Após esse episódio, outros pesquisadores estudaram a creolina, cloreto de mercúrio, nitrato de prata como desinfetantes em infecções de cólera e febre tifóide, no início do século XX (CHICK, 1908).

Como se pode perceber nos capítulos anteriores, o tratamento convencional de águas residuárias, na ausência de desinfecção, não fornece remoção e inativação de patógeno com eficiência compatível com o padrão microbiológico de água para reúso e contato público. Desse modo, a desinfecção traria: proteção da saúde pública, ao servir de barreira contra organismos patogênicos; redução do risco de transmissão de doenças; além de objetivar e garantir reúso da água (BITTON, 2011; CREBELLI et al., 2005; WANG et al., 2012; WEF, 1996).

6.2.1 - Cloro

O cloro é o desinfetante mais utilizado mundialmente para tratamento de água e águas residuárias, ajudando a reduzir o número de surtos de doenças de veiculação hídrica e por alimentos contaminados. O primeiro sistema de cloração de água de abastecimento data de 1902, na Bélgica (BITTON, 2011).

O cloro age, principalmente, na membrana plasmática da célula, modificando sua permeabilidade, promovendo a precipitação de proteínas, hidrólise e ruptura da célula; pode também provocar danos aos ácidos nucleicos (BITTON, 2011; JUNG et al., 2008; KOIVUNEN; HEINONEN-TANSKI, 2005; METCALF; EDDY, 2003; WANG et al., 2012; WEF, 1996).

A reação do cloro gasoso na água ocorre da seguinte maneira (equação 6.1)(WHITE'S..., 2010):

$$Cl_2 + H_2O \leftrightarrow HClO + H^+ + Cl^- \qquad K_{eq} = 3{,}94.10^4 \text{ a } 25^oC \qquad (6.1)$$

O ácido hipocloroso (*HClO*) pode dissociar-se, formando o íon hipoclorito (ClO^-) (equação 6.2).

$$HClO \leftrightarrow H^+ + ClO^- \qquad K_{eq} = 3{,}7.10^8 \text{ a } 25^oC \qquad (6.2)$$

Este equilíbrio é dependente do pH, como pode ser visto na figura 6.1. Tanto o ácido hipocloroso quanto o íon hipoclorito possuem ação desinfetante e oxidante, porém o ácido hipocloroso é mais eficiente que o íon hipoclorito na destruição dos microrganismos em geral.

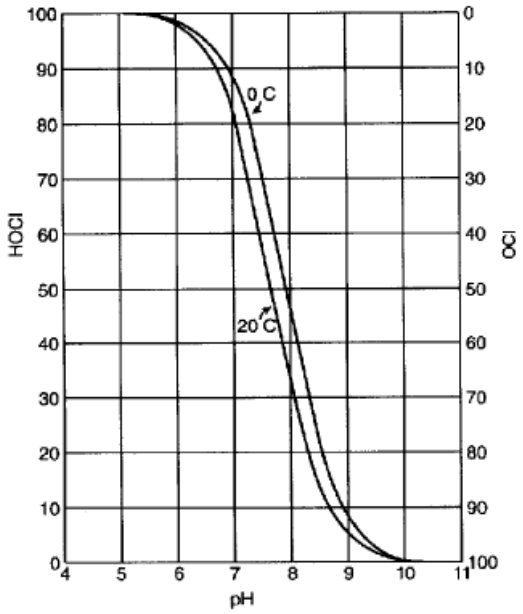


Figura 6.1 – Porcentagem de distribuição do ácido hipocloroso e íon hipoclorito na água de acordo com o pH e temperatura (METCALF; EDDY, 2003).

O cloro é muito seletivo para compostos orgânicos e sua reatividade é limitada a sítios específicos da molécula orgânica, como grupamentos amina (Deborde e von Gunten, 2008). Dessa forma, as reações do cloro com a amônia presente nas águas residuárias (equações 6.3, 6.4 e 6.5) são praticamente instantâneas em pH próximo à neutralidade (WHITE'S..., 2010):

$$HOCl + NH_3 \rightarrow NH_2Cl + H_2O \quad (6.3)$$

$$NH_2Cl + HOCl \rightarrow NHCl_2 + H_2O \quad (6.4)$$

$$NHCl_2 + HOCl \rightarrow NCl_3 + H_2O \quad (6.5)$$

As reações com compostos nitrogenados e a formação de subprodutos sendo dependentes do pH podem afetar a dose disponível de cloro residual livre apta à desinfecção (DEBORDE; VON GUNTEN, 2008). As espécies cloradas HOCl e OCl^- são definidas como cloro residual livre; enquanto que as espécies de cloraminas, cloro residual combinado (BITTON, 2011).

Apesar de as cloraminas terem potencial de desinfecção, há necessidade de um CT (concentração x tempo de contato) maior para se obter a mesma eficiência que o cloro residual livre (SAWYER et al., 2003; BEDNER et al., 2004).

A inativação de *Cryptosporidium* e *Giardia* por cloro é descrita em diversos trabalhos na literatura, apresentando elevada resistência:

- Rice et al. (1982) encontraram grande resistência, em trabalho conduzido por excistação *in vitro*. Relataram a necessidade de CT (concentração de desinfetante x tempo de contato) de 75 mg.mim.L^{-1} para 2 log de inativação de cistos de *Giardia* spp. em pH 7,0 (5ºC). Os mesmos autores ressaltam a importância de pH baixo para melhor inativação..
- Haas e Heller (1990) relataram a inativação mais rápida de cistos de *Giardia* spp. em pH 7,0 em baixas temperaturas (2,5 e 5,0 ºC) quando comparado ao pH 6,0 e 8,0, em estudos de infecção *in vivo*,
- Korich et al. (1990) conseguiram 2 log de inativação de *Cryptosporidium* spp. somente após 90 minutos e com 80 mg.L^{-1} de cloro, o que acarretou um valor de CT igual a 7200 mg.min.L^{-1}. Os autores conduziram o trabalho a 25ºC e com infectividade realizada por ensaios *in vivo*, excistação *in vitro* e viabilidade através de corantes vitais.
- Corona-Vasquez et al. (2002), através de ensaios de infectividade *in vivo* e excistação *in vitro*, precisaram, em pH 6,0, de valores de CT de 4000 mg.min.L^{-1} (20ºC) e de aproximadamente 20.000 mg.min.L^{-1} (1ºC) para conseguir 2 log de inativação de oocistos de *Cryptosporidium* spp .

Com os riscos envolvidos na estocagem do cloro gasoso e as preocupações com subprodutos da desinfecção do cloro, a partir da descoberta dos trihalometanos na década de 70, segundo Sedlak e von Gunten (2011), o uso do cloro na desinfecção em ETAs e ETEs está sendo desencorajado. Porém, segundo os mesmos autores, com a mudança para outros desinfetantes pode-se perder efeitos benéficos da cloração, principalmente na transformação de compostos desruptores endócrinos em águas residuárias e o controle do crescimento microbiano em redes de distribuição de água tratada.

Encontrar o equilíbrio entre a eficiência da desinfecção e a formação dos subprodutos da desinfecção vem sendo o foco de extensas investigações de processos alternativos de desinfecção (BITTON, 2011; NADDEO et al., 2009; VASCHETTI et al., 2003).

6.2.2 - Ozônio

O ozônio caracteriza-se por ser um forte agente oxidante, servindo para o controle de odor e oxidação química de compostos orgânicos complexos, com rápida ação desinfetante - elevada eficiência na inativação de patogênicos por destruição da parede celular e danos aos constituintes dos ácidos nucléicos (BAAWAIN, 2013; BITTON, 2011; LANGLAIS et al., 1991; LAPOLLI et al., 2003; METCALF; EDDY, 2003; WEF, 1996; WHO, 2006). Foi primeiramente utilizado para desinfetar água de abastecimento, no final do século 19, na cidade holandesa de Oudshoorn (DIAPER, 1975).

A técnica mais eficiente e utilizada para geração de ozônio é a descarga corona, a qual consiste na passagem de gás contendo oxigênio através de dois eletrodos separados por um dielétrico, onde há aplicação de alta tensão (BITTON, 2011; DIAPER, 1975; SOARES, 2007).

A inativação de microrganismos pelo ozônio se dá a partir do seu comportamento em solução aquosa e de suas reações de decomposição, que seguem dois mecanismos principais: oxidação direta do próprio ozônio molecular e oxidação indireta por radicais da decomposição do ozônio (LANGLAIS et al., 1991; USEPA, 1999; WEF, 1996).

A oxidação direta é mais seletiva e relativamente lenta comparada à indireta; mas, a concentração de ozônio se mantém elevada e os microrganismos sofrerão ataque direto do ozônio. Com relação à oxidação indireta, ela é mais rápida e ocorre em baixas concentrações de alcalinidade ou elevadas concentrações de compostos orgânicos; a oxidação ocorrerá por meio de radicais hidroxila, que é mais reativo, mas não seletivo. A decomposição do ozônio é influenciada pelo pH, temperatura, radiação ultravioleta, concentração de ozônio, e a presença de inibidores (GEHR et al., 2003; WEF, 1996; WHITE'S..., 2010).

O ozônio possui vantagens, como (BITTON, 2011; GEHR et al., 2003; WHITE'S..., 2010):

- menor dependência do pH em comparação ao cloro;
- pouco tempo de contato;
- reduz concomitantemente a cor, odor, turbidez e absorbância UV-254nm na água residuária;

- Efetivo contra praticamente todos os micro-organismos presentes nas águas residuárias.

No entanto, a desinfecção com ozônio é mais cara que a cloração e a desinfecção por radiação ultravioleta, principalmente devido ao custo de energia (BITTON, 2011; GEHR et al., 2003). A ozonização pode ser prejudicada pela temperatura, presença de sólidos suspensos, carbono orgânico total (COT), demanda química de oxigênio (DQO). Dessa maneira, sua aplicação é mais interessante em esgotos com bom nível de tratamento (JORDÃO; PESSOA, 2005; WEF, 1996; XU et al., 2002).

A ação desinfetante do ozônio pode ser evidenciada em alguns trabalhos sobre inativação de (oo)cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.:

- Wickramanayake et al. (1984) utilizaram CT de 0,53 mg.min.L^{-1},em temperatura de 5ºC, e conseguiram 2 log de inativação de cistos de *Giardia* spp., utilizando técnica de excistação. Para o mesmo CT e temperatura, USEPA (1999) encontrou valores aproximadamente 1,3 mg.min.L^{-1}. Finch et al. (1993) precisaram de CT de 0,65 mg.min.L^{-1} para a mesma eficiência, porém a uma temperatura de 22ºC, com ensaios de infectividade *in vivo*.
- Labatiuk et al. (1991) detectaram até 3 log de remoção de infectividade de cistos de *Giardia* spp. com CT de 0,5 mg.min.L^{-1}, em condição de pH 6,7 e 22ºC de temperatura. Os pesquisadores utilizaram corantes vitais, excistação *in vitro* e ensaios *in vivo*.
- Korich et al. (1990) relatam a necessidade de CT de aproximadamente 5 mg.min.L^{-1} para 2 log de inativação de *Cryptosporidium* spp., a partir do uso da porcentagem de excistação *in vitro*.
- Corona-Vasquez et al. (2002) precisaram de um CT mínimo de 2 mg.min.L^{-1} para conseguir alcançar 2 log de inativação de *Cryptosporidium* spp., em pH 7,0 e a 20ºC de temperatura. A inativação, neste caso, também foi mensurada por excistação *in vitro*.

6.2.3 - Radiação Ultravioleta

A ação bactericida da luz solar foi descoberta por Downes e Blunt em 1878. A partir de então, se tornaram cada vez mais frequentes estudos sofre os efeitos da radiação em bactéria (KOLLER, 1952). O desenvolvimento de lâmpadas de mercúrio como fontes artificiais de luz UV aconteceu em 1901 e a primeira aplicação para desinfecção de água de abastecimento foi em Marselha, França, em 1910. Em 1929,

Gates encontrou ligação entre a desinfecção por luz UV com a absorção da mesma por ácidos nucléicos (USEPA, 2006; WHITE'S..., 2010).

A luz UV é a porção do espectro eletromagnético localizada entre a luz visível e os raios X. Sua atividade germicida é devida à radiação emitida próxima ao comprimento de onda de 260 nm ser de grande absorção pelo DNA celular, como pode ser visualizado na figura 6.2, causando dimerização das bases nitrogenadas timina e citosina e consequente bloqueio da replicação do DNA (BITTON, 2011, USEPA, 2006).

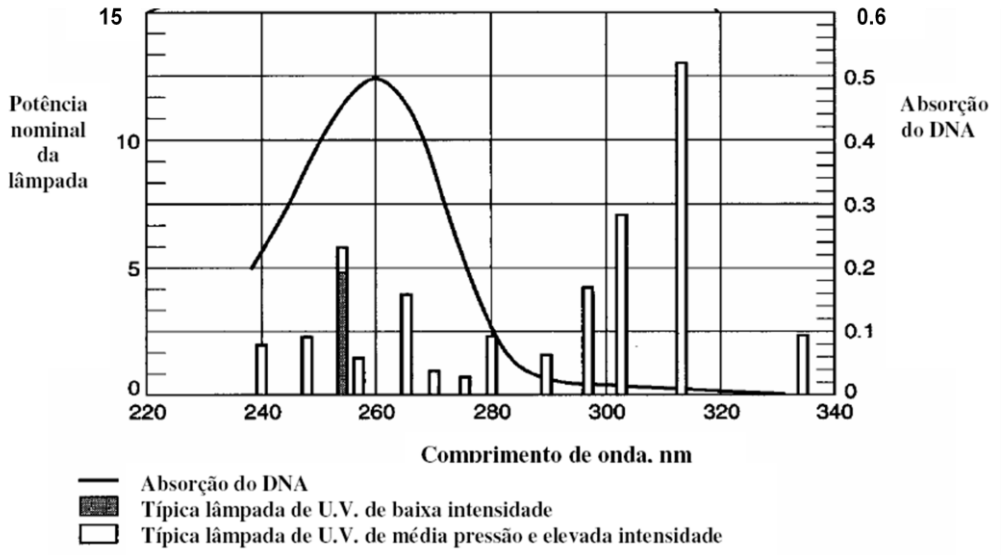


Figura 6.2 - Absorção de luz UV pelo DNA (adaptado de KUZUHARA, 2005).

A radiação ultravioleta é importante alternativa ao cloro, pois não gera subprodutos tóxicos, e quando comparada ao ozônio, tem pouca exigência de manutenção e a operação é simples (WANG et al., 2012). É cada vez mais utilizada para desinfetar água de abastecimento, efluentes domésticos e industriais, à medida que promove danos fotoquímicos no DNA e RNA das células (BITTON, 2011; GONÇALVES et al., 2003; METCALF; EDDY, 2003).

Similarmente ao ozônio, possui a vantagem no tratamento de esgoto de não deixar residual; além disso, sua eficiência não é afetada por pH e temperatura (HIJNEN et al., 2006; JORDÃO; PESSOA, 2005). Porém, alguns fatores podem afetar a eficiência da radiação UV na desinfecção, entre eles:

- o tamanho ou distribuição das partículas, concentração de sólidos suspensos e a turbidez do efluente podem influenciar na eficiência do processo, ao proteger os

microrganismos da ação da irradiação ultravioleta (LI et al., 2009; WANG et al, 2012);

- processos de reparo do DNA pelos próprios micro-organismos, incluindo a reparação por excisão da parte do DNA danificada (reparação no escuro) e a fotoreativação a partir da exposição de células lesadas à luz visível (comprimento de onda entre 300 e 500 nm) (BITTON, 2011; ROCHELLE et al., 2005; ZIMMER et al., 2003);
- condições hidráulicas do reator UV.

Estudos mais antigos relatavam as formas encistadas dos protozoários como bastante resistentes à radiação UV, necessitando doses elevadas. Entretanto, pesquisas recentes estão continuamente mudando as perspectivas de inativação de determinados microrganismos. No caso da *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., estudos de infectividade mostraram que a radiação UV, aplicada em doses relativamente baixas (5 a 15 $mJ.cm^{-2}$), apresenta-se bastante eficiente em inativá-los (HIJNEN et al., 2006; METCALF; EDDY, 2003; MODIFI et al., 2002). Alguns estudos sobre esses protozoários são comentados a seguir:

- Belosevic et al. (2001) sugeriram que *Cryptosporidium* spp. eram mais susceptíveis à inativação por radiação UV (com lâmpadas de média pressão) que cistos de *Giardia* spp. Os pesquisadores não encontraram reativação para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em doses maiores que 60 $mJ.cm^{-2}$; porém, cistos de *Giardia* spp., quando submetidos a doses inferiores a 25 $mJ.cm^{-2}$, apresentaram reativação. Os resultados desse estudo vieram de ensaios de infectividade *ex vivo* (verificação de (oo)cistos nas fezes dos animais) e *in vivo*.
- Oguma et al. (2001) encontraram reparação de dímeros de pirimidina, induzidos por radiação UV (doses de 0,72 e 1,44 $mJ.cm^{-2}$), em DNA de *Cryptosporidium* spp. após exposição à radiação fluorescente (comprimento de onda próximo a 360 nm).
- Linden et al. (2002), utilizando ensaios *in vivo* de infectividade, encontraram 2,6 log de inativação de *Giardia* spp. em água com dose de apenas 5 $mJ.cm^{-2}$. Com a aplicação de dose de 10 $mJ.cm^{-2}$, alcançaram mais de 4 log de remoção. Os pesquisadores não encontraram recuperação dos cistos quando submetidos à dose de 16 e 40 $mJ.cm^{-2}$.

- Modifi et al. (2002) verificaram mais de 2 log de inativação de cistos de *Giardia* spp. em dose de UV de até 3 $mJ.cm^{-2}$, utilizando ensaios de infectividade *in vivo*.
- Campbell e Wallis (2002) constataram que dose de 10 $mJ.cm^{-2}$ foi capaz de inativar aproximadamente 99% (2 log) de cistos de *Giardia* spp., com utilização de ensaio *in vivo*.
- Bukhari et al. (2004) encontraram 4 log de inativação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. com aplicação de dose de 4 $mJ.cm^{-2}$,.
- Cantusio Neto et al. (2006) observaram a presença de infectividade de cistos de *Giardia* spp. desinfetados com dose entre 25 e 30 $mJ.cm^{-2}$ em 33% dos animais submetidos a ensaio *in vivo*.
- Li et al. (2008) encontraram trofozoítos de *Giardia* spp. ainda infectivos quando submetidos à dose de 1 $mJ.cm^{-2}$, em ensaios *in vivo*. Evidências de sobrevivência e reativação a doses de 20 e 40 $mJ.cm^{-2}$ foram ambíguas e inconclusivas estatisticamente; enquanto que para 100 $mJ.cm^{-2}$, não houve reativação, nem sobrevivência dos trofozoítos.

6.2.4 – Tratamentos Sequenciais

O processo onde dois ou mais desinfetantes produzem efeito sinérgico por aplicação simultânea ou sequencial é conhecida pela USEPA (1999) como desinfecção interativa. O sinergismo ocorre quando a aplicação combinada de desinfetantes promove inativação de microrganismo maior que a soma das inativações dos mesmos desinfetantes aplicados separadamente (CHO et al., 2010; JUNG et al., 2008; KOIVUNEN; HEINONEN-TANSKI, 2005; SOUZA, 2006; USEPA, 1999).

A aplicação de dois ou mais desinfetantes pode ser das seguintes formas (Jung et al., 2008; Souza, 2006):

- Sequencial: quando um desinfetante é aplicação após outro, em sequência, havendo, assim, um desinfetante primário e outro secundário.
- Simultânea ou combinada: onde dois ou mais desinfetantes são aplicados simultaneamente, por exemplo, em um tanque de mistura.

Efeitos sinérgicos da desinfecção sequencial em águas e águas residuárias, encontrados em alguns trabalhos na literatura, podem ser visualizados na quadro 6.1.

Quadro 6.1 - Estudos de desinfecção em água e águas residuárias em que são relatados efeitos sinérgicos entre os desinfetantes utilizados, para diversos microrganismos.

Microrganismo(s)	**Desinfetantes**	**Referência Bibliográfica**
Giardia; Cryptosporidium	$O_3 \rightarrow ClO_2$; $O_3 \rightarrow NH_2Cl$; $Cl_2 \rightarrow NH_2Cl$; $ClO_2 \rightarrow NH_2Cl$; $O_3 \rightarrow Cl_2$; $ClO_2 \rightarrow Cl_2$	Finch et al. (2000).
Cryptosporidium spp.	$O_3 \rightarrow NH_2Cl$	Rennecker et al (2000)
Cryptosporidium spp.	$O_3 \rightarrow Cl_2$	Driedger et al. (2000)
Cryptosporidium spp.	$O_3 \rightarrow Cl_2$	Hanbin Li et al. (2001)
Cryptosporidium spp.	$O_3 \rightarrow Cl_2$	Corona-Vasquez et al. (2002)
Coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*	Ácido peracético + UV	Caretti e Lubello (2003)
Cryptosporidium spp.	$O_3 \rightarrow Cl_2$	Biswas et al. (2003)
E. faecalis; *E. coli*, S. *enteriditis*, *coliphage* MS2 virus	Ácido peracético + UV	Koivunen e Heinomem-Tanski (2005)
Bacillus subtillis	$Cl_2 \rightarrow ClO_2$; $O_3 \rightarrow Cl_2$; $ClO_2 \rightarrow Cl_2$	Cho et al. (2006)
Bacillus subtillis	$O_3 \rightarrow$ UV	Jung et al. (2008)
Cryptosporidium spp.	UV + TiO_2	Ryu et al. (2008)
Coliformes totais, *E. coli*	US → UV	Naddeo et al. (2009)
Coliformes totais, *E. coli*	US → ClO_2	Ayyildiz et al. (2011)
Coliformes totais, bactérias heterotróficas e contagem total de bactérias	UV → Cl_2	Wang et al. (2012)
E. coli	US + UV	Jin et al. (2013)

Nota: Cl_2: cloro livre; US: ultrassom. → desinfecção sequencial; + desinfecção combinada.

Algumas razões para crescente interesse por estes processos são (KOIVUNEN; HEINONEN-TANSKI, 2005; USEPA, 1999):

- Uso de menores concentrações de desinfetantes e consequentemente podendo diminuir a formação de subprodutos de desinfecção e o tamanho das unidades de desinfecção;
- Menores custos da desinfecção;
- Controle na formação de biofilmes no sistema de distribuição;
- Alcance de elevados níveis de inativação de microrganismos patogênicos, inclusive os mais resistente, como os protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

Ainda são incipientes os estudos de desinfecção sinérgica para efluentes sanitários, sendo encontrados na literatura muitos trabalhos sobre água de abastecimento (MEDEIROS, 2010; WANG et al., 2012). Pode-se notar no quadro 6.1, que em grande parte dos estudos relatados verifica-se a utilização do ozônio com o cloro e nos trabalhos mais atuais, há uma mudança para a utilização de dióxido de cloro, radiação ultravioleta e o ultrassom. Para este último, são mostrados alguns exemplos:

- Naddeo et al. (2009) utilizaram, para desinfecção combinada de efluente secundário de Lodos Ativados, ultrassom e radiação ultravioleta e encontraram efeitos sinérgicos para *E. coli* e coliformes totais.
- Ayyildiz et al. (2011) utilizaram ultrassom seguido de dióxido de cloro para desinfecção de esgoto bruto e efluente de tratamento secundário por Lodos Ativados, com efeitos sinérgicos para *E. coli* e coliformes totais.
- Jin et al. (2013) relatam efeito sinérgico para *E. coli* ao utilizar o ultrassom seguido de radiação ultravioleta para desinfetar efluente secundário de diferentes reatores biológicos.

A radiação ultravioleta tem ação física, atingindo principalmente o DNA. Já o ozônio e o cloro são fortes oxidantes, que destroem parcial ou totalmente a parede celular, levando à lise das células. Por consequência o tratamento sequencial químico-físico, é de grande valia, à medida que pode abranger um espectro maior de microrganismos patogênicos e maior eficiência de inativação, com o sinergismo das ações desinfetantes (MEDEIROS, 2010).

6.3. OBJETIVO

O objetivo foi avaliar ação de desinfetantes aplicados sequencialmente - cloro - radiação ultravioleta e ozônio-radiação ultravioleta - com a intenção de encontrar efeitos sinérgicos na desinfecção de *Giardia* e *Cryptosporidium*.

- Avaliar a inativação de microrganismos indicadores – coliformes totais, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* às desinfecções individuais com: cloro, ozônio e radiação ultravioleta, para se ter critério de escolha dos doses e tempos de contato nas desinfecções sequenciais.
- Analisar a ocorrência de efeitos sinérgicos na desinfecção de microrganismos indicadores e protozoários patogênicos com a aplicação dos desinfetantes em sequência: cloro seguido de radiação ultravioleta e ozônio seguido de radiação ultravioleta.
- Avaliar o dano morfológico e inferir a viabilidade dos (oo)cistos de protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. após a ação dos desinfetantes: cloro, ozônio e radiação ultravioleta, aplicados individual e sequencialmente.

6.4. MATERIAL E MÉTODOS

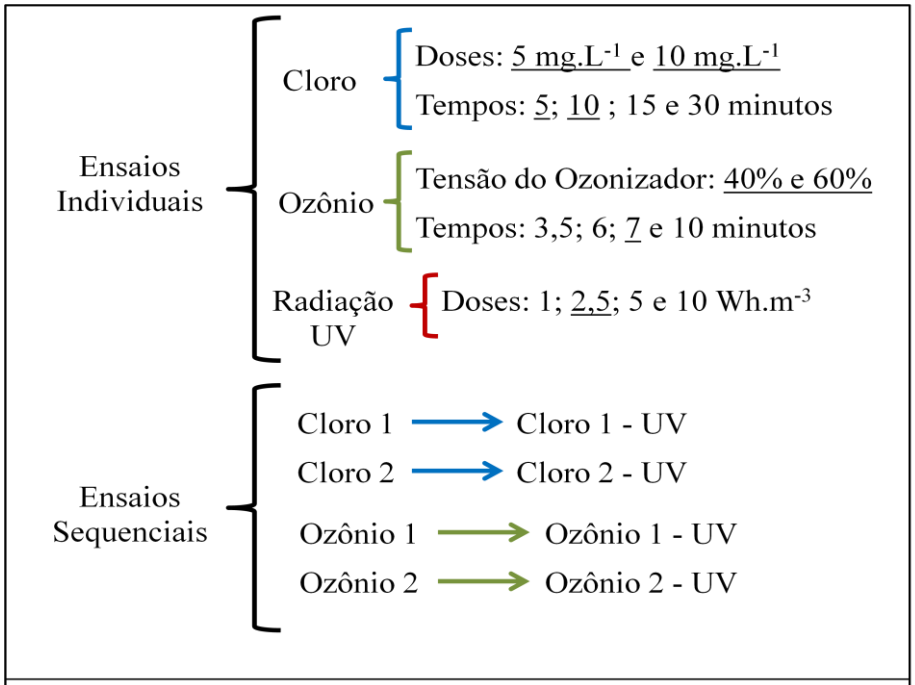
Os ensaios de desinfecção foram realizados entre os meses de agosto de 2012 e março de 2013. Para isso, foi utilizado efluente secundário tratado biologicamente por processo anaeróbio - reator UASB - proveniente da ETE da USP São Carlos, seguido de processo aeróbio - lodos ativados - em escala piloto.

Neste trabalho, não houve inoculação de cistos de *Giardia* ou oocistos de *Cryptosporidium*. Os ensaios dependeram exclusivamente da concentração de microrganismos indicadores e de (oo)cistos de protozoários encontrados no próprio efluente.

Os ensaios individuais com cloro, ozônio e radiação ultravioleta foram feitos em triplicata, sendo avaliados: coliformes totais, *E. coli* e *Clostridium perfringens*. Posteriormente, duas doses de cloro e de ozônio e uma dose de radiação ultravioleta foram escolhidas para os ensaios sequenciais, realizados também em quadruplicata para coliformes totais, *E. coli*, *Clostridium perfringens*; e, em triplicata, para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

As doses de cloro, radiação ultravioleta e ozônio para os ensaios individuais foram escolhidas a partir de dados encontrados em estudos anteriores (MEDEIROS, 2010; LOURENÇÃO, 2009; SARTORI, 2004, 2007)

Um esquema geral, para melhor esclarecimento, pode ser visualizado na figura 6.3.



Sublinhadas estão as doses de cloro, ozônio e radiação UV utilizadas nos ensaios sequenciais

Figura 6.3 - Esquema geral dos ensaios de desinfecção individual e sequencial com efluente de tratamento secundário da ETE USP - São Carlos.

6.4.1 - Ensaios de desinfecção com Cloro

Previamente aos ensaios, eram realizadas as seguintes operações:

- As palhetas do aparelho "jartest" eram desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio e álcool.
- Os béqueres de dois litros utilizados nos ensaios eram desinfetados por radiação UV e, posteriormente, enxaguados com solução Tween 80 (0,1% v/v).
- Os galões de coleta de efluente eram desinfetados com solução de hipoclorito de sódio e depois também enxaguados com solução Tween 80 (0,1%).

A solução Tween 80 (0,1%) foi utilizada com a finalidade de não permitir que os (oo)cistos dos protozoários ficassem aderidos em frascos, galões, e qualquer outro aparato que viesse a entrar em contato com o esgoto e pudesse prejudicar o exame microbiológico da *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp..

Coletava-se o esgoto tratado da ETE USP - São Carlos, no período da manhã e seguia-se diretamente para os ensaios no LATAR, os quais foram realizados em aparelho "jartest", submetidos a gradiente de velocidade de 100 s^{-1}. Foram realizados ensaios individuais com: 5 e 10 $mg.L^{-1}$ de cloro em 5, 10, 15 e 30 minutos.

Houve, primeiramente, a quantificação da concentração da solução de NaOCl a ser usada nos ensaios, pois há um decaimento dessa concentração com o tempo. Para isso, em 1,5 L de água desionizada, adicionavam-se 0,5 mL de solução de NaOCl concentrada (4 a 6 %). Após 1 minuto, sob agitação, verificava-se a concentração de cloro livre, pelo método DPD colorimétrico. (Neste caso, uma amostra de água desionizada era usada como "branco" para zerar o espectrofotômetro). Depois, verificava-se o volume necessário de solução concentrada de NaOCl a ser adicionado nos ensaios de esgoto. Utilizava-se, a partir desse momento, uma amostra de esgoto como "branco" para zerar o espectrofotômetro.

Os ensaios decorreram da seguinte forma:

- Em cada béquer de dois litros, de um conjunto de quatro unidades, eram adicionados 1,5 litros de esgoto; a mesma dose de cloro, porém para diferentes tempos de contato.
- Ligava-se o aparelho "jartest" e ocorria a adição de solução de hipoclorito de sódio nos quatro béqueres e cronometravam-se os tempos de reação.
- Decorrido o tempo estipulado, duas alíquotas de 10 ml eram retiradas para realizar o teste de cloro residual livre e cloro residual total. Em seguida, adicionava-se solução de metabissulfito de sódio (3%) para cessar a reação do cloro na amostra de esgoto a ser analisada nos exames microbiológicos e análises físico-químicas.

6.4.2 – Ensaio com Radiação Ultravioleta

Os ensaios foram realizados em unidade de bancada, em batelada, representada na figura 6.4.

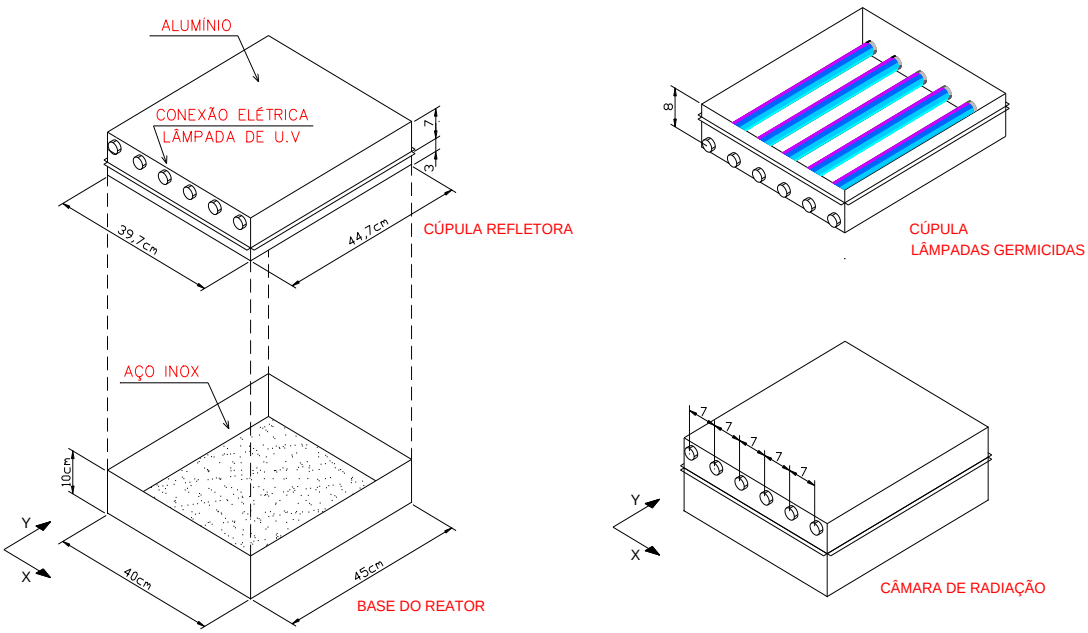


Figura 6.4 - Detalhe do reator de bancada de desinfecção por radiação ultravioleta.

O reator possuía base de aço inox com dimensões de 40 cm x 45 cm e 10 cm de altura. Nela se acoplava uma cúpula refletora de alumínio com 39,7 cm x 44,7 cm e 10 cm de altura, onde havia seis lâmpadas germicidas de 15 W e de baixa pressão de vapor de mercúrio igualmente espaçadas, as quais se situavam emersas – sem contato com meio líquido. Os ensaios tiveram seguimento conforme descrito por Medeiros (2010):

- Antes de cada ensaio, era constatado visualmente se todas as lâmpadas estavam ligadas, cobrindo-se as lâmpadas com placa de vidro comum de 5 mm de espessura.
- Depois, ligavam-se as lâmpadas por 10 minutos para desinfetar a câmara de UV.
- Adicionava-se solução Tween 80 (0,1%), a qual era espalhada no fundo e nas laterais do reator.
- Colocava-se o efluente a ser desinfetado (3,6 litros nos ensaios individuais ou 1,8 litro nos ensaios sequenciais) – perfazendo 2 cm e 1 cm de lâmina de efluente dentro do reator, respectivamente.

- A partir das leituras de absorbância a 254 nm dos efluentes a serem tratados, estipulavam-se os tempos necessários para aplicação das doses de 1; 2,5; 5 e 10 $Wh.m^{-3}$.

O efluente era misturado por quatro agitadores magnéticos, com espaçamento equidistante (figura 6.5). Por fim, amostras desinfetadas eram armazenadas em frascos para posteriores exames microbiológicos e análises físico-químicas.

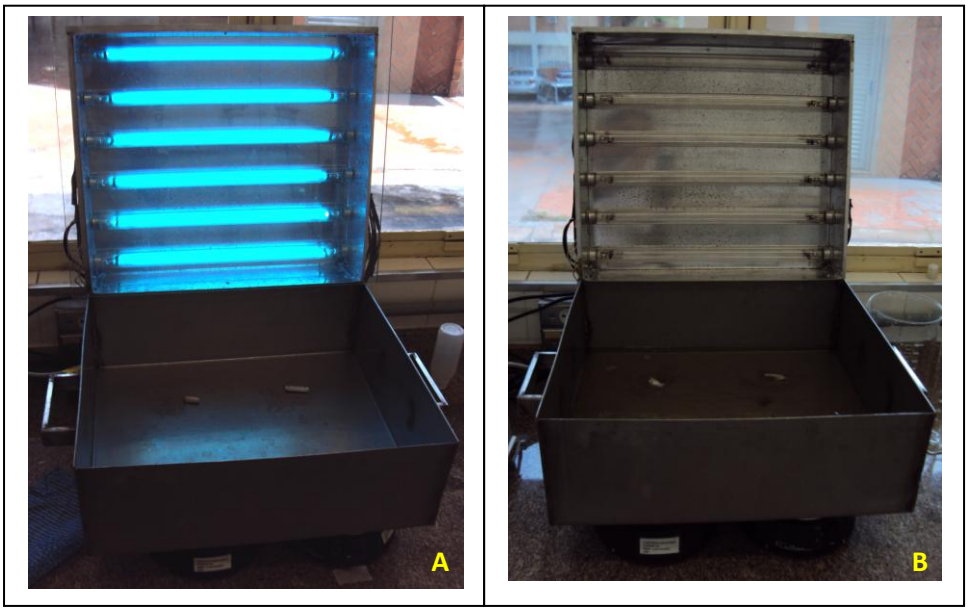


Figura 6.5 - Reator de Radiação UV de bancada utilizado nos ensaios de desinfecções individual e sequenciais: A – com lâmpadas ligadas; B - lâmpadas desligadas.

6.4.2.1 – Medição da intensidade de radiação de lâmpadas UV a 254 nm por actinometria

Para a determinação da intensidade média de radiação ultravioleta a 254 nm por actinometria, seguiram-se, com pequenas modificações: Daniel e Campos (1993); Daniel et al. (2001) e Tinoco (2012):

1ª Etapa: Curva de calibração de Fe^{2+} pelo método da ortofenantrolina (APHA, 2005). Para isso, foram necessários os seguintes reagentes:

- Solução de Fe^{2+} a 4,0 x 10^{-4} $mol.L^{-1}$: obtida a partir de solução de $FeSO_4$ a 0,1 $mol.L^{-1}$ (preparada no dia do ensaio).
- 1,10-fenantrolina monoidrato a 0,1% em água ($C_{12}H_8N_2.H_2O$): dissolver 1,0 g de fenantrolina em 1 litro de água.

- Solução tampão: em balão volumétrico foram misturados 600 mL de acetato de sódio (1,0 N), 360 mL de ácido sulfúrico (1,0 N) e o volume completado com água deionizada.

Para a construção da curva:

- Foram acrescentados volumes de: 0; 1,25; 2,5; 3,75; 5; 6,25; 7,5; 8,75; 10; 11,25 e 12,5 mL da solução de Fe^{2+} a 4,0 x 10^{-4} mol.L^{-1} em balões volumétricos de 50 mL. Em seguida, foram adicionados volumes de ácido sulfúrico (1 N) necessários para completar 25 mL. Depois, adicionavam-se mais 5 mL de solução de fenantrolina e completava-se o volume do balão com solução tampão.
- A cada adição de reagente, a amostra era misturada. Após adição da solução tampão, homogeneizava-se a amostra e deixava a solução final em repouso por 30 minutos para desenvolver cor.
- Decorrido o tempo, havia a medição da absorbância em espectrofotômetro (DR 5000, Hach) a 510 nm em cubeta de 1,0 cm.

A absorbância foi corrigida com o branco. Todo o trabalho foi realizado na ausência de luz direta.

2ª Etapa: Formação de cristais de ferrioxalato de potássio:

- Em ambiente escuro e sob forte agitação, o ferrioxalato de potássio foi preparado a partir da mistura de 3 volumes de oxalato de potássio (1,5 mol.L^{-1}) com 1 volume de cloreto férrico (1,5 mol.L^{-1}).
- A solução ficou em repouso por 24 horas, depois ocorreu evaporação do sobrenadante (60 ± 5 °C) até aproximadamente 1/4 do volume original. Em seguida, foi filtrada (papel filtro Whatman, 8 µm de porosidade), para retenção dos cristais.
- Os cristais retidos no filtro foram dissolvidos em água destilada e a solução foi filtrada a quente em papel filtro Whatman com 8 µm de porosidade para retirada de impurezas. A recristalização foi repetida 3 vezes. Depois disso, os cristais foram secos a vácuo.

A reação de formação de ferrioxalato de potássio é representada na equação 6.6:

$$3\ K_2C_2O_4 + FeCl_3 \xrightarrow{H_2O} K_3Fe(C_2O_4)_3 \cdot 3\ H_2O + 3\ KCl \qquad (6.6)$$

3ª Etapa: Preparação da Solução de Ferrioxalato de Potássio a 0,006 mol.L^{-1}.

Em balão volumétrico de 2 litros, foram adicionados 5,894 gramas de cristais de ferrioxalato de potássio; 1,6 litros de água deionizada; 200 mL de ácido sulfúrico (1 N) e completava-se com água deionizada.

4ª Etapa: Ensaio Actinométrico.

As lâmpadas do reator de UV foram ligadas previamente por 15 minutos para pré-aquecimento. Foram colocados 1.800 mL de solução actinométrica para fazer 1,0 cm de altura da lâmina líquida do efluente no reator. Ligava-se a agitação. Após 3, 4, 5 e 6 minutos de irradiação, com todas as seis lâmpadas do reator ligadas, amostras eram retiradas para determinar a concentração de Fe^{2+}.

5ª Etapa: Determinação da concentração de Fe^{2+}.

Em balão volumétrico de 50 mL, eram adicionados 0,5 mL de solução irradiada, 5 mL de solução de fenantrolina e 0,25 mL de solução tampão. Completava-se o volume de 50 mL com água deionizada. Fazia-se o mesmo com amostra não irradiada (branco).

Homogeneizava-se a solução e deixava em repouso por 30 minutos, para posterior leitura da absorbância em 510 nm.

Dessa forma, eram obtidas as quantidades de Fe^{2+} antes e após a irradiação utilizando a curva de calibração e a equação 6.7:

$$C_{Fe^{2+}} = \frac{C_{medida} \cdot V_{frasco}}{V_{alíquota}} \qquad (6.7)$$

Para cálculo da dose foi utilizada a equação 6.8:

$$D = \frac{[Fe^{2+}]_d - [Fe^{2+}]_a}{\phi_{Fe}} \times 4{,}719 \times 10^5 \qquad (6.8)$$

D: dose de radiação ultravioleta de comprimento de onda de 254 nm ($mWs.cm^{-2}$)

$[Fe^{2+}]_d$:= concentração molar de Fe^{2+} depois da irradiação ($mol.L^{-1}$)

$[Fe^{2+}]_a$: concentração molar de Fe^{2+} antes da irradiação ($mol.L^{-1}$)

ϕ_{Fe}: rendimento quântico de produção de Fe^{2+} no comprimento de onda de 254 nm (1,26 íon grama.Einstein $^{-1}$).

4,719 x 10^5: fator conversão de Einstein de fótons de comprimento de onda de 254 nm para mJ de íon grama/L para íon grama/cm³

A quantidade de radiação UV na superfície líquida foi calculada a partir da equação 6.9:

$$Io = \frac{D \,.\, L}{t} \qquad (6.9)$$

Io: intensidade média de radiação UV incidente na superfície ($mW.cm^{-2}$).

D: dose de radiação UV de comprimento de onda de 254 nm ($mWs.\ cm^{-3}$)

L: espessura da lâmina líquida (cm)

t: tempo de exposição (segundos).

Segundo Hatchard e Parker (1956), o rendimento quântico da produção de ferro no comprimento de onda de 254 nm é de 1,26 íon grama.Einstein^{-1}, sendo um valor de referência bibliográfica e que após obtenção do cálculo da dose, o mesmo pode ser averiguado com base em algumas equações.

Para os ensaios de desinfecção, uma vez obtidos os valores de I_o e de absorbância a 254 nm (antes de cada ensaio com ultravioleta), pôde-se calcular a intensidade média de radiação (I_m) na lâmina líquida a partir da lei de Lambert-Beer, pela equação 6.10:

$$Im = \frac{Io}{a.L}\left[1 - \exp(-\,a.L)\right] \qquad (6.10)$$

I_m: Intensidade média de radiação UV na lâmina líquida de espessura L ($mW.cm^{-2}$)

I_o: intensidade média de radiação UV incidente na superfície ($mW.cm^{-2}$).

A: absorbância a 254 nm, cubeta de 1,0 cm;

L: espessura da lâmina líquida ou caminho óptico (cm)

a: coeficiente de extinção (cm^{-1})

$$a = A.\ln(10) = 2{,}303.A$$

Com o valor de I_m, pode-se determinar a dose recebida por volume pela equação (6.11).

$$\mathrm{Dr} = \frac{\mathrm{Im.t}}{\mathrm{L}} 0{,}2778 \qquad (6.11)$$

D_r: dose recebida por volume ($Wh.m^{-3}$)

L: espessura da lâmina líquida (cm).

I_m: intensidade média de radiação na lâmina líquida de espessura L ($mW.cm^{-2}$)

0,2778: fator de conversão de mW para W, s para h e cm para m.

O tempo de contato foi estimado a partir das doses recebidas, de acordo com a equação (6.11). Foram utilizadas quatro doses: 1; 2,5; 5 e 10 $Wh.m^{-3}$, com lâmina de efluente de 3 cm.

Após os ensaios com radiação UV, foram retiradas alíquotas pertinentes para os exames microbiológicos e análise de características físico-químicas. No caso de sequência da cloração, eram analisados o cloro residual livre e total, e a amostra recebia adição de solução de metabissulfito de sódio (3%) para remoção desses residuais, a fim de não prejudicar os exames microbiológicos.

O restante do efluente, não utilizado, era mantido por mais 5 minutos para desinfecção antes do descarte e lavagem do reator de UV para novo ensaio.

6.4.3 – Ensaio com Ozônio

A unidade experimental de ozonização em escala piloto, figura 6.6, está situada na ETE da USP – São Carlos. É constituída por: gerador de ozônio (Eaglesat®), gerador de oxigênio pelo processo PSA (Pressure Swing Adsorption), coluna de ozonização e frasco lavador de gás para recolhimento de espuma e captura de ozônio que não reagir no processo.

Legenda:

I – Rotâmetro

II – Ozonizador

III – Botão para modificar as tensões

IV – Coluna de Ozonização

V – Frasco lavador de gás

VI – Entrada de ozônio na coluna (pedra porosa)

Figura 6.6 - Detalhe da unidade de ozonização piloto utilizada nos ensaios de desinfecções individuais e sequenciais.

Na base da coluna de ozonização havia um registro de esfera (conectado ao dreno de esvaziamento da coluna) e um difusor poroso para gerar as bolhas ascensionais de ozônio. Na parte superior existia um registro de esfera para entrada de água para lavagem da coluna e uma mangueira de silicone ligada ao frasco lavador de gás.

Antes dos ensaios de desinfecção, o gerador de ozônio foi calibrado, variando a vazão de gás e a tensão do equipamento. Depois foram construídas curvas de calibração, as quais relacionavam a vazão de gás com a produção de ozônio pelo gerador de ozônio ($g\ O_3.h^{-1}$).

6.4.3.1 – Curva de Calibração do Ozonizador

Para calibração do aparelho gerador de ozônio foi utilizado o método iodométrico, de acordo com APHA (2005), com utilização de solução de KI (2%), a qual foi preparada e mantida em câmara fria para maturar por, no mínimo, 48 horas. O procedimento empregado na calibração seguiu conforme Soares (2007), Lourenção (2009) e Medeiros (2010):

- O gerador de ozônio permaneceu ligado antes dos ensaios por 10 minutos para estabilização do aparelho.
- A coluna foi lavada três vezes com água para, assim, se iniciar os ensaios.
- A coluna de ozônio era preenchida com 1 litro de solução de KI (2%). Na parte de cima da coluna havia uma saída para gás, onde foi acoplada uma mangueira de silicone que fazia a ligação coluna de ozonização – frasco lavador, este contendo 200 mL de solução de KI (2%) para capturar o *off-gas*.
- Acionava-se então o botão "oxigênio", para gerar oxigênio, e abria-se o registro na coluna de ozonização. Com a verificação de formação de bolhas no frasco lavador, ajustava-se o rotâmetro para a vazão necessária: 1, 2, 3 e 4 $L.min^{-1}$.
- Selecionavam-se as tensões de 40%, 60% e 80%.
- Caso necessário, aumentava-se a pressão do compressor para envio de mais oxigênio.
- Acionava-se o botão "ozônio" e cinco minutos eram cronometrados.
- Após esse tempo, o gerador de ozônio era desligado e alíquotas de 200 mL eram retiradas da coluna de ozônio e do frasco lavador.
- Acidificava-se a amostra com 4 mL de ácido sulfúrico (1N) e titulava-se com tiossulfato de sódio (0,025N) até a solução apresentar coloração amarelo palha. Então, eram adicionados 2 mL de solução de amido como indicador, prosseguindo com a titulação até que a solução se tornava incolor, como pode ser visualizado na figura 6.7.

Figura 6.7 – A: solução de KI + Ozônio; B: solução com coloração amarelo palha; C: solução no final da titulação – incolor. Fonte (Medeiros, 2010)

Depois, a solução de KI da coluna de ozonização era descartada e, em seguida, procedia-se à lavagem da coluna de ozonização com água (3 vezes) para dar início a um novo ensaio.

6.4.3.2 – Ensaio de desinfecção com ozônio

Primeiramente, foi coletado efluente tratado após o sistema de Lodos Ativados em um galão, previamente limpo, desinfetado e enxaguado com solução Tween 80 (0,1%).

Antes dos ensaios, o gerador de ozônio permaneceu ligado por 10 minutos para estabilização do aparelho.

A coluna era preenchida com dois litros de efluente e o procedimento realizado foi similar ao utilizado para calibração do gerador de ozônio. Ajustaram-se a vazão de gás pelo rotâmetro e a tensão do aparelho:

- Tensão de 40%, produção de ozônio de $1 g.min^{-1}$ e nos tempos: 3,5; 6; 7 e 10 minutos.
- Tensão de 60%, produção de ozônio de $1 g.min^{-1}$ e nos tempos: 3,5; 6; 7 e 10 minutos.

Passado o tempo estipulado de ensaio, o gerador de ozônio era desligado e retiravam-se as alíquotas para quantificação de ozônio.

A alíquota do frasco lavador (*off-gas*) foi submetida ao método iodométrico, conforme descrito previamente.

Para a amostra da coluna de ozônio foi utilizado o método colorimétrico (kit Ozono HR AV), para espectrofotometria. Com o programa 456, do próprio espectrofotômetro DR 2800 (Hach), fez-se leitura de ozônio em meio líquido, na faixa de 0 a 1,5 $mg.L^{-1}$. O método iodométrico poderia ter sido empregado; todavia, a acurácia desse procedimento pode ser comprometida devido à concentração de ozônio no meio líquido ser normalmente pequena (DIAPER, 1975).

As amostras desinfetadas foram armazenadas em frascos previamente lavados, desinfetados e enxaguados com solução Tween 80 (0,1%). Para os ensaios sequenciais, foram realizadas duas ozonizações para cada tensão (40 e 60%), com produção de ozônio de $1g.min^{-1}$ e tempo de contato de 7 minutos, com a finalidade de obter volume suficiente para exames microbiológicos e análises físico-química da amostra ozonizada e para os ensaios sequenciais com radiação UV.

6.4.3.3 – Cálculo da produção de ozônio

A produção de ozônio foi estimada pela equação 6.12:

$$P = \frac{N_{tio} x (V_{tio} - V_b) x V_{KI} x 1440}{V_{am} x T} \qquad (6.12)$$

P: produção de ozônio ($g\ O_3.h^{-1}$)

N_{tio}: normalidade da solução de tiossulfato de sódio

V_{tio}: volume de tiossulfato de sódio gasto na titulação (mL)

V_b: volume de tiossulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL)

V_{KI}: volume de solução de KI adicionada na coluna de ozonização (L)

V_{am}: volume de amostra titulada (mL)

T: tempo de contato (min)

1440: fator de conversão

A produção total de ozônio é dada pela soma do ozônio na coluna de ozonização e do *off-gas* no frasco lavador. A dosagem de ozônio está diretamente relacionada à produção através da equação (6.13).

$$D = \frac{PxTx1000}{Vx60} \qquad (6.13)$$

D: dosagem de ozônio ($mg.L^{-1}$)

P: produção de ozônio ($g\ O_3.h^{-1}$)

T: tempo de contato (min)

V: volume ozonizado (L)

O branco era constituído de amostra de 200 mL de solução KI (2%) não ozonizado, a qual era acidificada com 10 mL de ácido sulfúrico (1N) e, em sequência, adicionavam-se 2 mL de solução de amido. A amostra de coloração azulada era titulada com tiossulfato de sódio (0,025N) até ficar incolor – esse procedimento foi feito em duplicata, conforme Soares (2007). Tinha-se então o volume do branco (V_b) da equação (6.12).

A padronização da solução de tiossulfato de sódio foi realizada com solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), de acordo com APHA (2005), como se segue: em 80 mL de água destilada era adicionado 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, 1 grama de KI e 10 mL de solução de $K_2Cr_2O_7$ (0,025N). Adicionou-se amido e a titulação com tiossulfato de sódio foi feita em triplicata.

6.4.3.4 – Balanço de massa do ozônio dissolvido na fase líquida

O balanço de massa do ozônio possibilita quantificar a massa ou concentração do ozônio que foi transferido e consumido durante o ensaio e associar esses resultados à eficiência de inativação de microrganismos indicadores (SOARES, 2007).

Durante o ensaio, uma massa de ozônio é aplicada no efluente presente na coluna de ozonização. Esta massa pode ser calculada conforme equação (6.14):

$$MA = D \times V \qquad (6.14)$$

MA: massa aplicada de ozônio (mg)

D: dosagem ($mg.L^{-1}$)

V: volume de efluente sendo ozonizado (L)

No entanto, a massa total de ozônio aplicada divide-se em: massa transferida para o meio líquido (MT) e massa não transferida (MNT), sendo esta última, quantificada no *off-gas*. Ambas podem ser calculadas pelas equações (6.15) e (6.16).

$$\text{MNT} \quad M_{NT} = \frac{N_{tio} x (V_{tio} - V_b) x V_{offgás} x 24.000}{V_{am}} \qquad (6.15)$$

MNT: Massa de ozônio não transferida (*off-gas*) (mg)

N_{tio}: Normalidade do tiossulfato de sódio

V_{tio}: Volume de tiossulfato gasto na titulação da amostra (mL)

V_b: Volume de tiossulfato gasto na titulação do branco (mL)

$V_{offgás}$: Volume de solução de KI (2%) adicionado no frasco lavador de gás (L)

V_{am}: Volume de amostra de KI (2%) titulada (mL)

$$MT = MA - MNT \qquad (6.16)$$

MT: massa transferida ao meio líquido (mg)

MA: massa total de ozônio aplicada (mg)

MNT: massa de ozônio não transferida – *off-gas* (mg)

A massa de ozônio transferida ao meio líquido (MT) pode ainda ser dividida em: massa residual (MR) e massa consumida (MC). A massa residual pode ser calculada conforme equação (6.17).

$$MR = [O_3]R \times V_{ef} \qquad (6.17)$$

MR: massa residual (mg)

$[O_3]R$: Concentração de ozônio residual ($mg.L^{-1}$)

V_{ef} : Volume do efluente ozonizado (L)

A massa consumida seria a diferença entre a massa transferida e a massa residual (equação 6.18):

$$MC\ (mg) = MT(mg) - MR\ (mg) \qquad (6.18)$$

Assim, a concentração de ozônio consumido $[O_3]C$ pode ser estimada pela equação (6.19):

$$[O_3]C = D - ([O_3]R + [O_3]_{off\text{-}gas}) \qquad (6.19)$$

D: dosagem de ozônio aplicada ($mg.L^{-1}$)

$[O_3]R$: concentração de ozônio residual ($mg.L^{-1}$)

$[O_3]_{offgás}$: concentração de ozônio no *off-gas* ($mg.L^{-1}$) [razão entre a massa de ozônio no *off-gas* (Mnt) e o volume de esgoto ozonizado (L)]

6.4.3.5 – Cálculo dos valores de concentração x tempo (CT) para ozônio

Para o cálculo do produto CT foi utilizada a equação (6.20) desenvolvida por Wu e Doan (2005):

$$CT = \int_0^t Ctdt \qquad (6.20)$$

C: concentração de ozônio dissolvido (residual) ($mg.L^{-1}$)

t: tempo de contato (min)

No entanto, como a concentração de ozônio residual é muito pequena, foi utilizada a taxa de consumo de ozônio – massa de ozônio consumida dividida pelo tempo de contato. Além disso, foi suposta que a vazão aplicada de ozônio permaneceu constante durante os ensaios (SOARES, 2007).

Para representar os cálculos dos valores de CT, tem-se o exemplo a seguir:

Concentração de ozônio consumido: 10,57 $mg.L^{-1}$;

Tempo de contato: 10 minutos;

Taxa de consumo de ozônio: 10,57/10 = 1,057 $mg.L^{-1}.min^{-1}$

Aplicando a equação (6.20):

$$CT = \int_0^t Ctdt = \int_0^{10} 1{,}057tdt$$

$$CT = 1{,}057 \times \frac{t^2}{2} = 1{,}057 \times \frac{100}{2} = 53 \text{ mg.min.L}^{-1}$$

6.4.4 – Ensaios Sequenciais

Nos ensaios sequenciais, após os ensaios com ozônio e cloro, o efluente era coletado e encaminhado à unidade de desinfecção por radiação UV, para serem avaliados os efeitos sinérgicos dos desinfetantes na inativação dos microrganismos indicadores e dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp..

Para os ensaios sequenciais de cloro-radiação ultravioleta analisaram-se o cloro residual livre e total. Em razão do ozônio não deixar residual na massa líquida, para os ensaios ozônio-radiação ultravioleta, a medição de residual não foi necessária.

6.4.5 - Exames Microbiológicos

A quantificação de coliformes totais e *E. coli* seguiu o item 3.3.4.1, já relatado no capítulo 3. No entanto, ao invés de utilizar o método "pour plate", foi feita a filtração em membrana, da mesma forma quando foram analisados efluentes do filtro lento em areia. O resultado foi lido como unidade formadora de colônia (UFC) por 100mL.

A quantificação de colônias de *Clostridium perfringens* foi seguida de acordo com o método L5.403 (CETESB, 2004), o qual utiliza a técnica de membrana filtrante, conforme o item 3.3.4.2, já relatado no capítulo 3. O resultado foi lido como unidade formadora de colônia (UFC) por 100mL.

Nos casos onde houve 100% de inativação de coliformes totais, *E. coli* e *Clostridium perfringens*, os valores foram calculados como se existisse 1 UFC restante após a desinfecção.

Para a análise de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* foi empregado o método da filtração em membrana, como relatado no capítulo 2, no item 2.3.2.3. Também foi feita a separação imunomagnética, como relatada no mesmo capítulo, no item 2.3.3. Além disso, foi realizada a reação de imunofluorescência direta (RID), com verificação de viabilidade pelo corante vital iodeto de propídeo, bem como análise de dano morfológico, de acordo com o item 5.3.4, anteriormente relatado no capítulo 5.

6.4.6 - Análises Físico-Químicas

As análises dos parâmetros físico-químicos seguiram o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). Na tabela (6.1) estão apresentados os métodos analíticos empregados e os equipamentos utilizados.

Tabela 6.1 – Métodos analíticos empregados para análises físico-químicas.

Variável	**Método e Equipamentos**
Absorbância em comprimento de onda de 254nm	Espectrofotômetro DR 4000
Alcalinidade Parcial	Titulação potenciométrica com ácido sulfúrico até pH 5,75 (Método 2320B)
Alcalinidade Total	Titulação potenciométrica com ácido sulfúrico até pH 4,3 (Método 2320B)
Cloro residual livre e total	Método DPD colorimétrico (4500 G)
DQO	Método colorimétrico em refluxo fechado (5220 D)
Nitrogênio amoniacal	Método Macro-Kjedhal (4500)
Nitrogênio Total Kjedhal	Método Macro-Kjedhal (4500)
Ozônio residual	Método iodométrico e método colorimétrico (4500 B)
pH	Método Potenciométrico. pH meter - Denver Instrument
Sólidos Totais	Método Gravimétrico (2540 B)
Sólidos Suspensos Totais	Método Gravimétrico – filtração em membrana (1,2 μm) (2540 B)
Temperatura	Termômetro de mercúrio
Turbidez	Turbidímetro 2100P

6.4.7 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., 2004). Diferenças significativas entre as médias foram determinadas de acordo com ANOVA (*One Way Analysis of Variance*) com aplicação do teste t *Student*, baseado na hipótese nula de médias iguais de recuperação para os métodos. Em todos os testes, valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

6.5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram divididos em dois itens principais: desinfecções individuais e sequenciais.

6.5.1 - Desinfecções Individuais

6.5.1.1 - Desinfecção com Cloro

Os resultados dos ensaios de cloração estão sintetizados nas tabelas 6.2, 6.3 e 6.4.

Verifica-se um pequeno aumento do pH no decorrer da cloração, isso se deve à reação do hipoclorito de sódio na água, com consequente produção de íons Na^+ e OH^-. Pode-se relatar ainda que o pH do efluente biológico utilizado na cloração é elevado, não sendo o ideal, visto que as espécies químicas - ácido hipocloroso e íon hipoclorito - estão distribuídas no meio líquido de acordo com o pH. E em pH acima de 7,5, há predominância de íon hipoclorito, com baixo poder desinfetante.

Com relação à turbidez e à absorbância em 254 nm, há pouca variação após a cloração, tanto na dosagem de 5 $mg.L^{-1}$, quanto na de 10 $mg.L^{-1}$.

No entanto, para sólidos totais, o aumento na concentração pode ser devido ao acréscimo no efluente desinfetado de determinados volumes de solução de metabissulfito de sódio a 3% para neutralização do cloro residual livre e combinado.

A DQO e o nitrogênio amoniacal foram verificados apenas no efluente tratado biologicamente (chamado bruto para os ensaios de desinfecção) visto que há muito interferência por cloretos, segundo Lourenção (2009). A DQO média dos três ensaios foi de 33 ± 5 $mg.L^{-1}$, enquanto que a concentração de nitrogênio amoniacal foi de 31 ± 19 $mg.L^{-1}$. Quanto menores as concentrações de ambos os parâmetros, menores as concentrações de subprodutos da desinfecção e menor formação de mono, di e tricloramina. No efluente a ser clorado, devido ao fato da elevada concentração de nitrogênio amoniacal verificada, pode-se notar baixas concentrações de cloro residual livre após 5 minutos de reação, havendo portanto, formação de cloraminas, as quais possuem menor poder desinfetante que o ácido hipocloroso.

Tabela 6.2 - Resultados para as variáveis físicas, químicas e microbiológicos do ensaio I da cloração de efluente de tratamento secundário.

		Dose (5 mg.L^{-1})				Dose (10 mg.L^{-1})			
Variáveis	**Bruto**	**5 min**	**10 min**	**15 min**	**30 min**	**5 min**	**10 min**	**15 min**	**30 min**
Temperatura	22,3	22,1	22,1	22,2	22,1	22,2	22,5	22,2	22,3
pH	7,99	7,86	7,82	7,8	7,76	8,28	8,25	8,18	8,19
Cloro residual livre (mg.L^{-1})	-	0,49	0,37	0,51	0,59	1,16	1,48	1,71	1,26
Cloro residual combinado (mg.L^{-1})	-	3,31	3,35	3	2,91	7,69	6,05	6,97	8,17
Cloro residual total (mg.L^{-1})	-	3,8	3,72	3,51	3,5	8,85	7,53	8,68	9,43
Turbidez (uT)	3,4	2,96	2,94	2,33	2,69	2,87	3,55	4,01	2,97
Abs 254 nm	0,206	0,200	0,201	0,204	0,201	0,205	0,202	0,200	0,200
Sólidos Totais (mg.L^{-1})	306	524	480	492	510	578	676	570	548
Sólidos Suspensos Totais (mg.L^{-1})	28	23	7	< 1	9	9	< 1	5	3
DQO (mg.L^{-1})	33	-	-	-	-	-	-	-	-
N - amoniacal (mg.L^{-1})	36	-	-	-	-	-	-	-	-
Coliformes totais (UFC / 100 mL)	$1,6x10^5$	$2,2x10^4$	$1,4x10^4$	$3,0x10^3$	$1,1x10^3$	$1,7x10^4$	$2,8x10^3$	$2,6x10^3$	$9,0x10^2$
***E. coli* (UFC/ 100 mL)**	$4,3x10^4$	$1,0x10^3$	$6,0x10^2$	$4,0x10^2$	$1,0x10^2$	$1,0x10^2$	2	< 1	< 1
***Clostridium* sp. (UFC/ 100 mL)**	$3,1x10^3$	$3,1x10^3$	$2,8x10^3$	$2,8x10^3$	$2,3x10^3$	$2,7x10^3$	$2,5x10^3$	$2,1x10^3$	$1,3x10^3$

Tabela 6.3 - Resultados para as variáveis físicas, químicas e microbiológicos do ensaio II da cloração de efluente de tratamento secundário.

		Dose (5 mg.L^{-1})				Dose (10 mg.L^{-1})			
Variáveis	**Bruto**	**5 min**	**10 min**	**15 min**	**30 min**	**5 min**	**10 min**	**15 min**	**30 min**
Temperatura	21,6	22,2	22,1	21,9	21,9	21,6	21,9	22	22,1
pH	7,35	7,5	7,51	7,6	7,76	8,22	8,18	8,22	8,21
Cloro residual livre (mg.L^{-1})	-	0,86	0,61	0,53	0,77	1,38	1,19	1,21	1,17
Cloro residual combinado (mg.L^{-1})	-	3,71	4,25	3,34	3,45	7,95	7,26	7,82	7,33
Cloro residual total (mg.L^{-1})	-	4,57	4,86	3,87	4,22	9,33	8,45	9,03	8,5
Turbidez (uT)	5,58	3,34	5,33	3,56	2,53	3,74	4,44	4,34	6,38
Abs 254 nm	0,189	0,194	0,198	0,198	0,196	0,195	0,192	0,194	0,234
Sólidos Totais (mg.L^{-1})	337	592	538	592	540	628	560	662	574
Sólidos Suspensos Totais (mg.L^{-1})	5	11	8	12	< 1	10	8	9	< 1
DQO (mg.L^{-1})	28	-	-	-	-	-	-	-	-
N - amoniacal (mg.L^{-1})	10	-	-	-	-	-	-	-	-
Coliformes totais (UFC / 100 mL)	$1,8x10^5$	$3,0x10^3$	$1,0x10^3$	$3,0x10^2$	$2,0x10^2$	$5,0x10^3$	$4,0x10^2$	$2,0x10^2$	$1,5x10^2$
***E. coli* (UFC/ 100 mL)**	$5,0x10^4$	$1,0x10^3$	$1,0x10^2$	$6,3x10^1$	< 1	$4,0x10^2$	6	< 1	< 1
***Clostridium* sp. (UFC/ 100 mL)**	$5,8x10^3$	$4,8x10^3$	$3,4x10^3$	$2,8x10^3$	$2,8x10^3$	$3,8x10^3$	$3,3x10^3$	$3,0x10^3$	$1,4x10^3$

Tabela 6.4 - Resultados para as variáveis físicas, químicas e microbiológicos do ensaio III da cloração de efluente de tratamento secundário.

		Dose (5 mg.L^{-1})				Dose (10 mg.L^{-1})			
Variáveis	**Bruto**	**5 min**	**10 min**	**15 min**	**30 min**	**5 min**	**10 min**	**15 min**	**30 min**
Temperatura	21,9	22,4	22,6	22,4	22,6	21,9	21,8	21,8	22
pH	7,4	8,05	8,01	7,96	7,97	8,19	8,09	8,08	8,08
Cloro residual livre (mg.L^{-1})	-	0,68	0,63	0,58	0,59	1,32	1,07	1,53	1,21
Cloro residual combinado (mg.L^{-1})	-	4,17	4,1	3,98	3,97	8,03	8,46	7,92	8,17
Cloro residual total (mg.L^{-1})	-	4,85	4,73	4,56	4,56	9,35	9,53	9,45	9,38
Turbidez (uT)	6,28	6,35	6,68	7,86	9,93	7,11	6,15	6,12	9,42
Abs 254 nm	0,241	0,239	0,241	0,240	0,232	0,245	0,245	0,246	0,242
Sólidos Totais (mg.L^{-1})	444	612	-	712	610	516	888	904	794
Sólidos Suspensos Totais (mg.L^{-1})	18	4	12	2	6	23	16	5	2
DQO (mg.L^{-1})	38	-	-	-	-	-	-	-	-
N - amoniacal (mg.L^{-1})	46	-	-	-	-	-	-	-	-
Coliformes totais (UFC / 100 mL)	$1,4x10^5$	$3,9x10^4$	$1,6x10^4$	$1,5x10^4$	$9,0x10^2$	$3,0x10^4$	$6,3x10^3$	$3,2x10^3$	$1,9x10^2$
***E. coli* (UFC/ 100 mL)**	$3,0x10^3$	$5,0 x 10^1$	< 1	< 1	< 1	$1,5x10^1$	2	< 1	< 1
***Clostridium* sp. (UFC/ 100 mL)**	$3,9x10^3$	$3,0x10^3$	$2,0x10^3$	$3,0x10^3$	$1,1x10^3$	$2,9x10^3$	$1,3x10^3$	$2,3x10^3$	$1,1x10^3$

Com relação à inativação de micro-organismos indicadores - coliformes totais, *E. coli* e *Clostridium perfringens* - os valores médios de inativação dos três ensaios de cloração podem ser visualizados nas figuras 6.8 e 6.9, para as dosagens aplicadas de 5 e 10 mg.L^{-1}.

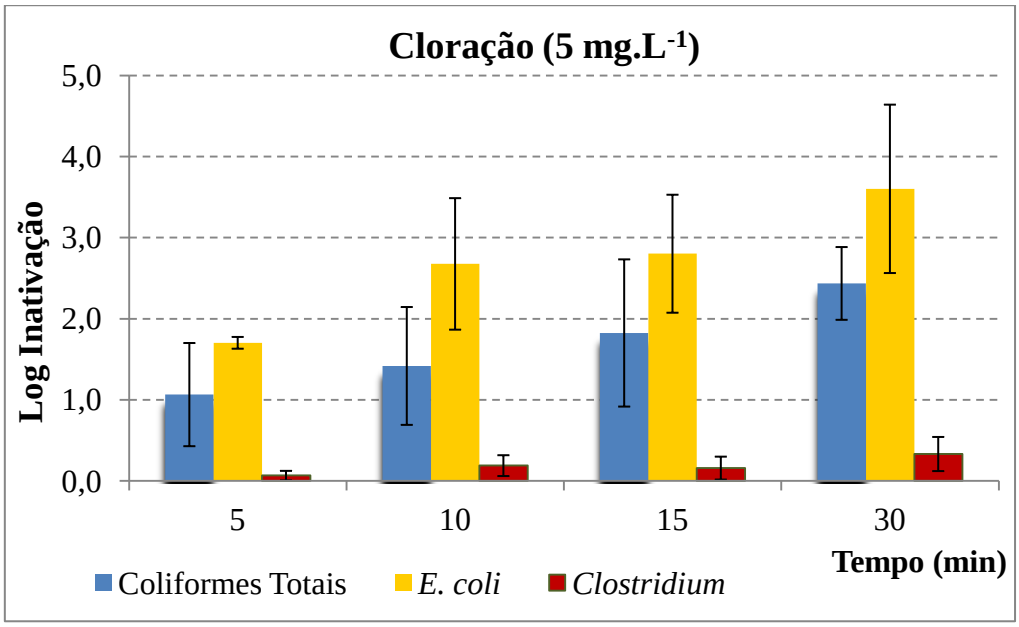


Figura 6.8 - Inativação média de microrganismos indicadores presentes em efluente secundário através da cloração com 5 mg.L^{-1}. As barras no centro das colunas representam o desvio padrão.

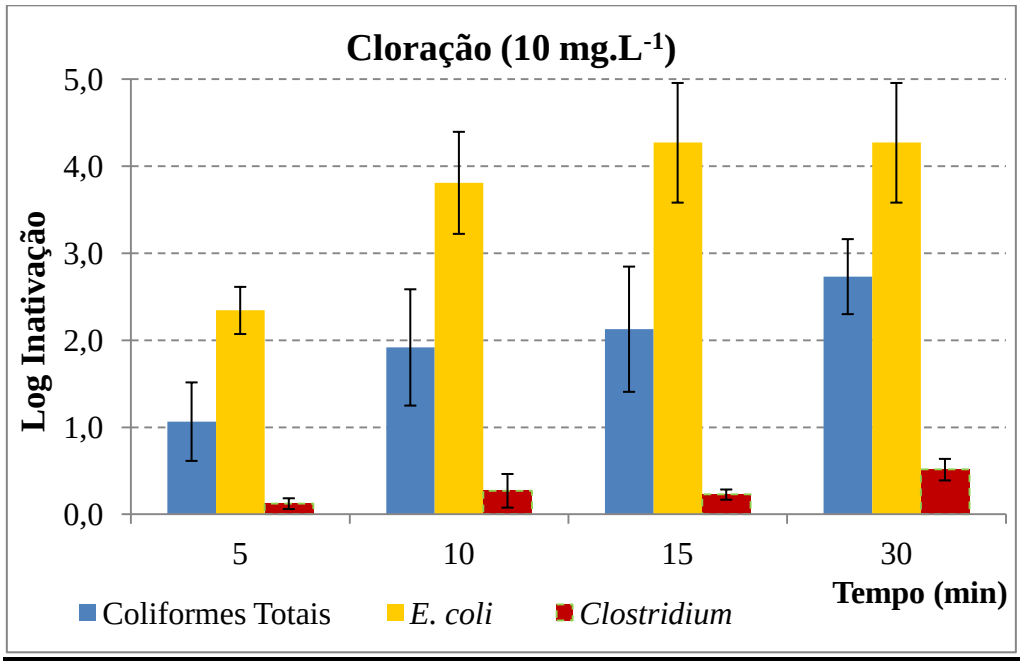


Figura 6.9 - Inativação média de microrganismos indicadores presentes em efluente secundário através da cloração com 10 mg.L^{-1}. As barras no centro das colunas mostram o desvio padrão.

Pode-se notar que a *E. coli* foi o microrganismo menos resistente à desinfecção por hipoclorito de sódio nos ensaios, com dosagem de 10 $mg.L^{-1}$, entre as bactérias estudadas (teste t; p >0,05), nos quais CT próximos a 50 $mg.min.L^{-1}$ resultaram em 100% de eficiência. No entanto, nos ensaios com aplicação de 5 $mg.L^{-1}$, não houve diferença estatística entre a inativação de *E. coli* e de coliformes totais. *Clostridium perfringens* se mostrou a mais resistente à cloração (teste t; p >0,05) nas duas dosagens aplicadas, com no máximo 0,62 log de inativação com aplicação de CT de 300 $mg.min.L^{-1}$, em um dos ensaios.

Em experimentos conduzidos por Venczel et al. (1997), para dosagem de 5 $mg.L^{-1}$, foram necessários 60 minutos de tempo de contato para atingir 1 log de inativação de *Clostridium perfringens* (CT de 300 $mg.min.L^{-1}$), enquanto Medeiros (2010) necessitou de CT de 200 $mg.min.L^{-1}$. Lourenção (2009) relata a necessidade de CT de 96 $mg.min.L^{-1}$ para inativação de 0,5 log do mesmo microrganismo.

Os resultados encontrados para coliformes totais foram inferiores ao encontrados por: Li et al. (2013) que relatam 3 log de inativação com CT de 20 mg. $min.L^{-1}$, ao desinfetar água de reúso; Lourenção (2009) e Medeiros (2010) que observaram aproximadamente 4 log de inativação de coliformes totais para CT próximo de 100 $mg.min.L^{-1}$ na desinfecção de efluente proveniente de reator UASB.

A comparação com outros trabalhos da literatura é uma das grandes dificuldades da desinfecção de águas residuárias, pois são utilizadas diferentes dosagens e tempo de contato e qualidade físico-química do efluente também discrepantes. Há que se relatar também: o elevado pH do efluente utilizado nos ensaios (próximo a 8,0); as altas concentrações de nitrogênio amoniacal, com consequente formação de cloraminas e diminuição das concentrações de cloro livre, que podem ter prejudicado a inativação de micro-organismos pelo cloro.

Foi comparada a inativação de cada micro-organismo para um mesmo CT, no entanto, com doses e tempos de contatos diferentes:

- 50 $mg.min.L^{-1}$ (5 $mg.L^{-1}$ x 10 minutos e 10 $mg.L^{-1}$ x 5 minutos)
- 150 $mg.min.L^{-1}$ (5 $mg.L^{-1}$ x 30 minutos e 10 $mg.L^{-1}$ x 15 minutos)

O intuito era verificar se a concentração ou o tempo de contato teria mais importância na cloração, porém não foram encontradas diferenças significativas (teste t, p > 0,05).

6.5.1.2 - Desinfecção com Ozônio

6.5.1.2.1 – Curva de Calibração do Gerador de Ozônio

Os valores de produção de ozônio (g $O_3.h^{-1}$) estão reunidos na tabela 6.5.

Tabela 6.5 – Produção de ozônio na calibração do ozonizador .

Tensão	Vazão (L/h)[1]	Produção (g O_3/h)[2]
40%	0	0
	60	0,08
	120	0,32
	180	0,49
	240	0,66
60%	0	0
	60	0,42
	120	0,94
	180	1,06
	240	1,23
80%	0	0
	60	0,81
	120	1,14
	180	1,71
	240	1,89

Notas: [1] Vazão de gás na saída do gerador (mistura de oxigênio e ozônio) em litros por hora; [2] Produção de ozônio em gramas por hora.

Foram ajustadas curvas (equações) relacionando as vazões de gás e as respectivas produções de ozônio (figura 6.10). Essas relações só são válidas para as condições experimentais semelhantes às dos ensaios.

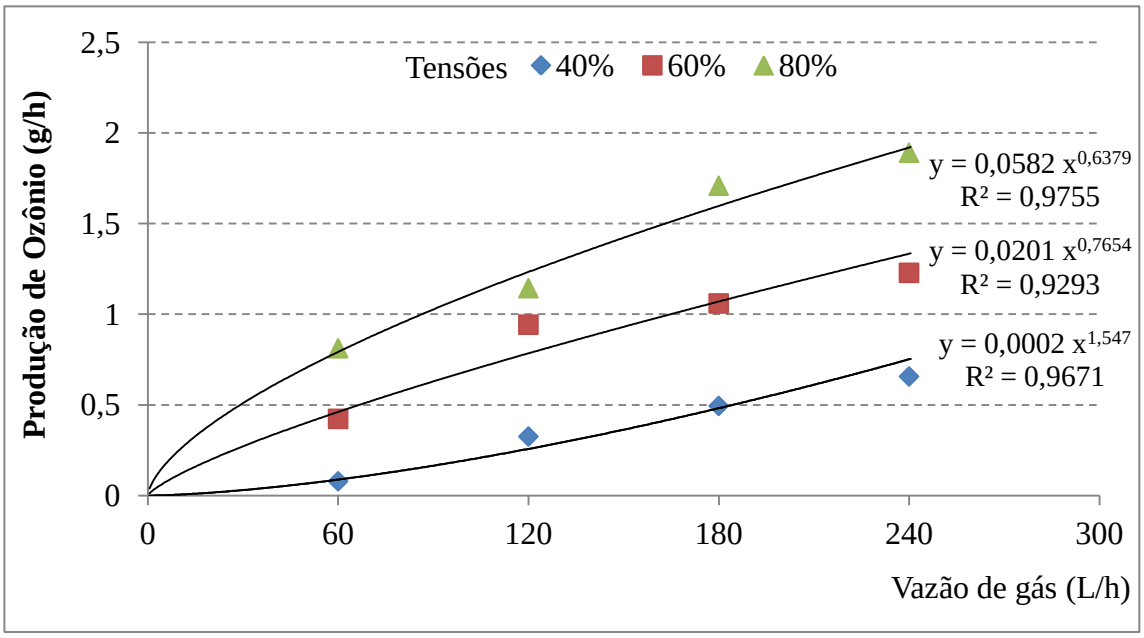


Figura 6.10 - Curvas de calibração do ozonizador para as tensões de 40%, 60% e 80%.

6.5.1.2.2 – Ensaios com ozônio: Balanço de Massa e Desinfecção

Os ensaios de desinfecção com ozônio foram realizados nas tensões de 40 e 60%, com vazão de gás de 60 $g.h^{-1}$, para os tempos de 3,5; 6; 7 e 10 minutos. Os resultados do balanço de massa e os cálculos de CT encontram-se nas tabelas 6.6, 6.7 e 6.8.

Pode-se observar que a massa de ozônio consumida nos ensaios está diretamente associada à massa de ozônio aplicada, bem como o CT de cada ensaio. Além disso, a concentração de ozônio encontrada no frasco lavador (*off-gas*) esteve relacionada com concentração aplicada e o tempo de contato. Em nenhum ensaio foi encontrado ozônio residual na massa líquida.

Os CT aplicados variaram, para tensão de 40%, de 5 a 47 $mg.min.L^{-1}$; enquanto que para a tensão de 60%, de 21 a 143 $mg.min.L^{-1}$.

Tabela 6.6 – Balanço de massa e cálculo dos CT do ensaio I na desinfecção de efluente secundário com ozônio.

	Tensão 40%				Tensão 60%			
Variáveis	**3,5 min**	**6 min**	**7 min**	**10 min**	**3,5 min**	**6 min**	**7 min**	**10 min**
Produção de O_3 ($g.L^{-1}$)	0,11	0,11	0,11	0,11	0,46	0,46	0,46	0,46
Dosagem ($mg.L^{-1}$)	3,29	5,63	6,57	9,39	13,46	23,08	26,92	38,46
M_A (mg)	6,57	11,27	13,15	18,78	26,92	46,15	53,84	76,92
M_T (mg)	5,27	10,83	12,93	1835	26,71	37,82	31,55	47,05
$M_{off\text{-}gas}$ (mg)	1,30	0,43	0,22	0,43	0,22	8,33	22,30	29,87
M_R (mg)	0	0	0	0	0	0	0	0
M_C (mg)	5,27	10,83	12,93	18,35	26,71	37,82	31,55	47,05
$[O_3]_{off\text{-}gas}$ ($mg.L^{-1}$)	0,65	0,22	0,11	0,22	0,11	4,17	11,15	14,94
$[O_3]_R$ ($mg.L^{-1}$)	0	0	0	0	0	0	0	0
$[O_3]_C$ ($mg.L^{-1}$)	2,64	5,42	6,46	9,17	13,35	18,91	15,77	23,52
Taxa de consumo de O_3 ($mg.L^{-1}.min^{-1}$)	0,75	0,90	0,92	0,92	3,82	3,15	2,25	2,35
CT ($mg.min.L^{-1}$)	5	16	23	46	23	57	55	118

Notas: CT: concentração x tempo; M_A: massa total de ozônio aplicada; M_T: massa transferida ao meio líquido; $M_{off\text{-}gas}$: massa do *off-gas* – não transferida; M_R: massa residual; M_C: massa consumida; $[O_3]_{off\text{-}gas}$: concentração de ozônio referente ao *off-gas*; $[O_3]_R$: concentração de ozônio residual; $[O_3]_C$: concentração de ozônio consumida.

Tabela 6.7 – Balanço de massa e cálculo dos CT do ensaio II na desinfecção de efluente secundário com ozônio.

	Tensão 40%				Tensão 60%			
Variáveis	**3,5 min**	**6 min**	**7 min**	**10 min**	**3,5 min**	**6 min**	**7 min**	**10 min**
Produção de O_3 ($g.L^{-1}$)	0,11	0,11	0,11	0,11	0,46	0,46	0,46	0,46
Dosagem ($mg.L^{-1}$)	3,29	5,63	6,57	9,39	13,46	23,08	26,92	38,46
M_A (mg)	6,57	11,27	13,15	18,78	26,92	46,15	53,84	76,92
M_T (mg)	5,92	11,27	13,15	18,78	24,43	39,12	41,40	46,61
$M_{off\text{-}gás}$ (mg)	0,65	0	0	0	2,49	7,04	12,45	30,31
M_R (mg)	0	0	0	0	0	0	0	0
M_C (mg)	5,92	11,27	13,15	18,78	24,43	39,12	41,40	46,61
$[O_3]_{off\text{-}gás}$ ($mg.L^{-1}$)	0,32	0	0	0	1,24	3,52	6,22	15,15
$[O_3]_R$ ($mg.L^{-1}$)	0	0	0	0	0	0	0	0
$[O_3]_C$ ($mg.L^{-1}$)	2,96	5,63	6,57	9,39	12,22	19,56	20,70	23,31
Taxa de consumo de O_3 ($mg.L^{-1}.min^{-1}$)	0,85	0,94	0,94	0,94	3,49	3,26	2,96	2,33
CT ($mg.min.L^{-1}$)	5	17	23	47	21	59	72	117

Notas: CT: concentração x tempo; M_A: massa total de ozônio aplicada; M_T: massa transferida ao meio líquido; $M_{off\text{-}gas}$: massa do off-gás – não transferida; M_R: massa residual; M_C: massa consumida; $[O_3]_{off\text{-}gas}$: concentração de ozônio referente ao *off-gas*; $[O_3]_R$: concentração de ozônio residual; $[O_3]_C$: concentração de ozônio consumida.

Tabela 6.8 – Balanço de massa e cálculo dos CT do ensaio III na desinfecção de efluente secundário com ozônio.

	Tensão 40%				Tensão 60%			
Variáveis	**3,5 min**	**6 min**	**7 min**	**10 min**	**3,5 min**	**6 min**	**7 min**	**10 min**
Produção de O_3 ($g.L^{-1}$)	0,11	0,11	0,11	0,11	0,46	0,46	0,46	0,46
Dosagem ($mg.L^{-1}$)	3,29	5,63	6,57	9,39	13,46	23,08	26,92	38,46
M_A (mg)	6,57	11,27	13,15	18,78	26,92	46,15	53,84	76,92
M_T (mg)	6,52	11,16	12,98	18,45	25,19	40,42	47,46	57,22
$M_{off\text{-}gás}$ (mg)	0,05	0,11	0,16	0,32	1,73	5,74	6,39	19,70
M_R (mg)	0	0	0	0	0	0	0	0
M_C (mg)	6,52	11,16	12,98	18,45	25,19	40,42	47,46	57,22
$[O_3]_{off\text{-}gás}$ ($mg.L^{-1}$)	0,03	0,05	0,08	0,16	0,87	2,87	3,19	9,85
$[O_3]_R$ ($mg.L^{-1}$)	0	0	0	0	0	0	0	0
$[O_3]_C$ ($mg.L^{-1}$)	3,26	5,58	6,49	9,23	12,60	20,21	23,73	28,61
Taxa de consumo de O_3 ($mg.L^{-1}.min^{-1}$)	0,93	0,93	0,93	0,92	3,60	3,37	3,39	2,86
CT ($mg.min.L^{-1}$)	6	17	23	46	22	61	83	143

Notas: CT: concentração x tempo; M_A: massa total de ozônio aplicada; M_T: massa transferida ao meio líquido; $M_{off\text{-}gas}$: massa do off-gás – não transferida; M_R: massa residual; M_C: massa consumida; $[O_3]_{off\text{-}gas}$: concentração de ozônio referente ao *off-gas*; $[O_3]_R$: concentração de ozônio residual; $[O_3]_C$: concentração de ozônio consumida.

As características físicas, químicas e microbiológicas do efluente após os ensaios I, II e II com ozônio estão apresentados nas tabelas 6.9, 6.10 e 6.11, respectivamente.

Quanto aos parâmetros físico-químicos, foi observado aumento do pH durante os ensaios de ozonização, que segundo Soares (2007) pode ser devido ao stripping de CO_2.

Com relação à alcalinidade, é importante a sua mensuração em decorrência de sua influência na ozonização, não sendo observada variação durante os ensaios.

A absorbância em 254 nm apresentou diminuição, que segundo White's... (2010) o ozônio reage com material orgânico que absorve luz UV em 254 nm. Nos ensaios com tensão de 40%, verificou-se remoção de até 15%. Na tensão de 60%, observou-se decréscimo da absorbância com o tempo de aplicação de ozônio: com 3,5 minutos, a média foi de 32%, enquanto que no tempo de 10 minutos de contato, a média foi de 56%.

A remoção de DQO foi de até 23%, de 5,28 $mg.L^{-1}$, na tensão de 40%; enquanto que na tensão de 60%, nos ensaios I e III alcançou 42%, com concentração de ozônio consumida de 23,5 e 28,3 $mg.L^{-1}$. Apenas para o ensaio III, com tensão de 60%, foi observada associação entre a remoção de DQO e a concentração de ozônio consumida, com R^2 de 0,9987.

A ozonização também removeu turbidez do efluente. Na tensão de 40%, até 46% com 9,39 $mg.L^{-1}$ de ozônio consumido no ensaio II. E na tensão de 60%, foram constatadas remoções médias de 22% com concentração de ozônio consumida, em média de 12,7 $mg.L^{-1}$, e 78% quando a concentração média consumida de ozônio foi de 25,1 $mg.L^{-1}$. Apenas para o ensaio III, com tensão de 60%, foi observada associação entre a remoção de turbidez e a concentração de ozônio consumida, com R^2 de 0,8582.

As concentrações de sólidos totais e sólidos suspensos totais não apresentaram tendência a diminuir ou aumentar, similarmente aos ensaios com o cloro.

Tabela 6.9 - Resultados físico-químicos e microbiológicos do ensaio I da ozonização de efluente secundário.

		Tensão 40%				Tensão 60%			
Variáveis	**Bruto**	**3,5 min**	**6 min**	**7 min**	**10 min**	**3,5 min**	**6 min**	**7 min**	**10 min**
Temperatura	25,3	25,7	25,6	25,9	25,6	25,8	25,8	25,4	25,6
pH	7,7	8,03	8,04	8	8,07	7,85	7,98	8,04	8,03
Alcalinidade total (mg $CaCO_3.L^{-1}$)	252	253	246	247	241	249	246	241	242
Absorbância 254 nm	0,241	0,206	0,225	0,228	0,222	0,173	0,116	0,106	0,098
Turbidez (uT)	9,37	11,1	11,4	13,3	11,6	6,56	2,74	3,98	3,7
DQO ($mg.L^{-1}$)	50	41	46	44	47	49	36	29	32
Sólidos Totais ($mg.L^{-1}$)	290	290	290	290	290	290	282	277	279
Sólidos Suspensos Totais ($mg.L^{-1}$)	18	17	16	14	17	18	1	1	1
Coliformes totais (UFC / 100 mL)	$2,5x10^5$	$2,4x10^5$	$1,7x10^5$	$1,4x10^5$	$1,3x10^5$	$2,9x10^4$	$1,2x10^4$	$3,0x10^3$	$2,8x10^3$
***E. coli* (UFC/ 100 mL)**	$3,0x10^4$	$1,3x10^4$	$7,8x10^3$	$9,0x10^3$	$7,0x10^3$	$5,0x10^2$	$2,0x10^2$	$4,0x10^1$	$2,0x10^1$
***Clostridium* sp. (UFC/ 100 mL)**	$1,6x10^4$	$1,3x10^4$	$8,9x10^3$	$1,2x10^4$	$1,3x10^4$	$7,8x10^3$	$1,9x10^3$	$1,4x10^3$	$1,2x10^3$

Nota: DQO: demanda química de oxigênio: UFC: unidade formadora de colônia; uT: unidade de turbidez.

Tabela 6.10 - Resultados físico-químicos e microbiológicos do ensaio II da ozonização de efluente secundário.

		Tensão 40%				Tensão 60%			
Variáveis	**Bruto**	**3,5 min**	**6 min**	**7 min**	**10 min**	**3,5 min**	**6 min**	**7 min**	**10 min**
Temperatura	25,3	25	24,7	24,8	24,8	24,8	24,7	24,7	24,9
pH	7,51	7,85	8,06	8,01	8,15	7,91	7,93	7,9	8,05
Alcalinidade total (mg CaCO3.L-1)	200	188	187	189	185	187	184	182	180
Abs 254 nm	0,236	0,217	0,239	0,216	0,209	0,173	0,120	0,098	0,091
Turbidez (uT)	11,7	8,36	9,08	8,7	6,3	11,6	4,1	5,78	1,97
DQO ($mg.L^{-1}$)	55	63	56	63	59	63	48	49	59
Sólidos Totais ($mg.L^{-1}$)	354	400	376	400	414	341	346	356	354
Sólidos Suspensos Totais ($mg.L^{-1}$)	14	< ld	< ld	< ld	2	4	< ld	< ld	< ld
Coliformes totais (UFC / 100 mL)	$1,6x10^6$	$1,4x10^6$	$2,0x10^6$	$5,6x10^5$	$1,3x10^6$	$1,7x10^5$	$5,0x10^4$	$6,6x10^4$	$1,0x10^5$
***E. coli* (UFC/ 100 mL)**	$1,1x10^5$	$3,9x10^4$	$5,4x10^4$	$8,9x10^4$	$3,3x10^4$	$2,0x10^3$	$2,0x10^2$	$3,0x10^2$	$1,0x10^3$
***Clostridium* sp. (UFC/ 100 mL)**	$8,9x10^3$	$7,8x10^3$	7,0x103	$5,9x10^3$	$4,5x10^3$	$6,7x10^3$	$3,3x10^3$	$2,0x10^3$	$1,4x10^3$

Nota: DQO: demanda química de oxigênio: UFC: unidade formadora de colônia; uT: unidade de turbidez.

ld: limite de detecção do método

Tabela 6.11 - Resultados físico-químicos e microbiológicos do ensaio III da ozonização de efluente secundário.

		Tensão 40%				Tensão 60%			
Variáveis	**Bruto**	**3,5 min**	**6 min**	**7 min**	**10 min**	**3,5 min**	**6 min**	**7 min**	**10 min**
Temperatura	25,2	25,1	25	25,2	25	24,9	24,8	24,8	25,6
pH	6,47	6,87	6,98	6,93	6,97	6,86	6,87	6,92	6,96
Alcalinidade total (mg $CaCO_3.L^{-1}$)	28	22	22	22	23	22	22	22	26
Abs 254 nm	0,269	0,258	0,239	0,243	0,245	0,216	0,182	0,166	0,146
Turbidez (uT)	65,3	45,4	38,2	36,8	36,9	41,8	33,6	31	12,2
DQO ($mg.L^{-1}$)	116	95	89	105	93	94	81	76	67
Sólidos Totais ($mg.L^{-1}$)	330	334	322	286	404	298	332	328	301
Sólidos Suspensos Totais ($mg.L^{-1}$)	60	48	50	49	57	51	34	31	20
Coliformes totais (UFC / 100 mL)	$7,3x10^5$	$4,5x10^5$	$4,9x10^5$	$3,8x10^5$	$4,8x10^5$	$4,2x10^5$	$1,7x10^5$	$1,3x10^5$	$3,1x10^4$
***E. coli* (UFC/ 100 mL)**	$1,7x10^4$	$1,0x10^4$	$1,2x10^4$	$6,7x10^3$	$5,6x10^3$	$1,1x10^4$	$3,3x10^3$	$1,9x10^3$	$6,7x10^2$
***Clostridium* sp. (UFC/ 100 mL)**	$2,0x10^4$	$9,8x10^3$	$9,3x10^3$	$1,0x10^4$	$1,0x10^4$	$1,1x10^4$	$7,3x10^3$	$7,7x10^3$	$5,5x10^3$

Nota: DQO: demanda química de oxigênio: UFC: unidade formadora de colônia; uT: unidade de turbidez.

A inativação dos microrganismos pode ser visualizada na figura 6.11. De mesmo modo que o cloro, o ozônio conseguiu inativar mais a *E. coli* ao comparar com os coliformes totais. Mais uma vez, *Clostridium perfringens* se mostrou bastante resistente, só alcançando um log de inativação após aproximadamente CT de 118 $mg.min.L^{-1}$, próximos aos valores encontrados por Gehr et al. (2003), que relatam 2 log de inativação para coliformes fecais e próximo a 1 log para *Clostridium perfringens*, com dose transferida de ozônio de 30 a 50 $mg.L^{-1}$.

Lourenção (2009) relata inativação de 1,13; 2,18 e 2,52 log para *Clostridium perfringens*, coliformes totais e *E. coli*, respectivamente, para CT de 211 $mg.min.L^{-1}$. Soares (2007) descreve que a máxima inativação conseguida para *Clostridium*, 2,0 log, só foi possível após aplicar CT de 148 $mg.min.L^{-1}$.

No ensaio III não foi obtida inativação próxima aos ensaios I e II, provavelmente por causa da pior qualidade do efluente utilizado e menor alcalinidade, com maior DQO e elevados valores de turbidez e absorbância 254 nm, o que pode levar a uma rápida decomposição do ozônio com liberação de radicais hidroxila, que são menos seletivos.

Como relatado anteriormente, a ozonização é dependente da qualidade físico-química do efluente, de modo similar à cloração, sendo difícil estabelecer comparações com outros trabalhos encontrados na literatura.

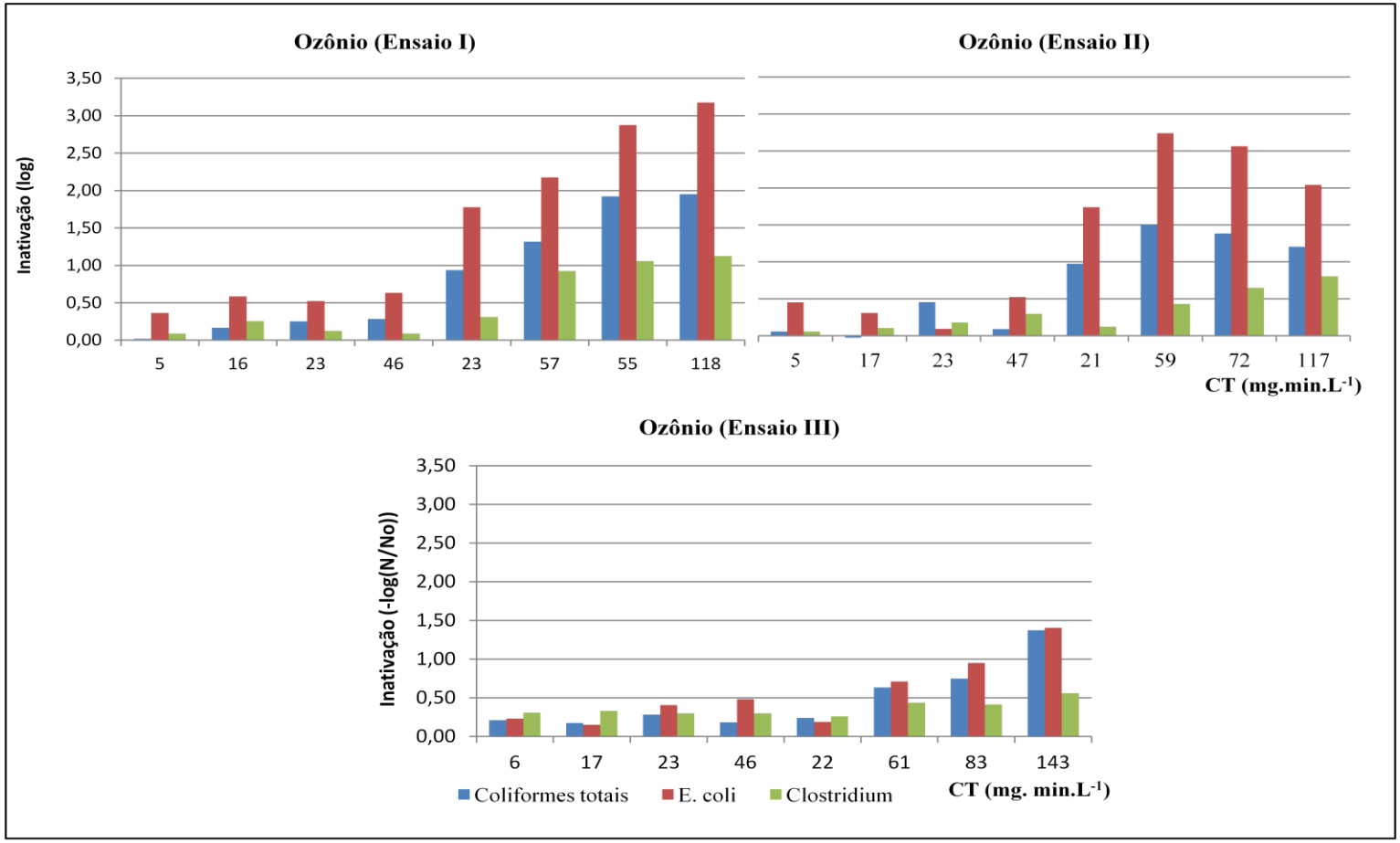


Figura 6.11 - Inativação de microrganismos indicadores presentes em efluente secundário após ozonização (Em cada ensaio, os quatro primeiros CT à esquerda foram obtidos com tensão de 40%, e os quatro CT à direita, com tensão de 60%; ambos para o tempo de 7 minutos de contato).

Podem ser relatadas associações significativas entre a massa de ozônio consumida e a inativação de microrganismos - alguns exemplos podem ser visualizados nas figuras 6.12, 6.13 e 6.14.

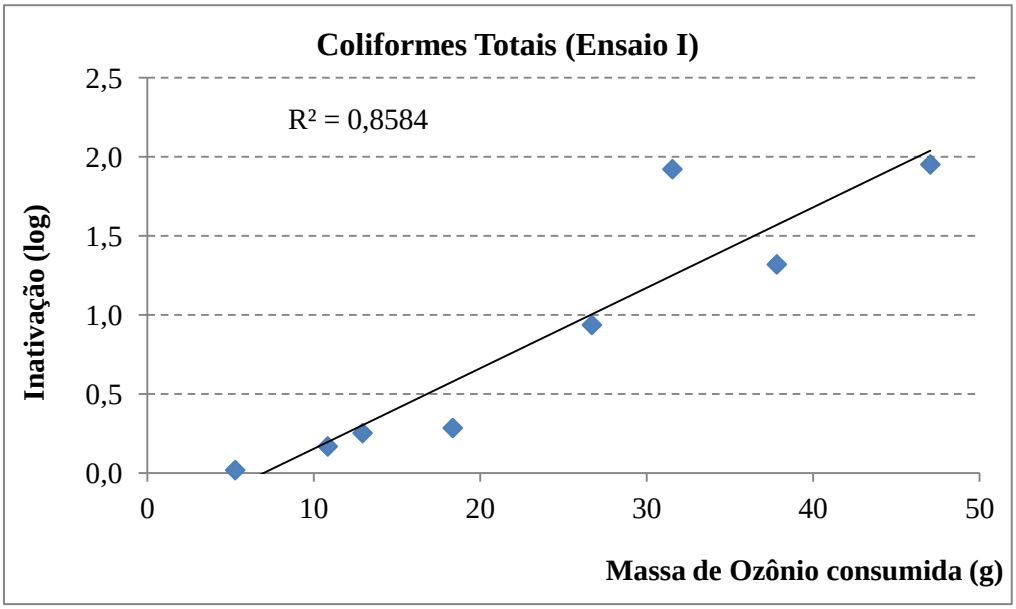


Figura 6.12 - Exemplo de forte associação entre a inativação de coliformes totais com a massa de ozônio consumida durante os ensaios de desinfecção com ozônio.

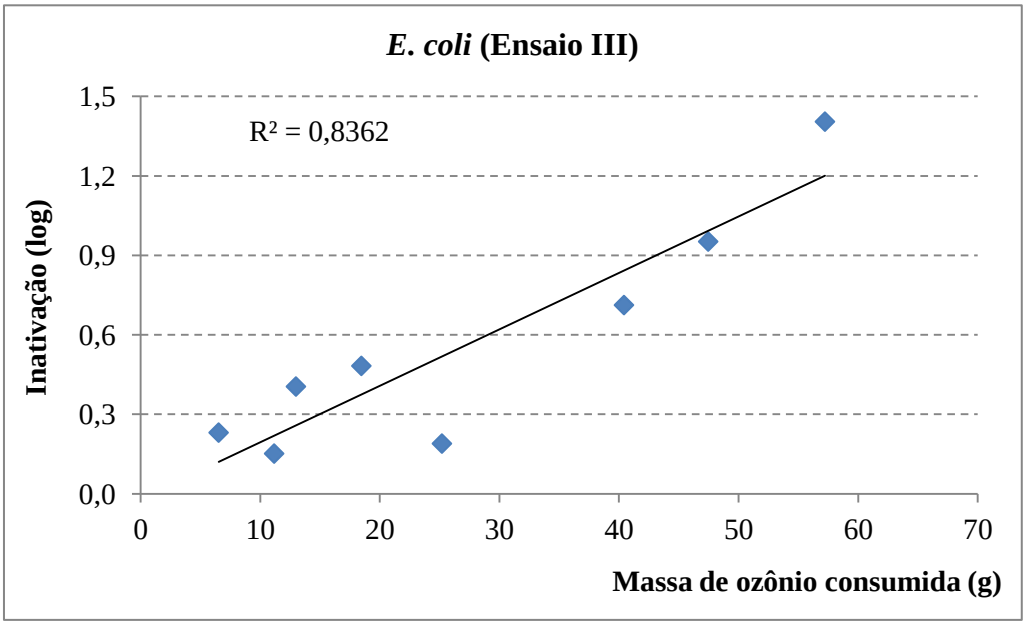


Figura 6.13 - Exemplo de forte associação entre a inativação de *E. coli* com a massa de ozônio consumida durante os ensaios de desinfecção com ozônio.

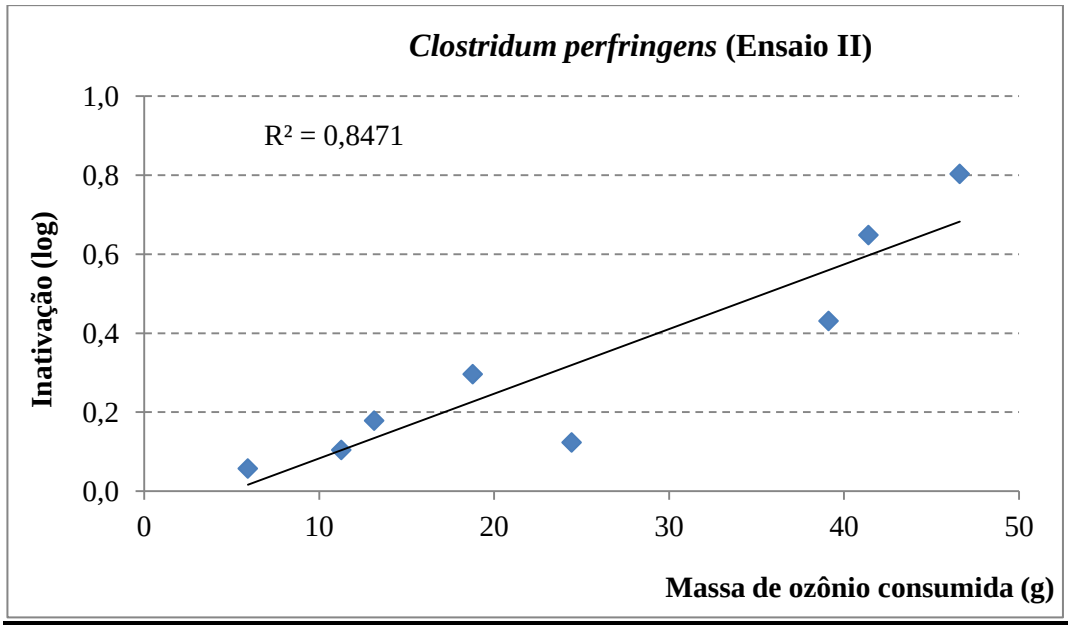


Figura 6.14 - Exemplo de forte associação entre a inativação de *Clostridium perfringens* com a massa de ozônio consumida durante os ensaios de desinfecção com ozônio.

6.5.1.3 - Desinfecção com Radiação Ultravioleta

6.5.1.3.1 - Ensaios de Medição da quantidade de radiação UV a 254nm

A intensidade de radiação ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm no interior do reator foi medida por actinometria, a partir de uma solução de ferrioxalato de potássio. Na figura 6.15, está apresentada a taxa de formação de Fe^{2+} relacionada com a intensidade média de radiação medida na superfície líquida. Para os ensaios de actinometria foi utilizado 1,0 cm de altura da lâmina líquida.

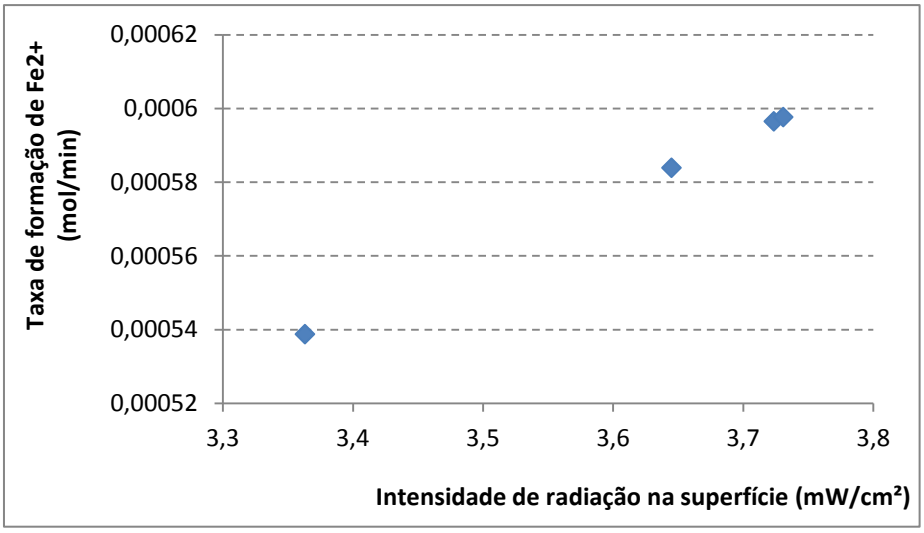


Figura 6.15 - Taxa de formação de Fe^{2+} a partir da intensidade de radiação UV aplicada na superfície do reator, nos ensaios de actinometria.

A razão entre a taxa de formação de Fe^{2+} e a intensidade de radiação se manteve constante nas combinações testadas, com valor de 0,0001602 (mol/min.)/(mW/cm²).

A dose de radiação UV distribuída pelo volume líquido foi também relacionada com o tempo de exposição nos ensaios por actinometria, como pode ser visualizado na figura 6.16.

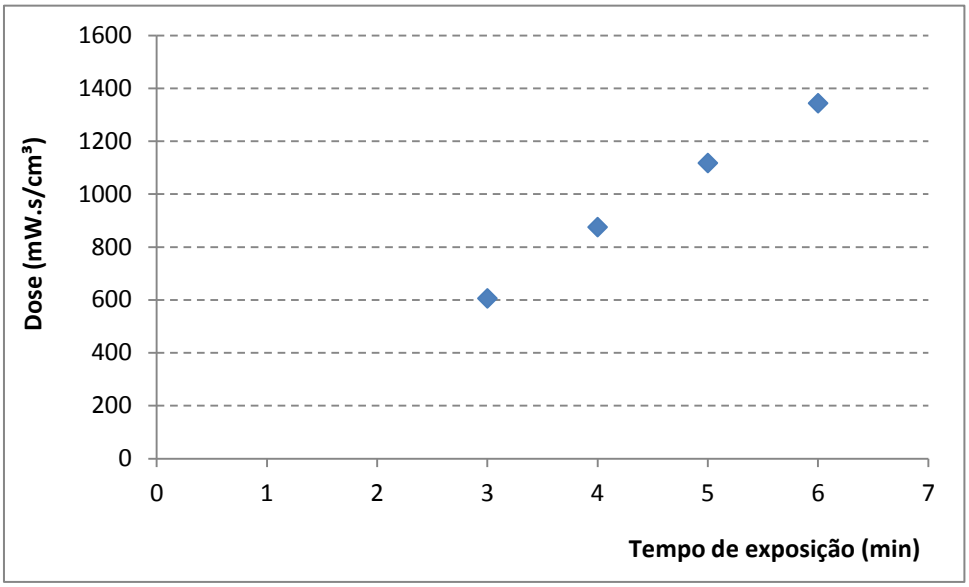


Figura 6.16 - Dose de radiação UV distribuída pelo volume de solução actinométrica de acordo com o tempo de exposição.

Assim, a partir das figuras 8.15 e 8.16 pode ser calculada a intensidade média de radiação que atinge a superfície do reator igual a 3,70 $mW.cm^{-2}$. Esse valor foi inserido na equação 6.11 de intensidade média e a partir das doses recebidas a serem testadas - 1; 2,5; 5 e 10 $Wh.m^{-3}$ - foram calculados os tempos necessários de exposição.

6.5.1.3.2 - Ensaios de Desinfecção com Radiação UV

Os ensaios de desinfecção por radiação ultravioleta do efluente secundário proveniente do tratamento biológico foram conduzidos em reator de bancada composto por seis lâmpadas germicidas, cujos resultados estão dispostos nas tabelas 6.12, 6.13 e 6.14.

Tabela 6.12 - Resultados físico-químicos e microbiológicos do Ensaio I da desinfecção com radiação ultravioleta em efluente secundário.

		Doses ($Wh.m^{-3}$)			
Variáveis	**Bruto**	**1**	**2,5**	**5**	**10**
pH	7,45	7,38	7,53	7,50	7,57
Temperatura	23,6	23,2	23,4	23,3	23,3
Abs 254 nm	0,207	0,215	0,207	0,213	0,218
Turbidez (uT)	7,6	12,3	14,7	15,0	11,5
Sólidos Totais ($mg.L^{-1}$)	283	262	186	232	218
Sólidos Suspensos Totais ($mg.L^{-1}$)	30	33	25	37	24
DQO ($mg.L^{-1}$)	70	52	52	37	56
Coliformes totais (UFC / 100 mL)	$2,7x10^5$	$2,3x10^4$	$4,4x10^3$	$1,4x10^3$	$9,0x10^2$
***E. coli* (UFC/ 100 mL)**	$3,3x10^4$	$1,8x10^3$	$2,0x10^2$	$3,0x10^1$	$2,0x10^1$
***Clostridium* sp. (UFC/ 100 mL)**	$1,0x10^4$	$9,0x10^3$	$7,0x10^3$	$6,3x10^3$	$3,8x10^3$

Nota: DQO: demanda química de oxigênio: UFC: unidade formadora de colônia; uT: unidade de turbidez.

Tabela 6.13 - Resultados físico-químicos e microbiológicos do Ensaio II da desinfecção com radiação ultravioleta em efluente secundário.

		Doses ($Wh.m^{-3}$)			
Variáveis	**Bruto**	**1**	**2,5**	**5**	**10**
pH	5,85	5,91	6,02	6,1	6,0
Temperatura	23,8	23,9	24,1	24,4	24,4
Abs 254 nm	0,187	0,197	0,197	0,201	0,195
Turbidez (uT)	18,9	23,1	19,3	19,9	20,4
Sólidos Totais ($mg.L^{-1}$)	336	356	312	340	298
Sólidos Suspensos Totais ($mg.L^{-1}$)	21	27	26	22	28
DQO ($mg.L^{-1}$)	45	40	32	34	37
Coliformes totais (UFC / 100 mL)	$1,9x10^5$	$4,0x10^4$	$2,3x10^3$	$1,0x10^3$	$7,0x10^2$
***E. coli* (UFC/ 100 mL)**	$7,5x10^2$	$2,5x10^2$	$1,3x10^2$	$2,5x10^1$	$1,3x10^1$
***Clostridium* sp. (UFC/ 100 mL)**	$3,0x10^3$	$2,9x10^3$	$1,5x10^3$	$6,0x10^2$	$2,0x10^2$

Nota: DQO: demanda química de oxigênio: UFC: unidade formadora de colônia; uT: unidade de turbidez.

Tabela 6.14 - Resultados físico-químicos e microbiológicos do Ensaio III da desinfecção com radiação ultravioleta em efluente secundário.

		Doses ($Wh.m^{-3}$)			
Variáveis	**Bruto**	**1**	**2,5**	**5**	**10**
pH	5,60	5,64	5,61	5,67	5,69
Temperatura	25,6	25,3	25,4	25,3	25,3
Abs 254 nm	0,163	0,186	0,183	0,184	0,182
Turbidez (uT)	9,4	10,4	9,06	11,1	9,35
Sólidos Totais ($mg.L^{-1}$)	332	283	348	308	318
Sólidos Suspensos Totais ($mg.L^{-1}$)	19	10	14	14	21
DQO ($mg.L^{-1}$)	50	40	38	39	44
Coliformes totais (UFC / 100 mL)	$1,7x10^4$	$2,5x10^4$	$5,0x10^3$	$1,0x10^3$	$3,8x10^2$
***E. coli* (UFC/ 100 mL)**	$1,3x10^4$	$1,3x10^3$	$6,3x10^2$	$1,3x10^1$	$1,0x10^1$
***Clostridium* sp. (UFC/ 100 mL)**	$5,3x10^3$	$4,0x10^3$	$2,4x10^3$	$2,2x10^3$	$1,0x10^3$

Nota: DQO: demanda química de oxigênio: UFC: unidade formadora de colônia; uT: unidade de turbidez.

Com relação às variáveis físicas e químicas, a aplicação da radiação ultravioleta provocou ligeiro aumento no pH e nos valores de turbidez e absorbância em 254 nm, porém não significantes (teste t, $p > 0,05$).

As concentrações de sólidos totais e sólidos suspensos totais variaram de acordo com as doses aplicadas durante os tratamentos, não sendo estabelecida nenhuma tendência, em aumento ou diminuição. Houve diminuição entre 10 e 47% na DQO, dependendo da dose aplicada, com diferença estatística apenas entre as doses de 2,5 e 10 $Wh.m^{-3}$ (teste t, $p < 0,05$), com maior remoção de DQO na dose de 2,5 $Wh.m^{-3}$.

A média de inativação de micro-organismos indicadores pela radiação ultravioleta pode ser visualizada na figura 6.17.

Similarmente aos ensaios com ozônio e cloro, a *E. coli* se mostrou mais susceptível à desinfecção por radiação ultravioleta, porém sem diferença estatística à inativação de coliformes totais (teste t, $p > 0,05$). E de modo semelhante aos ensaios com ozônio e cloro, *Clostridium perfringens* foi bastante resistente nas doses aplicadas, com média próxima a 0,8 log de inativação apenas com dose de 10 $Wh.m^{-3}$.

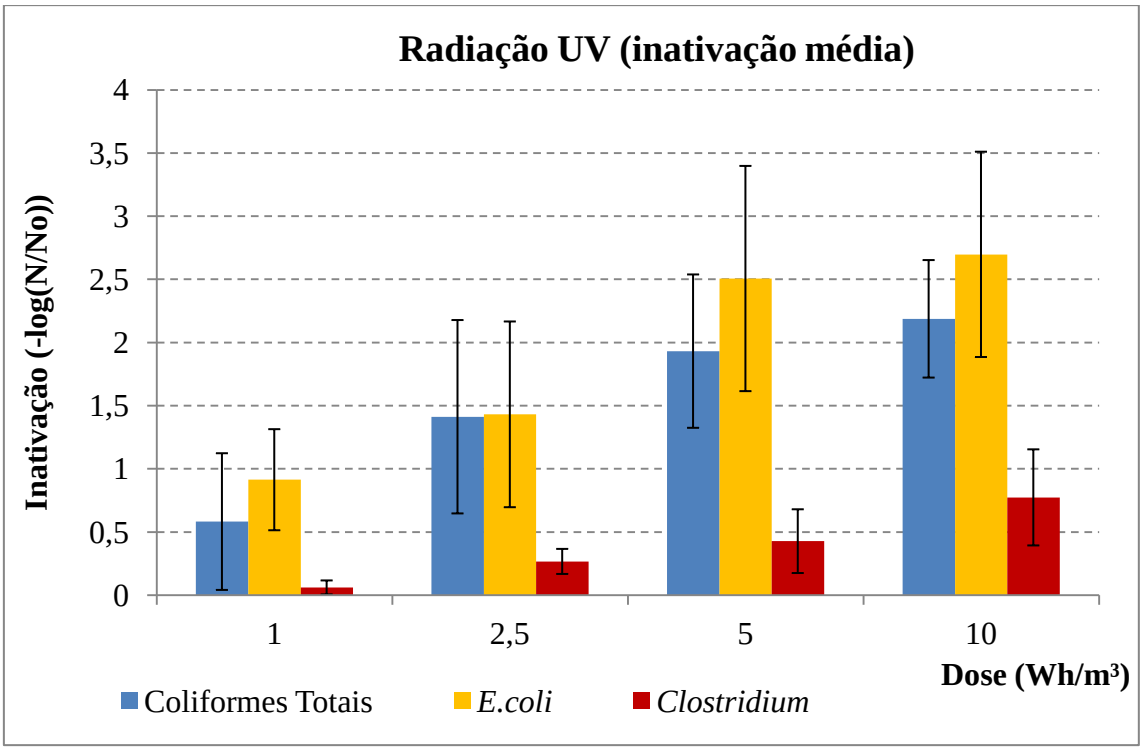


Figura 6.17 - Inativação média por radiação ultravioleta de microrganismos indicadores em efluente secundário. As barras no centro das colunas representam o desvio padrão.

Wang et al. (2012) utilizaram a radiação UV na desinfecção de efluente tratado por MBR (*Membrane Bioreactor* - Reator biológico com membrana) com turbidez de 1,6 NTU e Abs 254 nm de 0,243, e encontraram para coliformes totais inativação de: 0,5; 1,0; 1,8 e 3 log para as de 1,0; 2,5; 5,0 e 10 $Wh.m^{-3}$, respectivamente; portanto, inativação bastante próxima à encontrada no presente trabalho, exceto para a dose de 10 $Wh.m^{-3}$.

Li et al. (2009) relatam inativação de 2,2 a 4,4 log para coliformes totais, porém com doses bastante superiores às adotadas no presente trabalho (18,6 a 50 $mJ.cm^{-2}$).

Pesquisa efetuada por Gehr et al. (2003), com efluente de tratamento secundário, mostra inativação de 1 e 2 log de *E. coli* a partir da aplicação de dose de aproximadamente 2,5 e 10 $mJ.cm^{-2}$, respectivamente. Os autores relatam ainda inativação de 0,5 log de *Clostridium perfringens* com dose de 10 $mJ.cm^{-2}$ - resultados próximos ao encontrados no presente trabalho.

Lourenção (2009) encontrou maior inativação para os três micro-organismos, nas doses de 1; 5 e 10 $Wh.m^{-3}$, utilizando o mesmo reator. Tinoco (2012) encontrou inativação de *E. coli* e coliformes totais superiores a 4,4 e 3,7 log, respectivamente; todavia a inativação de *Clostridium perfringens* foi próxima à deste trabalho.

6.5.2 - Desinfecções Sequenciais

Visto que doses muito elevadas dos desinfetantes poderiam inativar totalmente os micro-organismos de interesse, nos ensaios sequenciais foram aplicadas as seguintes doses:

- Cloro: 5 $mg.L^{-1}$ e 5 minutos (CT = 25 $mg.min.L^{-1}$);
  10 $mg.L^{-1}$ e 10 minutos (CT = 100 $mg.min.L^{-1}$);
- Ozônio: 7 minutos nas tensões de 40 e 60%;
- Radiação ultravioleta: 2,5 $Wh.m^{-3}$.

Elas foram escolhidas visando a verificar possíveis efeitos sinérgicos para: *E. coli*, coliformes totais, *Clostridium perfringens*, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.. Foram realizadas 4 repetições de cada ensaio.

6.5.2.1 - Desinfecção Sequencial: Cloro com Radiação Ultravioleta

Os resultados relativos às variáveis físicas e químicas com aplicação de cloro, desinfetante primário, seguido imediatamente de radiação ultravioleta, desinfetante secundário, podem ser visualizados na tabela 6.15.

A temperatura e pH, durante os ensaios, não apresentaram variações significativas após a aplicação do cloro e em sequência, após a radiação ultravioleta.

A alcalinidade se manteve próxima a 150 mg de $CaCO_3.L^{-1}$, com pequena redução durante a cloração e cloro seguido de radiação UV, porém, não significativa.

A absorbância 254 nm apenas não apresentou diferença significativa (teste t, $p > 0,05$) nas amostras cloradas em relação ao efluente dos lodos ativados. A dose de radiação UV aplicada em sequência não influenciou neste parâmetro.

Quanto à turbidez, DQO e sólidos, apesar de em alguns casos ter ocorrido redução destas variáveis, a diferença não foi significativa.

Os residuais de cloro livre e cloro combinado não foram afetados significativamente pela aplicação da radiação ultravioleta em sequência à cloração.

Tabela 6.15 - Resultados das variáveis físicas e químicas (média ± desvio padrão) da desinfecção sequencial (Cloro - UV) de efluente de tratamento secundário.

Variáveis	Efluente LA	UV	Cl [5;5]	Cl [5;5] - UV	Cl [10;10]	Cl [10;10] - UV
Temperatura	24,7 ± 1,1	24,9 ± 1,1	25,2 ± 1,0	25,1 ± 1,0	25,2 ± 1,1	25,4 ± 0,6
pH	7,44 ± 0,24	7,64 ± 0,15	7,47 ± 0,16	7,59 ± 0,10	7,36 ± 0,13	7,37 ± 0,16
Alcalinidade Total	154 ± 49	151 ± 49	146 ± 42	145 ± 42	142 ± 39	141 ± 38
Abs 254 nm	0,244 ± 0,074	0,247 ± 0,054	0,263 ± 0,063	0,249 ± 0,056	0,284 ± 0,059	0,261 ± 0,071
Turbidez (uT)	10,9 ± 10	9,90 ± 7,54	9,03 ± 7,41	9,10 ± 7,48	9,30 ± 7,9	8,87 ± 6,50
DQO ($mg.L^{-1}$)	97 ± 16	101 ± 14	86 ± 21	88 ± 13	84 ± 18	103 ± 21
Sólidos Totais ($mg.L^{-1}$)	330 ± 71	312 ± 52	397 ± 65	423 ± 75	457 ± 69	458 ± 68
Sólidos Suspensos Totais ($mg.L^{-1}$)	14 ± 16	15 ± 13	10 ± 13	13 ± 13	11 ± 11	10 ± 11
Sólidos Dissolvidos Totais ($mg.L^{-1}$)	316 ± 58	298 ± 40	386 ± 56	410 ± 63	446 ± 64	448 ± 62
N - amoniacal ($mg.L^{-1}$)	23 ± 15	-	-	-	-	-
Cloro residual livre ($mg.L^{-1}$)	-	-	0,73 ± 0,18	0,48 ± 0,20	1,86 ± 0,13	1,25 ± 0,46
Cloro residual combinado ($mg.L^{-1}$)	-	-	3,37 ± 0,61	3,22 ± 0,67	4,04 ± 1,03	4,30 ± 0,87
Cloro residual total ($mg.L^{-1}$)	-	-	4,10 ± 0,58	3,69 ± 0,70	5,90 ± 1,05	5,56 ± 1,21

Nota: Efluente LA: efluente do Lodos Ativados; uT: unidade de turbidez; UV: radiação ultravioleta (2,5 $Wh.m^{-3}$); Cl [5;5]: dosagem de 5 $mg.L^{-1}$ de cloro com 5 minutos de contato; Cl [10;10]: dosagem de 10 $mg.L^{-1}$ de cloro com 10 minutos de contato

Os resultados da inativação de microrganismos indicadores podem ser visualizados na tabela 6.16.

Tabela 6.16 - Inativação, em unidades logarítmicas, de microrganismos indicadores (média ± desvio padrão) submetidos à cloração seguida de radiação ultravioleta.

	Inativação (log_{10})		
	E. coli	**Coliformes Totais**	***Clostridium perfringens***
Radiação UV [2,5 $Wh.m^{-3}$]	1,70 ± 0,33	1,47 ± 0,32	0,12 ± 0,04
Cloração [5 $mg.L^{-1}$; 5 min]	2,46 ± 0,77	1,94 ± 0,97	0,77 ± 0,48
Cloro - UV [5 $mg.L^{-1}$; 5 min] - [2,5 $Wh.m^{-3}$]	3,62 ± 0,61	2,78 ± 0,32	1,15 ± 0,76
Cloração [10 $mg.L^{-1}$; 10 min]	3,59 ± 0,39	3,15 ± 0,38	1,06 ± 0,57
Cloro - UV [10 $mg.L^{-1}$; 10 min] - [2,5 $Wh.m^{-3}$]	4,04 ± 0,43	3,50 ± 0,45	1,61 ± 0,77

A ordem crescente de resistência à desinfecção sequencial - cloro seguido de radiação UV - tanto para a dose de 5 $mg.L^{-1}$ e 5 minutos de contato, quanto para 10 $mg.L^{-1}$ e 10 minutos de contato foi: *E. coli* = coliformes totais < esporos de *Clostridium perfringens* (teste t, $p < 0,05$). Coliformes totais e *E. coli* foram 100% inativados em alguns ensaios, enquanto obteve-se para *Clostridium perfringens*, no máximo, 2,78 log de inativação no ensaio II, após CT de 100 $mg.min.L^{-1}$ de cloro seguido de dose de radiação ultravioleta de 2,5 $Wh.m^{-3}$.

Pode-se perceber que os resultados de inativação dos três microrganismos quando utilizado apenas a cloração com 10 $mg.L^{-1}$ e 10 minutos foram estatisticamente iguais aos resultados da desinfecção sequencial com 5 $mg.L^{-1}$ e 5 minutos de cloro seguido de desinfecção por radiação ultravioleta. Dessa forma, no segundo caso, doses menores de cloro poderiam resultar em menores concentrações de subprodutos da desinfecção com cloro (WANG et al., 2007, 2012), mantendo o mesmo potencial de inativação de microrganismos. Porém, neste caso, há que avaliar custos e benefícios da instalação de mais uma unidade de desinfecção.

Os efeitos sinérgicos da desinfecção sequencial, que podem ser visualizados na tabela 6.17, foram mais acentuados para o microrganismo mais resistente - *Clostridium perfringens*, com média de 0,26 e 0,43 log para os ensaios com aplicação de 5 $mg.L^{-1}$ e 10 $mg.L^{-1}$ de cloro seguidos de radiação UV, respectivamente.

Tabela 6.17: Valores de sinergismo, em unidades logarítmicas, encontrados para os microrganismos indicadores nos ensaios de desinfecção sequencial (cloro - radiação ultravioleta).

Microrganismo	Ensaio	Σ Inativações Individuais	Inativação Sequencial	Sinergismo
E. coli	[5;5]-UV[4]	3,38	3,56	0,18
Coliformes totais	[5;5]-UV[4]	2,54	2,67	0,13
Clostridium perfringens	[5;5]-UV[1]	1,33	1,71	0,38
	[10;10]-UV[1]	1,54	1,80	0,26
	[5;5]-UV[2]	1,48	2,08	0,60
	[10;10]-UV[2]	1,96	2,78	0,82
	[10;10]-UV[3]	0,86	1,06	0,20
	[5;5]-UV[4]	0,33	0,40	0,07
	[10;10]-UV[4]	0,36	0,78	0,42

Nota: [5;5]: cloração com 5 $mg.L^{-1}$ e 5 minutos; [10;10]: cloração com 10 $mg.L^{-1}$ e 10 minutos.
[1;2;3;4]: número do ensaio.

Lourenção (2009) e Medeiros (2010) também encontraram efeito sinérgico para desinfecção sequencial cloro seguido de radiação UV para *Clostridium perfringens*, em doses próximas à deste trabalho.

Wang et al. (2012) relatam a ocorrência de efeitos sinérgicos para: contagem de bactérias heterotróficas, contagem bacteriana total e coliformes totais, na desinfecção sequencial composta de radiação ultravioleta seguida de cloração de efluentes para reúso.

Cho et al. (2006) não encontraram efeitos sinérgicos nas desinfecções sequenciais - cloro seguido de radiação UV e radiação UV seguida de cloro - para esporos de *Bacillus subtilis* em ensaios com água deionizada.

Koivunen e Heinonen-Tanski (2005) encontraram efeitos sinérgicos para *E. coli* ao aplicar ácido peracético combinado à radiação ultravioleta em ensaios com água com peptona; porém não para à desinfecção de peróxido de hidrogênio combinada com radiação UV.

Neste trabalho, não houve redução da concentração de (oo)cistos após os ensaios de desinfecção individuais e sequenciais. Oocistos de *Cryptosporidium* só foram

encontrados em 25% amostras (4/16), o que dificultou as análises quanto à viabilidade ou alteração da fluorescência. Dos oocistos encontrados, 60% estavam viáveis.

Rennecker et al. (2000) relatam a dificuldade em inativar oocistos de *Cryptosporidium* em ensaios individuais com cloro, havendo a necessidade de CT superiores a 1.000 mg.min.L^{-1} para 90% de inativação. Enquanto que Driedger et al. (2000), necessitaram de CT de 3.700 mg.min.L^{-1} para atingir 2 log de inativação de *Cryptosporidium*.

Os cistos do protozoário patogênico *Giardia* foram avaliados quanto ao dano morfológico, através da avaliação da florescência dos cistos, e inferência de viabilidade, por meio do corante vital iodeto de propídeo, como pode ser visualizado na figura 6.18.

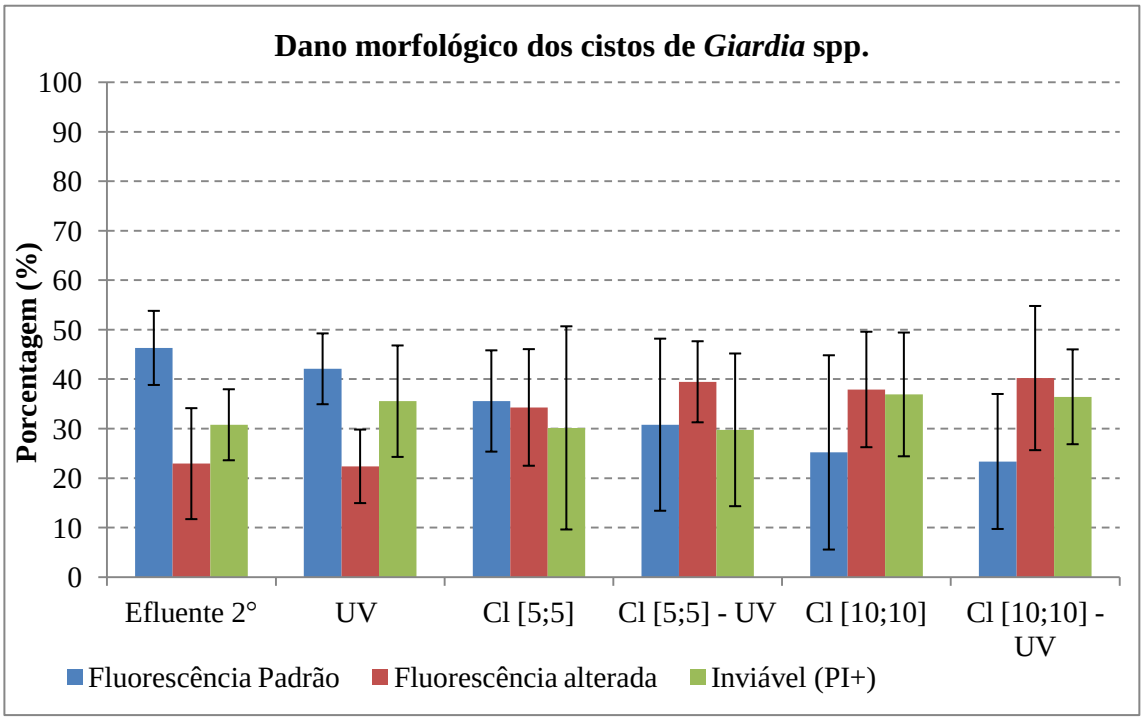


Figura 6.18 - Avaliação do dano morfológico dos cistos de *Giardia* spp. após desinfecções individuais e sequenciais com cloro e radiação UV. As barras centrais representam o desvio padrão. Doses de cloro aplicadas: 5 mg.L^{-1} em 5 minutos e 10 mg.L^{-1} em 10 minutos. Dose de UV: 2,5 Wh.m^{-3}.

Primeiramente, deve ser relatada a dificuldade em realizar ensaios de desinfecção com repetição com esgoto sanitário, pois, dependendo da amostra, pode apresentar qualidades diferentes com inúmeros interferentes à oxidação química ou ação física da radiação ultravioleta (WANG et al., 2012). Em consequência disso, podem ser

observados grandes desvios-padrão nos resultados dos ensaios que compõem a figura 6.18, o que prejudica análises estatísticas comparativas.

Mesmo assim, pode-se constatar decréscimo da porcentagem de cistos de *Giardia* com fluorescência padrão após os ensaios de desinfecção por radiação ultravioleta e de diferentes dosagens de cloro.

A maioria dos estudos encontrados na literatura sobre a ação da radiação ultravioleta em (oo)cistos foram realizados com água, e mesmo assim, apresentam grande variabilidade de resultados.

Modifi et al. (2002) relatam 2 log de inativação de cistos de *Giardia* com dose de 3 $mJ.cm^{-2}$. Linden et al. (2002) encontraram até 4 log de inativação com dose de 1 $mJ.cm^{-2}$. Porém, Li et al. (2009) constataram redução de apenas 0,05 log com doses de UV entre 6 e 18 $mJ.cm^{-2}$ aplicadas em efluente secundário tratado por lodos ativados. Esta baixa inativação, segundo os autores pode ser devida à:

- proteção dos cistos por material particulado do efluente;
- possibilidade de reativação dos cistos após exposição à radiação UV;
- possibilidade de bactérias presentes na água residuária atacarem os cistos e, ao mesmo tempo, protegê-los da radiação UV;
- adsorção de material coloidal aos cistos, protegendo-os da radiação UV.

Como a radiação ultravioleta age no DNA celular, pode-se observar mudança principalmente na viabilidade dos cistos. No entanto, o cloro tem ação na superfície da parede celular dos cistos, como pode ser constatado através do aumento da porcentagem de cistos com fluorescência alterada. A desinfecção sequencial parece ajudar em alterar a fluorescência dos cistos e também torná-los inviáveis.

6.5.2.2 - Desinfecção Sequencial: Ozônio com Radiação Ultravioleta

Os resultados das variáveis físicas e químicas com aplicação de ozônio, desinfetante primário, seguido de radiação ultravioleta, desinfetante secundário, podem ser visualizados na tabela 6.18.

A temperatura não apresentou variação significativa após a aplicação do ozônio e em sequência, após a radiação ultravioleta. No entanto o pH apresentou aumento significativo (teste t, $p < 0,05$) após a ozonização e após a desinfecção sequencial.

Tabela 6.18 - Resultados das variáveis físicas e químicas (média ± desvio padrão) da desinfecção sequencial (Ozônio - UV) de efluente de tratamento secundário.

Variáveis	Efluente LA	UV	O [40%]	O [40%] - UV	O [60%]	O [60%] - UV
Temperatura	24,7 ± 1,1	24,9 ± 1,1	24,7 ± 1,1	25,2 ± 1,1	24,6 ± 1,0	24,7 ± 1,1
pH	7,44 ± 0,24	7,64 ± 0,15	7,88 ± 0,18	7,89 ± 0,18	7,88 ± 0,15	7,86 ± 0,14
Alcalinidade Total	154 ± 49	151 ± 49	149 ± 49	148 ± 47	150 ± 44	147 ± 46
Abs 254 nm	0,244 ± 0,074	0,247 ± 0,054	0,256 ± 0,065	0,252 ± 0,054	0,168 ± 0,091	0,174 ± 0,083
Turbidez (uT)	10,9 ± 10	9,90 ± 7,54	8,24 ± 6,24	8,81 ± 6,35	6,81 ± 8,78	6,44 ± 7,71
DQO ($mg.L^{-1}$)	97 ± 16	101 ± 14	90 ± 24	96 ± 23	75 ± 21	92 ± 26
Sólidos Totais ($mg.L^{-1}$)	330 ± 71	312 ± 52	328 ± 86	341 ± 84	335 ± 76	350 ± 82
Sólidos Suspensos Totais ($mg.L^{-1}$)	14 ± 16	15 ± 13	12 ± 11	15 ± 11	8 ± 10	11 ± 14
Sólidos Dissolvidos Totais ($mg.L^{-1}$)	316 ± 58	298 ± 40	316 ± 79	326 ± 75	326 ± 67	340 ± 70
N - amoniacal ($mg.L^{-1}$)	23 ± 15	-	-	-	-	-
Dosagem ($mg.L^{-1}$)	-	-	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	11,9 ± 0,6	11,9 ± 0,6
CT ($mg.min.L^{-1}$)	-	-	23 ± 1	23 ± 1	83 ± 4	83 ± 4

Nota: Efluente LA: efluente do Lodos Ativados; uT: unidade de turbidez; UV: radiação ultravioleta (2,5 $Wh.m^{-3}$); O [40%]: tensão de 40% com 7 minutos de contato; O [60%]: tensão de 60% com 7 minutos de contato. CT: dosagem x tempo de contato.

A alcalinidade se manteve próxima a 150 mg de $CaCO_3.L^{-1}$, com pequena diminuição durante a ozonização e ozônio seguido de radiação UV, porém, não significativa.

A absorbância 254 nm não apresentou diferença significativa (teste t, $p > 0,05$) nas amostras ozonizadas em relação ao efluente dos lodos ativados, devido à diferença na qualidade do efluente, apresentando elevado desvio padrão nos resultados. Com CT de 23 $mg.min.L^{-1}$ houve remoção de, no máximo 3,0%; enquanto que na aplicação de CT médio de 83 $mg.min.L^{-1}$, a diminuição foi, em média, de 34,2%. A dose de radiação UV aplicada em sequência não influenciou neste parâmetro.

A partir da aplicação de CT de 23 $mg.min.L^{-1}$ foi verificada remoção média de 20,2 % de turbidez e 10,6 % de DQO. Com o aumento do CT para 83 $mg.min.L^{-1}$, a remoção passou para 51% de turbidez e 22,4% para DQO. A dose de radiação UV em sequência às doses de ozônio não influenciou na turbidez e na DQO.

As variações das concentrações de sólidos totais, suspensos totais e dissolvidos totais não foram significativas durante os ensaios individuais e sequenciais de ozônio e radiação ultravioleta.

Os resultados da inativação de microrganismos indicadores podem ser visualizados na tabela 6.19.

Tabela 6.19 - Inativação, em unidades logarítmicas, de microrganismos indicadores (média ± desvio padrão) submetidos à ozonização seguida de radiação ultravioleta.

	Inativação (log_{10})		
	E. coli	**Coliformes Totais**	***Clostridium perfringens***
Radiação UV [2,5 $Wh.m^{-3}$]	1,70 ± 0,33	1,47 ± 0,32	0,12 ± 0,04
Ozonização [3,3 $mg.L^{-1}$; 7 min]	0,04 ± 0,05	0,29 ± 0,35	0,21 ± 0,18
Ozônio - UV [3,3 $mg.L^{-1}$; 7 min] - [2,5 $Wh.m^{-3}$]	1,92 ± 0,26	1,78 ± 0,29	0,31 ± 0,19
Ozonização [11,9 $mg.L^{-1}$; 7 min]	1,40 ± 0,90	1,24 ± 0,48	0,68 ± 0,34
Ozônio - UV [11,9 $mg.L^{-1}$; 7 min] - [2,5 $Wh.m^{-3}$]	2,44 ± 0,39	2,02 ± 0,38	0,84 ± 0,31

Como relatado anteriormente, o esgoto sanitário, mesmo tratado, possui qualidade diferente com o tempo, vindo a dificultar a realização de ensaios com repetição, o que fez apresentar grande desvio padrão nos resultados.

Dessa maneira, para os quatro ensaios realizados de desinfecção individual e sequencial, não foi encontrada diferença estatística quanto à resistência dos micro-organismos - *E. coli*, coliformes totais e *Clostridium perfringens* - à aplicação do ozônio individualmente. Todavia, nos ensaios sequenciais de ozônio seguido de radiação UV, para os dois CT utilizados para ozônio, a ordem crescente de resistência foi: *E. coli* = Coliformes totais < *Clostridium perfringens* (teste t, $p < 0,05$), similarmente à encontrada nos ensaios sequenciais com cloro e radiação UV.

Pode-se perceber que os resultados de inativação dos três micro-organismos quando utilizado apenas a ozonização com 11 $mg.L^{-1}$ e 7 minutos foram estatisticamente iguais aos resultados da desinfecção sequencial com 3,3 $mg.L^{-1}$ e 5 minutos de ozônio seguido de desinfecção por radiação ultravioleta. Segundo White (2010), a aplicação de ozônio precedente à radiação UV pode resultar em menores custos para o sistema de desinfecção por radiação UV, pois ao diminuir a absorbância a 254 nm do efluente, possibilita que a unidade de radiação UV necessite de menos lâmpadas e canais menores. Deve-se atentar também à questão de custos e benefícios

Os efeitos sinérgicos da desinfecção sequencial (ozônio - UV) podem ser visualizados na tabela 6.20.

Tabela 6.20 - Valores de sinergismo, em unidades logarítmicas, encontrados para os microrganismos indicadores nos ensaios de desinfecção sequencial (ozônio - radiação ultravioleta).

Micro-organismo	**Ensaio**	**Σ Inativações Individuais**	**Inativação Sequencial**	**Sinergismo**
E. coli	[23]-UV[2]	1,23	1,54	0,31
	[83]-UV[2]	1,53	1,94	0,41
	[23]-UV[3]	1,64	2,24	0,60
	[23]-UV[4]	1,78	2,04	0,26
Coliformes totais	[23]-UV[2]	0,98	2,26	1,28
Clostridium perfringens	[23]-UV[1]	0,36	0,46	0,10
	[83]-UV[1]	0,39	0,51	0,12
	[83]-UV[3]	1,22	1,30	0,08
	[23]-UV[4]	0,06	0,08	0,02
	[83]-UV[4]	0,54	0,63	0,09

Nota: [23]: CT de 23 $mg.min.L^{-1}$; [83]: CT de 83 $mg.min.L^{-1}$

[1;2;3;4]: número do ensaio.

O sinergismo para a *E.coli* ocorreu mais frequentemente a partir da aplicação de ozônio, se comparado ao cloro, como desinfetante primário, com até 0,60 log de inativação apenas pelo efeito sinérgico do ozônio com a radiação ultravioleta.

Para *Clostridium perfringens*, o efeito sinérgico da aplicação de CT 23 $mg.min.L^{-1}$ e 83 $mg.min.L^{-1}$ de ozônio seguido de radiação UV foi, em média, de 0,06 e 0,10 log, respectivamente. Esses resultados foram menores que os constatados na desinfecção sequencial (cloro - radiação ultravioleta).

Lourenção (2009) encontrou sinergismo para *E. coli* de até 0,44 log de inativação e para coliformes totais de até 1,19 log ao aplicar ozônio seguido de radiação UV. Medeiros (2010) relata efeitos sinérgicos, para a mesma sequência de desinfetantes, acima de 1,93 log de inativação para *Clostridium perfringens*, ambos trabalhos realizados com efluente tratado de reator UASB.

Jung et al. (2008) relatam efeito sinérgico com aplicação em sequência de ozônio e radiação UV, em média de 0,5 log de inativação para esporos de *Bacillus subtilis*. Porém, não encontraram sinergismo ao aplicarem a radiação UV anteriormente ao ozônio, concluindo que o ozônio aplicado primeiramente ataca a parede do esporo dando suporte à penetração dos raios ultravioleta, os quais conseguem atingir o DNA e RNA celular mais facilmente.

Cho et al. (2006) encontram até 1,5 log de efeito sinérgico para *Bacillus subtilis* na desinfecção sequencial: ozônio seguido de hipoclorito de sódio.

Diferentemente do hipoclorito de sódio, o ozônio foi capaz de diminuir a concentração de (oo)cistos após os ensaios individuais e sequenciais de desinfecção. Na aplicação de CT de 23 $mg.min.L^{-1}$ foram inativados em média 0,24 log (± 33) dos cistos de *Giardia*, similar à inativação de *E. coli*, coliformes totais e *Clostridium perfringens* (teste t, $p > 0,05$). Ao aumentar o CT para 83 $mg.min.L^{-1}$, foram inativados em média 1,65 log (± 0,68) dos cistos de *Giardia*, sendo também similar às três bactérias indicadoras de poluição fecal (teste t, $p > 0,05$). A adição da dose de radiação ultravioleta sequencialmente não aumentou esta inativação.

Com relação aos oocistos de *Cryptosporidium*, só foram encontrados em 31% das amostras ozonizadas (5/16), 80% deles estavam viáveis através da inferência de viabilidade com corante vital iodeto de propídeo; nas outras amostras ficaram abaixo do limite de detecção do método.

Rennecker et al. (2000) relatam 90% de inativação de oocistos de *Cryptosporidium* em ensaios individuais com CT de 2,5 mg.min.L^{-1} de ozônio; verificaram também que lotes diferentes de oocistos utilizados para inoculação em água para os ensaios mostraram diferentes resistências à ozonização. Driedger et al. (2000), citam a necessidade de CT de 1,4 mg.min.L^{-1} para atingir 1 log de inativação de *Cryptosporidium* em amostras de água.

Os cistos do protozoário patogênico *Giardia* foram avaliados quanto ao dano morfológico, através da avaliação da florescência dos cistos, e inferência de viabilidade, por meio do corante vital iodeto de propídeo, como pode ser visualizado na figura 6.19.

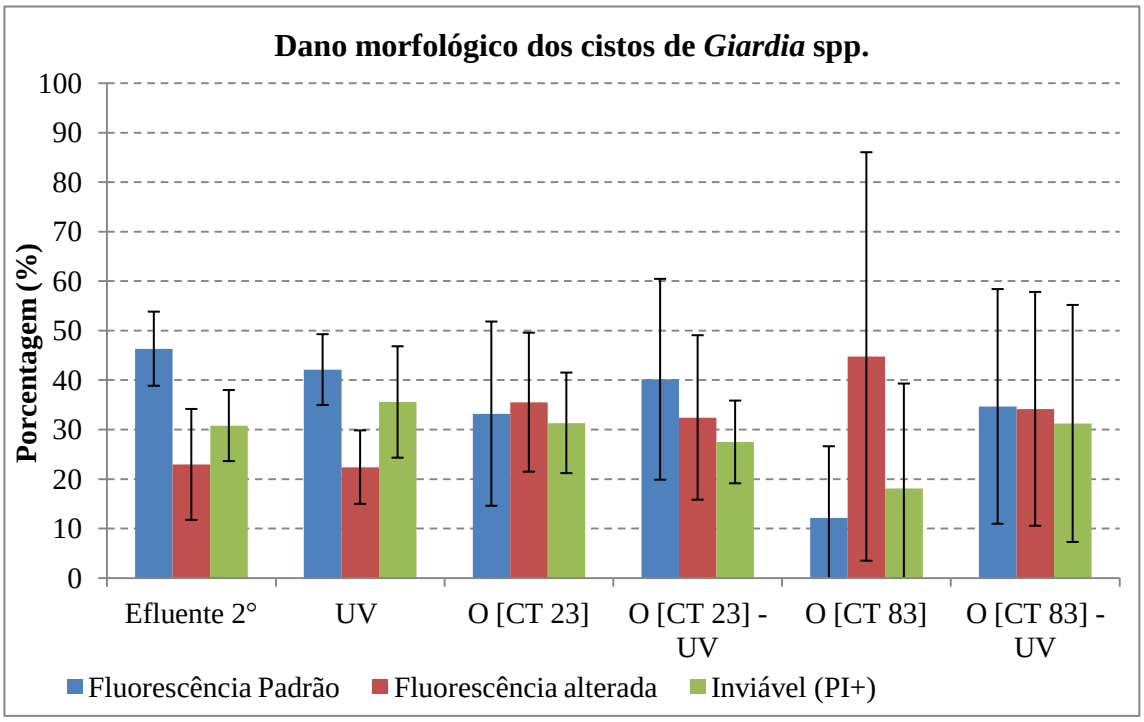


Figura 6.19 - Avaliação do dano morfológico dos cistos de *Giardia* spp. após desinfecções individuais e sequenciais com ozônio e radiação UV. As barras centrais representam o desvio padrão. CT de ozônio aplicados: 23 mg.min.L^{-1} e 83 mg.min.L^{-1}. Dose de UV de 2,5 Wh.m^{-3}.

Novamente, observam-se elevados valores de desvio padrão nos resultados, o que dificultou análises estatísticas comparativas. Mesmo assim, pode-se constatar decréscimo da porcentagem de cistos de *Giardia* com fluorescência padrão após a ozonização e consequente alteração na fluorescência, para depois torná-los inviáveis (iodeto de propídeo).

Cho et al. (2010) relatam que o ozônio, por ser oxidante forte, a sua penetração na célula é acompanhada por reações com vários componentes da parede celular, para depois agir no citoplasma.

O efeito sinérgico do ozônio e radiação UV possuem grande interesse na desinfecção de patógenos resistentes e na crescente preocupação com o tratamento de compostos desruptores endócrinos, compostos recalcitrantes que compõem produtos de higiene pessoal e farmacêuticos, na diminuição da capacidade estrogênica de efluentes municipais (White, 2010).

Finch et al. (2000) utilizaram as conjugações: O_3/ClO_2; O_3/Monocloramina; Cl_2/Monocloramina; ClO_2/Cl_2; ClO_2/Monocloramina; O_3/Cl_2 e observaram até 2 unidades logarítmicas de inativação para *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. atribuídas apenas à ação sinérgica dos desinfetantes. Verificaram também uma alta dependência em relação ao pH e à temperatura.

Rennecker et al. (2000), Driedger et al. (2000), Corona-Vasquez et al. (2002) evidenciaram efeitos sinérgicos com a aplicação de ozônio seguida de cloro livre na inativação de *Cryptosporidium* spp. com ensaios de infectividade *in vivo* e excistação *in vitro*.

Segundo Koivunen e Heinonen-Tanski (2005), a ação sinérgica pode ser explicada pelo mecanismo de danos múltiplos: dois desinfetantes diferentes podem causar diferentes tipos de lesões nos micro-organismos e, consequentemente, promover inativação mais incisiva de micro-organismos.

6.6 - CONCLUSÕES

Nos ensaios individuais de desinfecção com cloro e radiação ultravioleta pode-se constatar a seguinte ordem crescente de resistência: *E. coli* = coliformes totais < esporos de *Clostridium perfringens*. Entretanto, na desinfecção individual com ozônio, a ordem de crescente de resistência foi: *E. coli* < coliformes totais < esporos de *Clostridium perfringens*.

Esporos de *Clostridium perfringens* se mostraram bastante resistente aos ensaios de desinfecção individuais: obtiveram apenas 0,62 log e 1 log de inativação no CT mais elevado da cloração (300 $mg.min.L^{-1}$) e da ozonização (118 $mg.min.L^{-1}$), respectivamente; e na maior dose de radiação UV (10 $Wh.m^{-3}$), apenas 0,8 log.

A ozonização foi capas de melhorar a qualidade do efluente, com remoção de DQO, turbidez e absorbância em 254 nm, o que pode ajudar para a aplicação de radiação ultravioleta na desinfecção sequencial.

Na desinfecções sequenciais (cloro - radiação UV e ozônio - radiação ultravioleta), a ordem de resistência foi: *E. coli* = coliformes totais < esporos de *Clostridium perfringens*.

A desinfecção sequencial cloro seguido de radiação ultravioleta, no CT de 100 $mg.min.L^{-1}$ e dose de 10 $Wh.m^{-3}$, apresentou até 2,78 log de inativação os esporos de *Clostridium perfringens*, o que ressalta o potencial da desinfecção sequencial em inativar microrganismos resistentes.

Houve efeitos sinérgicos nas duas desinfecções sequenciais estudadas no presente trabalho, sendo possível a utilização de menores CTs de desinfetantes primários - cloro e ozônio - o que poderia resultar em menores concentrações de subprodutos da desinfecção; visto que, com a desinfecção sequencial pode-se alcançar inativação similar à utilização de apenas um desinfetante em CTs mais elevados.

Não houve diminuição da concentração de cistos de *Giardia* após as desinfecção individuais e sequenciais, na presença do cloro. Contudo, na desinfecção individual com ozônio, ocorreu diminuição da concentração de cistos de *Giardia* nos ensaios individuais com ozônio, a qual foi estatisticamente similar a das três bactérias indicadoras de poluição fecal.

Em ambas desinfecções sequenciais verificou-se diminuição da porcentagem de cistos que apresentam fluorescência padrão, que pode servir de resposta à ação dos oxidantes cloro e ozônio na parede dos cistos de *Giardia*.

Oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados em apenas algumas amostras; em outras, estiveram abaixo do limite de detecção do método utilizado para purificação, concentração e identificação destas estruturas.

Capítulo 7

Desinfecção Sequencial em ETE em escala plena - Estudo de caso da ETE Monjolinho.

Este capítulo teve o intuito de investigar a adição de cloro anteriormente à desinfecção com radiação ultravioleta na inativação de *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. e microrganismos indicadores - *E. coli*, coliformes totais e *Clostridium perfringens* - em uma ETE em escala plena.

7.1 - INTRODUÇAO

O lançamento de esgoto doméstico não tratado em mananciais superficiais é um dos maiores problemas para a Saúde Pública. A presença de cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. causa preocupação devido: à baixa dose infectante, resistentes em ambientes desfavoráveis, eliminados em grandes concentrações por indivíduos doentes e assintomáticos (ADAM, 2001; CAREY et al., 2004).

Efluentes domésticos, dependendo do processo de tratamento empregado, ainda possuem elevadas concentrações de cistos e oocistos. Em esgoto bruto, são encontrados normalmente de 10^2 a 10^5 (oo)cistos por litro (ROBERTSON et al., 2000; CANTUSIO NETO et al., 2006). Em efluentes após o tratamento secundário, como o lodos ativados, são reportadas concentrações acima de 10^2 (oo)cistos por litro (CASTRO-HERMIDA et al., 2008; MOULIN et al., 2010). Concentrações próximas, tanto de esgoto bruto quanto de efluente tratado, já foram relatadas neste trabalho em capítulos anteriores.

Como relatado no capítulo 6, o cloro é o desinfetante mais utilizado no mundo para tratamento de água de abastecimento e águas residuárias. No entanto, com a descoberta de subprodutos da cloração, a desinfecção por radiação ultravioleta se tornou mais popular (METCALF; EDDY, 2003). Ela se baseia na alteração do DNA e RNA dos micro-organismos, mostrando inúmeras vantagens, entre elas: não deixa residual no efluente tratado e sua eficácia não é afetada pelo pH ou temperatura (HIJNEN et al., 2006).

A desinfecção sequencial se constitui na aplicação de dois ou mais desinfetantes em sequência, onde a ação combinada pode promover maior inativação de micro-organismos que a soma das inativações dos mesmos desinfetantes aplicados separadamente, que é chamado sinergismo (USEPA, 1999; SOUZA, 2006).

Trabalhos sobre desinfecção sequencial para águas residuárias são ainda incipientes. Alguns estudos relatam a desinfecção sequencial como meio capaz de inativar bactérias formadoras de esporos (WANG et al., 2011, 2012) e vírus resistentes (BALLESTER et al., 2004).

7.2 - OBJETIVOS

Este capítulo teve como objetivo investigar a ocorrência de efeitos sinérgicos em microrganismos a partir da desinfecção sequencial - cloro seguido de radiação ultravioleta - presente em uma ETE em escala plena. Como objetivos específicos, seriam:

- A partir de ensaios de desinfecção em unidade de bancada, estudar a melhor dose de cloro a ser aplicada na ETE em escala plena.
- Comparar a resistência de *Giardia* spp.; *Cryptosporidium* spp. e microrganismos indicadores à desinfecção com cloro de efluente de tratamento secundário;
- Comparar a resistência de *Giardia* spp.; *Cryptosporidium* spp. e micro-organismos indicadores à desinfecção com radiação ultravioleta de efluente de tratamento secundário;
- Verificar a ocorrência de efeitos sinérgicos na desinfecção sequencial cloro - radiação ultravioleta em efluente de tratamento secundário, em ETE em escala plena.

7.3 - MATERIAL E MÉTODOS

7.3.1 - A ETE - Monjolinho

A ETE - Monjolinho trata 100% da água residuária coletada na cidade de São Carlos - SP, com vazão de entrada de aproximadamente 530 litros por segundo. Ela possui tratamento preliminar com grades, peneiras, desarenador; depois o esgoto segue para reatores anaeróbios do tipo UASB. Em seguida, o efluente é encaminhado para Flotadores de Ar Dissolvido e antes do lançamento, passa pela unidade de desinfecção por radiação ultravioleta, como pode ser visualizado na figura 7.1.

Esta última unidade é composta por 480 lâmpadas distribuídas em dois canais paralelos, sendo cada canal composto por dois módulos de lâmpadas. Essas são envolvidas por tubo de quartzo e permanecem imersas no efluente. O tempo de detenção hidráulica, quando em vazão média, é de 9,1 segundos; e, em vazão máxima, 4,0 segundos. A dose de radiação ultravioleta aplicada por volume é próxima a 10 $Wh.m^{-3}$.

Figura 7.1 - ETE Monjolinho: I - vista geral (reatores UASB); II - unidade de desinfecção por radiação ultravioleta.

Devido à concentração elevada de *E. coli* no efluente das unidades de flotação, a radiação ultravioleta não conseguia atingir a eficiência necessária para o efluente desinfetado obter qualidade microbiológica exigida pelo órgão ambiental e ser lançado no corpo receptor. Em consequência, foram realizados estudos de cloração como alternativa de desinfetante a ser utilizado previamente à desinfecção por ultravioleta.

Para a verificação da eficiência de inativação da unidade de desinfecção por radiação ultravioleta, foram coletadas amostras antes e após esta unidade, em frascos de 1 litro de capacidade, previamente lavados, desinfetados e enxaguados com solução Tween 80 (0,1%).

7.3.2 - Ensaios em bancada de desinfecção com cloro

Foram realizados ensaios de cloração do efluente proveniente das unidades de flotação, quando em vazão máxima e mínima de entrada na ETE. O efluente foi coletado em galões de 20 litros, previamente lavados, desinfetados e enxaguados com solução Tween 80 (0,1%). Os ensaios foram feitos em batelada, em unidade de bancada, no LATAR, na USP - São Carlos.

Para isso, béqueres de vidro com dois litros de capacidade, desinfetados e enxaguados com solução Tween 80 (0,1%), eram preenchidos com 1,5 litros de efluente e colocados em aparelho jar-test com ajuste de gradiente de velocidade de 100 s^{-1}.

Neste caso, foram aplicadas as seguintes concentrações de cloro: 2,5; 7,5; 15 e 30 $mg.L^{-1}$. O tempo de contato foi fixado em oito minutos, pois era o tempo necessário para o efluente percorrer desde a saída dos flotadores até a entrada na unidade de

desinfecção por radiação ultravioleta. Com isso, foram analisados os seguintes CTs: 20, 60, 120 e 240 mg.min.L^{-1}, respectivamente.

A solução de hipoclorito de sódio utilizada foi preparada no dia dos ensaios, a partir de solução estoque com concentração de 4 a 6% (Vetec Química Fina, Ltda). A análise de cloro residual total e livre foi conduzida pelo método DPD (*N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine) colorimétrico utilizando espectrofotômetro (DR 2010, Hach). No final dos testes, foi utilizada solução de metabissulfito de sódio ($Na_2S_2O_5$) a 3%, na proporção de 0,1 mL para cada 100 mL de amostra a fim de remover cloro residual livre e combinado ainda presentes.

Em decorrência dos resultados desses ensaios em bancada, foram escolhidas as melhores dosagens para aplicação na ETE - Monjolinho.

7.3.3 - Análises Físico-Químicas

As seguintes análises físico-químicas foram realizadas para caracterização e monitoramento dos ensaios de desinfecção da ETE - Monjolinho, como pode ser visualizada na tabela 7.1, as quais seguiram o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Tabela 7.1 - Métodos analíticos empregados para análises físico-químicas de efluentes da ETE.

Variável	Método e Equipamentos
Absorbância em comprimento de onda de 254nm	Espectrofotômetro DR 4000 ou DR 5000.
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	Método colorimétrico em refluxo fechado (5220 D)
pH	Método Potenciométrico. pH meter - Denver Instrument
Sólidos Totais	Método Gravimétrico (2540 B)
Sólidos Suspensos Totais	Método Gravimétrico – filtração em membrana (1,2 μm) (2540 B)
Turbidez	Turbidímetro 2100 P

7.3.4 - Exames Microbiológicos

A quantificação de coliformes totais e *E. coli* seguiu o item 3.3.4.1, já relatado no capítulo 3. No entanto, foi feita a filtração em membrana e o resultado foi lido como unidade formadora de colônia (UFC) por 100 mL.

A quantificação de colônias de *Clostridium perfringens* foi seguida de acordo com o método L5.403 (CETESB, 2004), o qual utiliza a técnica de membrana filtrante, conforme o item 3.3.4.2, já relatado no capítulo 3. O resultado foi lido como unidade formadora de colônia (UFC) por 100 mL.

Para a análise de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* foi empregado o método da filtração em membrana, como relatado no capítulo 2, no item 2.3.2.3. Além disso, foi realizada a reação de imunofluorescência direta (RID), com verificação de viabilidade pelo corante vital iodeto de propídeo, de acordo com Campbell et al. (1992).

7.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, quando as amostras foram coletadas da unidade de desinfecção por radiação UV, dois tipos de efluente com diferentes características físico-químicas e microbiológicas foram averiguados: vazão mínima de entrada e vazão máxima de entrada, como pode ser visualizado na tabela 7.2.

Tabela 7.2 - Média e desvio padrão (quatro amostras) das características físicas, químicas e microbiológicas dos dois tipos de efluentes dos flotadores da ETE - Monjolinho.

Variáveis	**Efluente de baixa vazão de entrada**	**Efluente de elevada vazão de entrada**
pH	7,18 ± 0.02	7,15 ± 0,08
Turbidez (uT)	23,5 ± 1,5	57,4 ± 10,7
Abs 254 nm	0,298 ± 0,004	0,375 ± 0,008
DQO ($mg.L^{-1}$)	106 ± 28	163 ± 78
ST ($mg.L^{-1}$)	487 ± 6,4	465 ± 96
SST ($mg.L^{-1}$)	51,2 ± 6,2	47,5 ± 28,1
Coliformes totais*	$2,5 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$
E. coli*	$5,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$
Clostridium* sp.	$9,9 \times 10^3$	$2,6 \times 10^4$
Giardia* spp.*	$9,8 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$
Cryptosporidium* spp.*	$4,7 \times 10^1$	$8,2 \times 10^1$

Nota: DQO: Demanda química de oxigênio; ST: sólidos totais; SST: sólidos suspensos totais; *Unidades formadoras de colônia (UFC) em 100 mL; **(oo)cistos por litro. Abs 254 nm: absorbância em 1,0 cm de caminho óptico; uT: unidade de turbidez.

Essas diferentes características podem ser devido a diferentes tempos de detenção hidráulica da água residuária no sistema de tratamento, o que implicou qualidades distintas para o efluente dos flotadores e que, consequentemente, seria enviado à unidade de desinfecção.

Pode-se notar maiores concentrações de (oo)cistos de protozoários e de micro-organismos indicadores no efluente de elevada vazão de entrada, ao mesmo tempo que a turbidez e absorbância 254 nm, o que pode influenciar negativamente a eficiência dos raios ultravioleta.

7.4.1 - Desinfecção com Radiação UV

Os resultados obtidos através da desinfecção com radiação ultravioleta estão nas tabelas 7.3 e 7.4.

Tabela 7.3 - Inativação de microrganismos na unidade de desinfecção por radiação UV na ETE Monjolinho (lâmpadas limpas).

Microrganismo	**Inativação [-log (N/No)]**	
	Efluente de baixa vazão de entrada	**Efluente de elevada vazão de entrada**
Coliformes totais	2,08 ± 0,15	1,51 ± 0,21
Escherichia coli	1,94 ± 0,23	1,71 ± 0,11
Clostridium perfringens	0,55 ± 0,56	0,02 ± 0,01

Nota: N: concentração de micro-organismos; No: concentração inicial de micro-organismos.

Tabela 7.4 - Inativação de microrganismos na unidade de desinfecção por radiação UV na ETE - Monjolinho (lâmpadas sujas).

Microrganismo	**Inativação [-log (N/No)]**
Coliformes totais	0.47 ± 0.08
Escherichia coli	0.22 ± 0.01
Clostridium perfringens	0.06 ± 0.01
***Giardia* spp.**	0.0
***Cryptosporidium* spp.**	0.0

Para lâmpadas limpas, os microrganismos *E. coli* e coliformes totais foram mais facilmente inativados pela radiação UV ao comparar com *Clostridium perfringens*.

Elevadas turbidez, DQO e concentração de substâncias que absorvem radiação UV promoveram diminuição na eficiência da desinfecção. Foi observada diminuição da viabilidade dos cistos de *Giardia* de 76% (± 7.0) para 55% (± 15), porém sem diferença quanto às características do afluente. Oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados no afluente à unidade de radiação UV (efluente do flotador), porém nenhum após a desinfecção, sendo difícil a discussão sobre a diminuição de sua viabilidade.

Apesar de a unidade de desinfecção por radiação UV promover redução de até duas unidades logarítmicas de coliformes totais e *E. coli*, ainda não era suficiente para alcançar a qualidade microbiológica de projeto da ETE de 10^3 UFC por 100 mL.

Deve-se salientar que falta de manutenção da unidade de desinfecção foi extremamente prejudicial com diminuição significativa do poder de inativação das lâmpadas germicidas, como constatado na tabela 7.4. Dessa maneira, idealizou-se a cloração antecedente à desinfecção UV.

7.4.2 - Desinfecção com cloro - ensaios em bancada

Os resultados dos ensaios em bancada da cloração do efluente dos flotadores estão mostrados nas tabelas 7.5 e 7.6, com baixa e alta vazão afluente à ETE, respectivamente.

Tabela 7.5 - Inativação de microrganismos com cloração de efluente quando em baixa vazão afluente à ETE - Monjolinho.

	Inativação -log (N/No)			**% (oo)cistos viáveis**	
CT	**Coliformes totais**	***E. coli***	***Clostridium perfringens***	***Giardia* spp.**	***Cryptosporidium* spp.**
20	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,05	0,26 ± 0,15	nd	nd
60	1,14 ± 0,15	1,76 ± 0,26	0,85 ± 0,14	75 ± 1,41	75
120	2,30 ± 0,08	3,10 ± 0,21	1,11 ± 0,06	71,5 ± 5,0	50
240	3,0 ± 0,08	3,91 ± 0,22	2,69 ± 0,21	57 ± 1,41	67

Nota: CT: concentração x tempo ($mg.min.L^{-1}$); N: concentração de micro-organismos; No: concentração inicial de micro-organismos; nd: não determinado.

Tabela 7.6 - Inativação de microrganismos com cloração de efluente quando em elevada vazão afluente à ETE - Monjolinho.

	Inativação -log (N/No)			**% (oo)cistos viáveis**	
CT	**Coliformes totais**	***E. coli***	***Clostridium perfringens***	***Giardia* spp.**	***Cryptosporidium* spp.**
20	0,45 ± 0,39	0,40 ± 0,50	0,09 ± 0,06	nd	nd
60	0,47 ± 0,39	0,47 ± 0,47	0,33 ± 0,04	82,5 ± 3,5	75 ± 35,4
120	1,14 ± 0,13	2,62 ± 0,81	1,46 ± 0,10	89 ± 4,2	ne
240	2,65 ± 0,11	4,38 ± 0,53	2,27 ± 0,37	83 ± 2,8	50

Nota: CT: concentração x tempo (mg.min.L^{-1}); N: concentração de micro-organismos; No: concentração inicial de micro-organismos; nd: não determinado; ne: não encontrado.

A bactéria formadora de esporo - *Clostridium perfringens* - provou ser bastante resistente à cloração em comparação às outras bactérias, resultados similares aos de Tyrrel et al. (1995). *E. coli* a foi menos resistente. A viabilidade inicial dos (oo)cistos dos protozoários foi 76% (± 7,0) e 87,5% (± 25), para *Giardia* e *Cryptosporidium*, respectivamente; os quais se mostraram muito resistentes ao analisar a viabilidade após os ensaios de cloração.

Rice et al. (1982), ao conduzir um trabalho com excistação *in vitro*, encontrou elevada resistência de cistos de *Giardia* spp. ao cloro. Para o trabalho, as características físicas e químicas como DQO, sólidos e turbidez variaram de acordo com o período de entrada de vazão de água residuária na ETE, sendo maior o consumo de cloro aplicado quando em elevada vazão de entrada. Dessa maneira, diferentes dosagens aplicadas de desinfetante foram necessárias dependendo da qualidade do efluente, para se ter a mesma porcentagem de inativação de micro-organismos.

Li et al. (2004) relataram que o cloro age primeiramente na parede do cisto resultando no aumento da permeabilidade, seguido da desintegração da membrana plasmática e de ações prejudiciais ao citoplasma, o que tornaria a célula mais vulnerável à radiação ultravioleta aplicada sequencialmente.

7.4.3 - Desinfecção Sequencial (Cloro-UV) na ETE - Monjolinho

A partir dos resultados promissores obtidos pelos ensaios de cloração em bancada, foi idealizada uma calha para distribuição de solução de hipoclorito de sódio, na saída do efluente dos flotadores, como pode ser visualizado na figura 7.2.

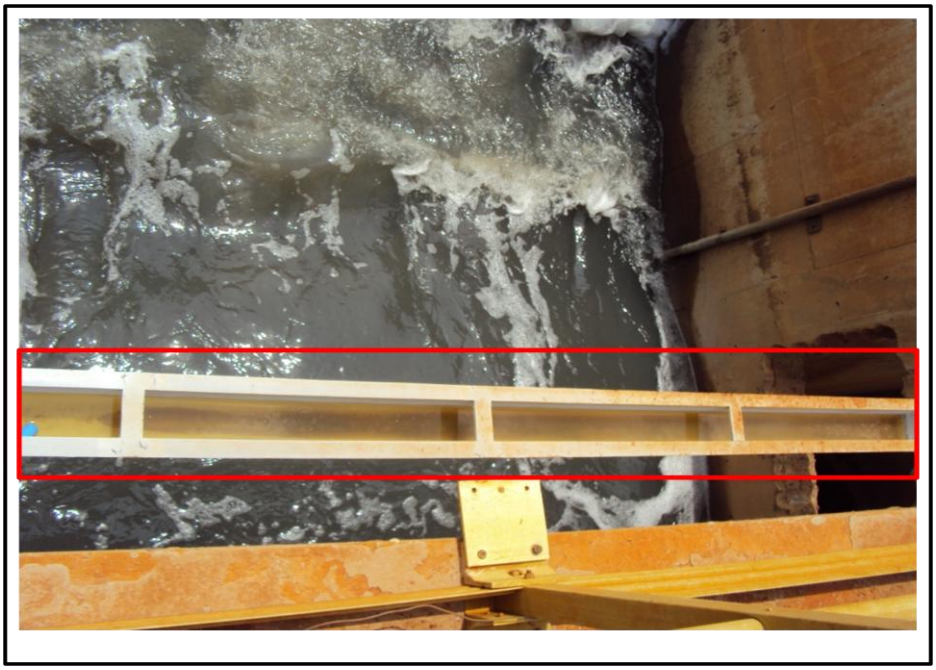


Figura 7.2 - Detalhe da calha de distribuição de solução de hipoclorito de sódio no efluente dos flotadores na ETE - Monjolinho.

Foram realizados três amostragens de desinfecção sequencial com efluente coletado no horário de menor vazão efluente, portanto de melhor qualidade físico-química. Todavia, as lâmpadas estavam sujas, devido à pobre manutenção. Assim, foram coletados efluentes em três pontos distintos: antes da cloração; após a cloração e antes da desinfecção com radiação UV; e após cloração e radiação UV (desinfecção sequencial).

Foram utilizados os resultados da tabela 7.4 para efetuar o cálculo de efeito sinérgico para desinfecção individual por UV, proposto por Finch et al. (2000):

- Sinergismo = Inativação sequencial obsevada – (∑ Inativações individuais)

Os resultados da desinfecção sequencial podem ser visualizados na figura 7.3. Para a soma das inativações individuais (Cloro + UV), foram utilizados os resultados para radiação ultravioleta relatados na tabela 7.4, com lâmpadas sujas. E para a cloração, foram os resultados encontrados no dia dos ensaios de desinfecção sequencial, ao retirar amostra de efluente já clorado mas que ainda não havia passado pela unidade de desinfecção UV.

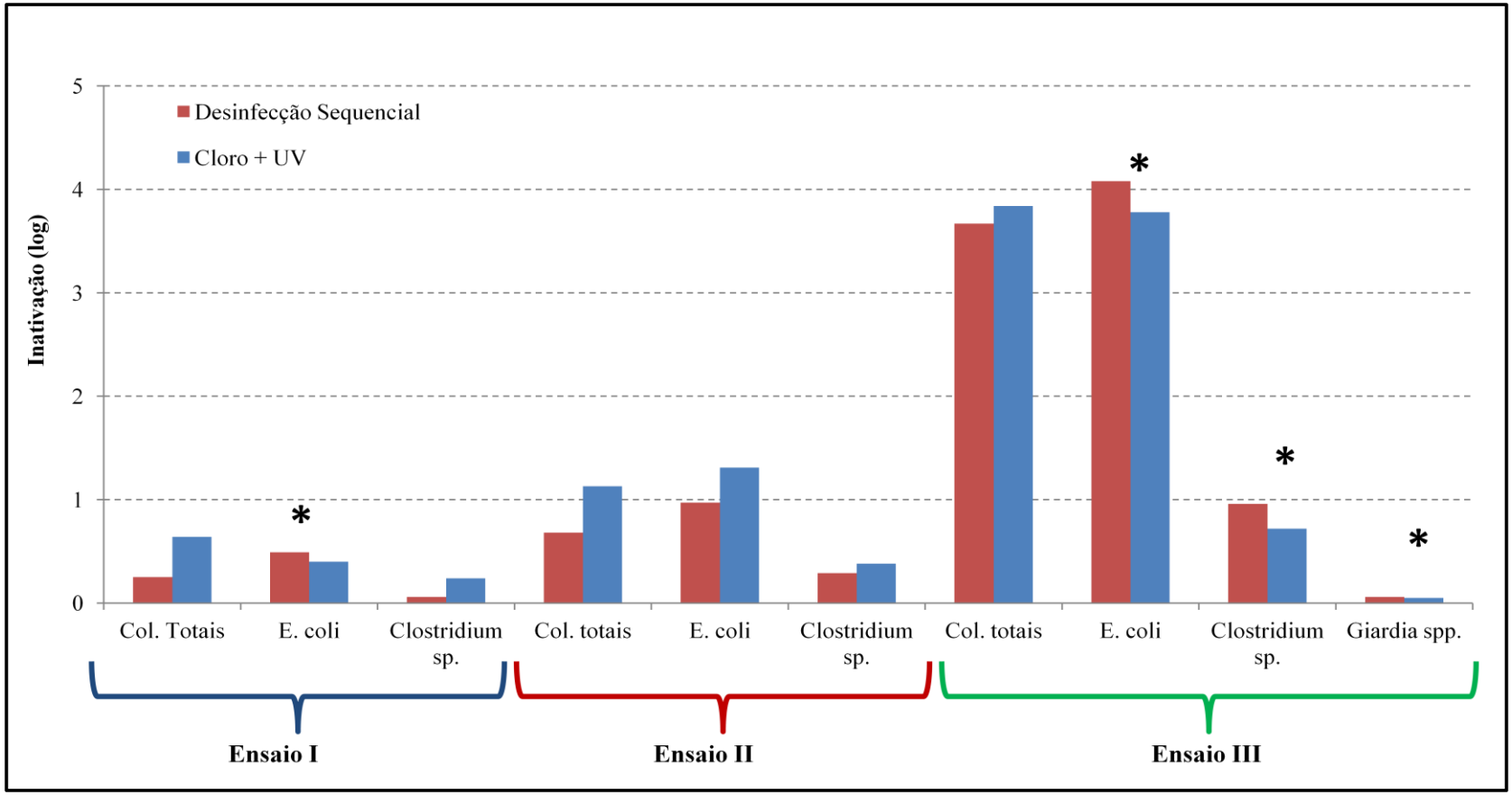


Figura 7.3 - Resultados da desinfecção sequencial (cloro - radiação ultravioleta) na ETE - Monjolinho.

Nota: Ensaio I e II- aplicação de 4,0 $mg.L^{-1}$ de cloro.

Ensaio III - aplicação de 8,0 $mg.L^{-1}$ de cloro.

(* indica a ocorrência de efeito sinérgico dos desinfetantes).

Foram encontrados efeitos sinérgicos para *E. coli*, *Clostridium perfringens* e *Giardia* spp. em dois ensaios. Após a aplicação da dosagem de 8 $mg.L^{-1}$ de cloro foi atingida a meta microbiológica de 10^3 por mL de *E. coli*.

Efeitos sinérgicos foram encontrados na desinfecção de águas residuárias para coliformes totais, *E. coli*, entre outros micro-organismos, com ácido peracético seguido de radiação ultravioleta (CARETTI; LUBELLO, 2003). Ryu et al. (2007) relatam que ETEs que utilizavam desinfecção combinada - cloro seguido de radiação UV - conseguiram atingir a meta anual de risco aceitável para infecção de *Giardia* spp. de uma infecção para cada dez mil habitantes.

7.5 - CONCLUSÃO

- Houve diferença nos resultados encontrados para cloração nos testes realizados em unidades de bancada para os testes em escala plena.
- Para o bom funcionamento da unidade de desinfecção por radiação UV, há necessidade de constante manutenção e limpeza da lâmpadas; além de efluente com boa qualidade, principalmente, baixas turbidez e concentração de sólidos suspensos.
- Foram verificados efeitos sinérgicos em alguns casos para *E. coli*, *Clostridium* sp. e *Giardia* spp. E somente após a aplicação de 8 $mg.L^{-1}$ de cloro seguido de desinfecção por radiação UV é que foi alcançada a meta inicial de qualidade microbiológica da ETE.

Capítulo 8

Conclusão

Considerando as condições em que a pesquisa foi executada, conclui-se que:

- O método que consiste de três centrifugações seguido de IFA, que pode ser aplicado em esgoto bruto e efluente tratado, apresentou elevada recuperação de cistos de *Giardia*. No entanto, foi encontrada dificuldade em recuperar oocistos de *Cryptosporidium* em todos os métodos estudados, sendo os melhores resultados provenientes do método com filtração em membrana seguido de IMS, em efluente com baixa turbidez.
- As concentrações encontradas de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* no esgoto sanitário podem mostrar de maneira indireta a incidência desses protozoários na população atendida pelas ETEs.
- O sistema de tratamento de esgoto estudado – reator UASB seguido de lodos ativados – não é suficiente para promover segurança microbiológica ao efluente final, apesar de removerem aproximadamente 90% de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*, devido à elevada concentração no esgoto bruto.
- A ETE piloto, a partir da estabilização dos reatores anaeróbio (UASB) e aeróbio (Lodos Ativados), conseguiu remover consideravelmente a carga orgânica do esgoto

bruto, porém a concentração de microrganismos no efluente tratado ainda permaneceu elevada.

- A mudança do tempo de residência celular no sistema de lodos ativos não promoveu melhoras significativas na remoção de (oo)cistos de protozoários, de microrganismos indicadores e das variáveis físicas e químicas estudadas neste trabalho.
- São imprescindíveis outras etapas de tratamento e principalmente desinfecção do efluente final, em decorrência, principalmente, da presença de (oo)cistos viáveis.
- O pós-tratamento por filtração lenta em areia mostrou a possibilidade de remover principalmente cistos de *Giardia* e, em alguns casos onde foram encontrados, oocistos de *Cryptosporidium*, bem como de *Clostridium perfringens*, microrganismos de difícil inativação por desinfecção. Além disso, melhorou a qualidade física e química do efluente advindo do lodos ativados, com remoção de DQO e especialmente da turbidez, o que também pode facilitar a desinfecção do efluente final.
- Deve-se, no entanto, refletir sobre a viabilidade de utilizar a filtração lenta como pós-tratamento, principalmente, em relação ao custo e à área necessária; podendo ser interessante alternativa, principalmente, para ETEs de pequeno porte.
- Nos processos de tratamento da ETE - piloto avaliados neste trabalho, não houve correlação de coliformes totais, *E. coli* e *Clostridium perfringens* e de variáveis físicas e químicas com cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., o que levanta ressalvas quanto à utilização dessas bactérias como microrganismos indicadores de protozoários patogênicos para amostras de esgoto sanitário, sendo, portanto, necessário o estudo de novos indicadores.
- As concentrações de (oo)cistos no esgoto da ETE - Limeira (em escala plena) foram superiores às encontradas na ETE piloto, o que pode refletir incidências da giardíase e criptosporidiose em diferentes cidades brasileiras.
- A ETE - Limeira (em escala plena) foi mais eficiente em remover esses microrganismos nos processos biológicos de tratamento (reator UASB seguido de Lodos Ativados) quando comparada à ETE - piloto. Apesar de a porcentagem viável de cistos de Giardia não se modificar durante o tratamento, foi constatada alteração de fluorescência dos cistos viáveis, o que mostra que os processos de tratamento estão causando danos morfológicos na parede de cistos e oocistos, mas ainda não tão "profundos" para deixá-los inviáveis.

- O lodo proveniente do lodos ativados, em ambas ETEs pesquisadas, apresentou elevada concentração de (oo)cistos, com grande porcentagem ainda viável, o que pode representar risco à saúde humana caso seja utilizado sem tratamento.
- Nos ensaios de desinfecção individuais com cloro, ozônio e radiação ultravioleta com efluente de tratamento secundário por Lodos Ativados, esporos de *Clostridium perfringens* se mostraram mais resistentes em comparação com *E. coli* e coliformes totais.
- Esporos de *Clostridium perfringens* se mostraram bastante resistente aos ensaios de desinfecção individuais: obtiveram apenas 0,62 log e 1 log de inativação no CT mais elevado da cloração (300 $mg.min.L^{-1}$) e da ozonização (118 $mg.min.L^{-1}$), respectivamente; e na maior dose de radiação UV (10 $Wh.m^{-3}$), apenas 0,8 log.
- A ozonização foi capas de melhorar a qualidade do efluente, com remoção de DQO, turbidez e absorbância em 254 nm, o que pode ajudar para a aplicação de radiação ultravioleta na desinfecção sequencial.
- As desinfecções sequenciais promoveram, em alguns casos, efeitos sinérgicos para os microrganismos indicadores pesquisados. Como exemplo, a desinfecção sequencial cloro seguido de radiação ultravioleta, no CT de 100 $mg.min.L^{-1}$ e dose de 10 $Wh.m^{-3}$, apresentou até 2,78 log de inativação os esporos de *Clostridium perfringens*, o que ressalta o potencial da desinfecção sequencial em inativar microrganismos resistentes.
- Ocorreu a diminuição da fluorescência nos cistos de *Giardia*, o que evidencia o potencial oxidativo do cloro e ozônio em atacar primeiramente a parede dos cistos. Além disso, a aplicação de ozônio diminuiu a concentração de cistos encontrada no efluente desinfetado. Oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados em apenas algumas amostras; em outras, estiveram abaixo do limite de detecção do método utilizado para purificação, concentração e identificação destas estruturas.
- Houve efeitos sinérgicos nas duas desinfecções sequenciais estudadas no presente trabalho, sendo possível a utilização de menores CTs de desinfetantes primários - cloro e ozônio - o que poderia resultar em menores concentrações de subprodutos da desinfecção; visto que, com a desinfecção sequencial pode-se alcançar inativação similar à utilização de apenas um desinfetante em CTs mais elevados.
- Os estudos preliminares de desinfecção com cloro com efluente secundário da ETE em escala real constataram a resistência dos esporos de *Clostridium perfringens* e de (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium.* A eficiência da desinfecção por radiação

ultravioleta foi dependente da qualidade do efluente, e houve efeitos sinérgicos na desinfecção sequencial cloro - radiação ultravioleta para *E. coli*, *Clostridium perfringens* e *Giardia* spp.

Capítulo 9

Sugestões

- Expandir a pesquisa sobre os protozoários - *Giardia* e *Cryptosporidium* - em mananciais, esgoto sanitário, água tratada, etc., para outras regiões do país.
- Aprimorar os métodos de recuperação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de esgoto sanitário.
- Pesquisar sobre a remoção de (oo)cistos de protozoários em ETEs, pois ainda são escassos estes tipos de dados de monitoramento no Brasil.
- Aprimorar a pesquisa da filtração lenta em areia para esgoto sanitário a partir de diferentes granulometrias da areia, por exemplo.
- Pesquisar quais as espécies de *Giardia* e *Cryptosporidium* que são encontradas em efluentes de ETEs.
- Estudar outros processos de desinfecção como: processos oxidativos avançados, peróxido de hidrogênio, o ácido peracético, ultrassom, aplicados individual e sequencialmente.
- Analisar a desinfecção de (oo)cistos a partir da excistação *in vitro* ou infectividade *in vivo* e comparar com danos morfológicos como a perda de fluorescência em (oo)cistos.

Referências Bibliográficas

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Resíduos Sólidos - Classificação - NBR 10.004**. Rio de Janeiro: ABNT. 2004.

ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical microbiology Reviews**. Vol.14 (3), p. 447–475, 2001.

AJONINA, C. et al. Occurrence of *Cryptosporidium* in wastewater treatment plant in north Germany. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A.** vol. 75, p. 1351-1358. 2012.

ALMEIDA, T. T. C. **Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: *Cryptosporiidae*) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase)**.130p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2004.

ALVES, D. P**. Infecção pelo *Cryptosporidium* sp. linhagem humana MMC, em camundongos C.B-17/Uni *scid*, C57BL/6/Uni *bg*, C3H/Uni *nu* e C57BL/6 KO para INF-γ**. 126p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2004.

AMORIM, R. M. R. **Cinética da eliminação de cistos e resposta imune humoral sistêmica e secretora intestinal em gerbils (*Meriones unguiculatus*) infectados experimentalmente com *Giardia duodenalis***. 92p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG. 2008.

ANDRADE, R. C. **Aplicação de dióxido de cloro no tratamento de água para consumo humano: desinfecção para controle de oocistos de *Cryptosporidium* sp., formação de subprodutos e manutenção de residuais desinfetantes em sistemas de**

distribuição. 114p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. 2010.

ANDRAUS, S. et al. **Agentes patogênicos: bactérias entéricas. Reciclagem de Biossólidos - transformando problemas em soluções**. SANEPAR, Curitiba, Finep, 288 p. 1999.

ANDREOLI, C. V. et al. A wastewater sludge management: a brazilian approach. In: **UN - HABITAT. Global Atlas of excreta, wastewater sludge, and biosolids management: moving forward the sustanable and welcome uses of a global resource.** NU - HABITAT and Greater Moncton Sewerage Commission. p. 131 - 147. 2008.

ANDREOLI, C. V.; VON SPERLING, M.; FERNANDES, F. **Lodo de esgotos: tratamento e disposição final.** v.6. Belo Horizonte. UFMG/SANEPAR. 2001.

ANTUNES, A. C. **Influência da qualidade da água destinada ao consumo humano na incidência de parasitas e no estado nutricional de criança com idade entre 03 e 06 anos no distrito de Santa Rita do Ouro Preto, Ouro Preto, MG**. 147p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto – MG. 2004.

APHA, WEF, AWWA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21 st Edition. 2005.

ARAÚJO, M. T. F. **Aleitamento e infecções por parasitas intestinais em gestantes adolescentes e seus filhos.** 76 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande no Norte. Natal - RN. 2009.

ARAÚJO, N. S. **Avaliação da influência de diferentes inóculos do isolado humano (Portland – I) de *Giardia duodenalis* sobre a cinética da infecção e no desenvolvimento de alterações patológicas no intestino delgado de gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentalmente infectados.** 40p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG. 2006.

ARAÚJO, R. S. **Genotipagem de *Cryptosporidium* spp. provenientes de amostras de águas superficiais e recreacionais como fonte de informação da dispersão de espécies no ambiente.** 120p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2008.

ASHBOLT, N.J.; GRABOW, W.O.K.; SNOZZI, M. Indicators of microbial water quality. In: **Water Quality: Guidelines, Standards and Health**. Edited by Lorna Fewtrell and Jamie Bartram. World Health Organization. IWA Publishing. p. 289-316. 2001.

AYYILDIZ, O.; SANIK, S.; ILERI, B. Effect of ultrasonic pretreatment on chlorine dioxide disinfection efficiency. **Ultrasonic Sonochemistry**. vol. 18, p. 683-688. 2011.

BAAWAIN, M. S. Impinging-jet ozone bubble column reactors. In: **Wastewater Treatment: Advanced Processes and Technologies.** Edited by Rao et al. p.107 - 136. 2013.

BACHUR, T. P. R. **Parasitoses intestinais em portadores de HIV/AIDS nas eras pré e pós-terapia anti-retroviral potente**. 158p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – CE. 2007.

BALASSIANO, B. C. C. **Fatores associados à infecção natural de cães por parasitos gastrointestinais.** 61p. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – RJ. 2007.

BASTOS, R. K. X.; BEVILACQUA, P. D.; KELLER, R. Organismos Patogênicos e Efeitos sobre a Saúde Humana. In: **Desinfecção de Efluentes Sanitários**. PROSAB 3. Ricardo Franci Gonçalves (coord.), p. 27-88. 2003.

BASTOS, R. K. X. et al. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts dynamics in Southeast Brazil - Occurance in surface water and removal in water treatment processes. **Water Science and Technology**. Vol. 14, n.2, p.15-22. 2004.

BASTOS, R. K. X.; BEVILACQUA, P. D.; MARA, D. D. Análise crítico-comparativa das regulamentações brasileira, estadunidense e britânica de qualidade microbiológica de biossólidos para uso agrícola. **Revista DAE**, vol. 191, janeiro-abril, p.10-20. 2013.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2004 - 2010. **Water Research**. vol. 25, p. 6603-6614. 2011.

BALLESTER, N. A.; MALLEY, J. P.; HIGH, L. Sequential Disinfection of adenovirus type 2 with UV-Chlorine-Chloramine. **Journal of American Water Works Association.** vol. 96 (10), p. 97-103. 2004.

BARROS JÚNIOR, A. L. **Avaliação da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de água superficial e da interface sedimento-água do Rio Capivari, na cidade de Campinas, São Paulo, Brasil.** 97p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas - SP. 2011.

BATISTA, F. S. **Avaliação do perfil enteroparasitológico, nutricional e odontológico de indivíduos de uma comunidade do município de Porto Velho - RO.** 82p. Dissertação (Mestrado). Universidade de Taubaté. Taubaté - SP. 2008.

BAUER, R. et al. Removal of bacterial fecal indicators, coliphages and enteric adenoviruses from waters with high fecal pollution by slow sand filtration. **Water Research.** vol. 45, p.439-452. 2011.

BECK, C. **Infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*Canis familiaris*) determinada através do método de Faust e cols. (1939) e da técnica de coloração da auramina, no município de Canoas, RS, Brasil**. 54p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS. 2003.

BEDNER, M.; MACCREHAN, W. A.; HELZ, G. R. Production of macromolecular chloramines by chlorine - transfer reactions. **Environmental Science and Technology.** vol. 38, p. 1753-1758. 2004.

BELLOTO, M. V. T. **Enteroparasitoses em escolares atendidos na rede pública de ensino do município de Mirassol, Noroeste Paulista.** 64p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP. 2010.

BELOSEVIC, M. et al. Studies on the resistence/reactivation of *Giardia muris* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts exposed to medium-pressure ultraviolet radiation. **FEMS Microbiology Letters**. Vol. 204, p. 197-203. 2001.

BEN AYED, L. et al. Presence of parasitic protozoa and helminth in sewage and efficiency of sewage treatment in Tunisia. **Parasitology Research**. vol. 105, p. 393 - 406. 2009.

BERINO, E. **Ocorrência e detecção de *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp. em águas brutas de abastecimento de formadores do Lago Guaíba.** 154p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS. 2004.

BERNE, A. C. **Prevalência de enteroparasitoses na população atendida em uma creche pública do Rio Grande, RS, e comparação de métodos de diagnósticos para giardíase.** 75p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS. 2007.

BETANCOURT, W. Q.; ROSE, J. B. Drinking water treatment process for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Veterinary Parasitology**. Vol. 126, p.219-234. 2004.

BDTD. **Biblioteca Digital de Teses e Dissertações**. Acesso em 12 de junho de 2013. Disponível em: <http://bdtd.ibict.br/>. 2013.

BISWAS, K. et al. Synergistic inactivation of *Cryptosporidium parvum* using ozone followed by free chlorine in natural water. **Water Research**. vol. 37, p. 4737-4747. 2003.

BITTON, G. **Wastewater Microbiology**. 4th Ed.Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. New Jersey, USA. 2011.

BONATTI, T. R. **Ocorrência de cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Cryptosporidium* spp. e ovos da família *Ascarididae* em amostras de lodo de esgoto.** 157p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2007.

BONATTI, T. R.; FRANCO, R. M. B.; CANTUSIO NETO, R. Comparison of two methodologies for detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in activated sludge samples from a sewage treatment plant in the city of Campinas, São Paulo State, Brazil. **Journal of Water Health.** vol. 5(4), p.609-614. 2007.

BORGES, J. C. G. ***Cryptosporidium* spp. (Tyzzer, 1907) em peixes-boi marinhos (*Trichechus manatus*) (Linnaeus, 1758) e peixes-boi amazônicos (*Trichechus inunguis*) (Natterer, 1883) no Brasil.** 121p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife – PE. 2007.

BRANCO, N. **Avaliação da presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas minerais naturais de nascentes e enteroparasitose em duas comunidades rurais da cidade de Campos do Jordão, SP, Brasil.** 99p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2006.

BRITTO, M. H. S. S. **Manutenção em linhagens de camundongos e infecção *in vitro* de uma cepa de *Cryptosporidium* sp. de origem humana.** 119p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2007.

BUENO, R. C. R. Biossólido - Processo de redução adicional de patógenos com a utilização de energia solar. 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. **In: Anais... Trabalhos Técnicos**. ABES. p. 1 - 53. 2001.

BUKHARI, Z.; ABRAMS, F.; LE CHEVALLIER, M. Using ultraviolet light for disinfection of finished water. **Water Science and Technology**. Vol.50 (1), p.173-178. 2004.

BUSATTI, H. G. N. O. **Investigação "*in vitro*" do potencial giardicida de quatro análogos do metronidazol.** 63p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. 2006.

CAMPBELL, A. T.; WALLIS, P. The effect of UV irradiation on human-derived *Giardia lamblia* cysts. **Water Research**. Vol.36, p.963-969. 2002.

CANTUSIO NETO, R. **Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes ponto do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil.** 89p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2004.

CANTUSIO NETO, R. **Estudo de métodos: floculação em carbonato de cálcio e adaptação das técnicas de filtração em membrana e separação imunomagnética para detecção de *Cryptosporidium* e de *Giardia* em amostras hídricas.** 130p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2008.

CANTUSIO NETO, R.; SANTOS, L. U.; FRANCO, R. M. B. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. **Water Science and Technology**. Vol.53, n.3, p.89-94. 2006.

CARDOSO, L. V. **Estudo retrospectivo de enteroparasitoses em indivíduos com HIV - 1/ AIDS na era HAART em Hospital Escola de Nível Quaternário.** 102 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. São José do Rio Preto - SP. 2011.

CARDOSO, L. S.; CARLI, G. A.; DE LUCA, S. J. *Cryptosporidium* e *Giardia* em efluentes biologicamente tratados e desinfetados. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. Vol. 8, n.4, p.285-290. 2003.

CARELI, R. T. **Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. na cadeia produtiva de alface (*Lactuca sativa L.*), sua captura e retenção por biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* e seu controle por surfactantes.** 154p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 2009.

CARETTI, C.; LUBELLO, C. Wastewater disinfection with PAA and UV combined treatment: a pilot plant study. **Water Research**. Vol. 37, p.2365-2371. 2003.

CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research.** vol. 38, 818-862. 2004.

CARRARO, E. et al. Impact of a wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occuring in a surface water. **Water Science Technology**. vol. 41 (7), p. 31-37. 2000.

CARVALHO, G. L. X. **Prevalência de enteroparasitas em crianças de 0 a 12 anos e condições sanitárias na Terra Indígena Xakriabá, São João das Missões, Minas Gerais, 2007.** 113 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto - MG. 2011.

CASTRO-HERMIDA, J. A. et al. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river áreas with *Cryptosporidium* spp. *and Giardia duodenalis*. **Water Research.** vol. 42, p. 3528-3538. 2008.

CASTRO-HERMIDA, J. A. et al. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. **Water Research**. vol. 44, p. 5887-5896. 2010.

CERQUEIRA, D. A. **Remoção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* e de indicadores no tratamento de água por ciclo completo, filtração direta descendente e dupla filtração, em escala piloto.** 214p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. 2008.

CÉSAR, M. L. V. S. **Doença Diarreica Aguada: aspectos epidemiológicos e vigilância no município de Avaré, interior do Estado de São Paulo.** 82p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2006.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Norma P4.230: Aplicação de lodos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas - Critérios para projeto e operação**. São Paulo, 32 p. 1999.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Método de ensaio L5.403**. ***Clostridium perfringens* – Determinação em amostras de água pela técnica de membrana filtrante (método de ensaio)**. 23p. 2004.

CHAGAS. **Estudo de patógenos e metais em lodo digerido bruto e higienizado para fins agrícolas, das estações de tratamento da Ilha do Governador e da Penha no estado do Rio de Janeiro.** 89 p. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. 2000.

CHAURET, C.; SPRINGTHROPE, S.; SATTA, S.. Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. **Canadian Journal of Microbiology.** vol. 45, p. 257 -262. 1999.

CHÁVEZ, A. et al. The removal of microorganisms and organic micropollutants from wastewater during infiltration to aquifers after irrigation of farmland in the Tula Valley, Mexico. **Environmental Pollution**. vol. 159, p. 1354-1362. 2011.

CHENG, H. W. et al. Fate of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts during secondary wastewater treatments. **Parasitology Research**. vol. 105, p. 689-696. 2009.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias.** vol.5. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 246 p. 1997.

CHERNICHARO, C. A. L. et al. Introdução. In: **Pós-Tratamento de Efluentes de Reatores Anaeróbios.** PROSAB 2. Carlos Augusto Lemos Chernicharo (coord.). p.19-34. 2001.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias.** vol.5. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 2ª ed. 379 p. 2007.

CHICK, H. An investigation of the laws of disinfection. **Journal of Hygiene**, vol. 8, p. 92 - 158. 1908.

CHO, M.; KIM, J. H.; YOON, J. Investigating synergism during sequential inactivation of *Bacillus subtillis* spores with several disinfectants. **Water Research**. Vol.40, p.2911-2920. 2006.

CHO, M. et al. Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. **Water Research.** vol. 44, p. 3410-3418. 2010.

CHONG, S. et al. The performance enhancements of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for domestic sludge treatment - A state-of-the-art review. **Water Research**. vol. 46 (11). p. 3434-3470. 2012.

COL, E. B. **Parasitos de camundongos de laboratório: uma abordagem informatizada com animações gráficas.** 89p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2003.

CORONA-VASQUEZ, B. et al. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine. **Water Research**. Vol.36, p. 4053-4063. 2002.

COSTA, C. F. S. **Identificação de patógenos humanos nas águas que margeiam a cidade de Rio Grande/RS: proposta de vigilância e monitoramento para os agravos relacionados.** 112p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande – RS. 2006.

COSTA, E. A. **Avaliação microbiológica e parasitológica nos processos de higienização de alfaces (*Lactuca sativa* L.) de diferentes cultivos**. 114 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza - CE. 2011.

CREBELLI, R. et al. Genotoxicity of the disinfection by-products resulting from peracetic acid or hypochlorite disinfected sewage wastewater. **Water Research.** vol. 39, p. 1105-1113. 2005.

DANIEL, L. A.; CAMPOS, J. R. Metodologia simplificada para determinação de parâmetros cinéticos de desinfecção com radiação ultravioleta. Seminário Internacional de Desinfecção de Águas de Abastecimento e Residuárias em Países em Desenvolvimento. **In: Anais do Seminário Internacional de Desinfecção de Águas de Abastecimento e Residuárias em Países em Desenvolvimento**. Belo Horizonte. ABES, Seção Minas Gerais. p. 232 - 245. 1993.

DANIEL, L. A. (Coord.). **Processos de Desinfecção e Desinfetantes Alternativos na Produção de Água Potável**. PROSAB. 1. ed. São Carlos, 139p. 2001.

DEBORDE, M.; VON GUNTEN, U. Reaction of chlorine with organic and inorganic compounds during water treatment – Kinetics and mechanisms: A critical review. **Water Research**. Vol. 42, p. 13-51. 2008.

DIAPER, E. W. J. Disinfection of water and wastewater using ozone. In: **Disinfection Water and Wastewater**. J. Donald Johnson. By American Arbor Science Publishers. Inc. p.211-231. 1975.

DIAS, D. G. **Prevalência estacional de enteroparasitoses em uma população de zero a quatorze anos do bairro COHAB Tablada, Pelotas – RS.** 54p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS. 2005.

DIAS, G. M. F. **Qualidade microbiológica da água da bacia do Ribeirão São Bartolomeu, Viçosa – MG: análise epidemiológica, ambiental e espacial.** 136p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 2007.

DIAS, G. M. F. **Avaliação quantitativa de risco microbiológico como subsídio para a formação de diretrizes de qualidade microbiológica de águas residuárias para irrigação de forrageiras: estudo da sanidade animal.** 274 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa - MG. 2012.

DRIEDGER, A. M.; RENNECKER, J. L.; MARINAS, B.J. Sequential inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine. **Water Research.** Vol.34 (14), p.3591-3597. 2000.

EDZWALD, J. K.; KELLEY, M.B. Control of *Cryptosporidium*: from reservoirs to clarifiers to filters. **Water Science and Technology**. Vol. 37 (2), p.1-8. 1998.

ELLIS, K.V. Slow sand filtration as a technique for the tertiary treatment of municipal sewages. **Water Research**, 21 (4), 403-410. 1987.

FAGNANI, R. A. G. **Avaliação de dano morfológico em oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. pela ação de peroxidação assistida por luz ultravioleta (H_2O_2/UV).** 130 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas - SP. 2010.

FAGUNDES, A. P. **Remoção de oocistos de *Cryptosporidium* por filtração direta – influência de alguns aspectos operacionais**. 143p. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília. Brasília – DF. 2006.

FAGUNDES, T. F. **Ocorrência e Sazonalidade de Parasitos Gastrointestinais em avestruzes (*Struthio camelus*) de três faixas etárias em uma criação no município de Areal/RJ.** 33p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – RJ. 2009.

FALCHI, R. L. R. **Contaminação por protozoários potencialmente patogênicos ao homem na água de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS**. 90p. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS. 2007.

FARIA, A. L. **Condições ambientais e características de potabilidade da água de bicas de uso público da cidade de Taubaté – SP**. 87p. Dissertação (Mestrado). Universidade de Taubaté. Taubaté – SP. 2006.

FARIAS, E. W. C. **Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e *Salmonella* spp. em amostras de águas de esgoto e águas de córrego da cidade de São Paulo.** 80p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2000.

FARIAS, E. W. C.; GAMBA, R. C.; PELLIZARI, V. H. Detection of *Cryptosporidium spp*. oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. Vol.33, p. 41-43. 2002.

FAUST, E. C. et al. Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoan and helminthes in feces. **Journal of Parasitology**, Winston-Salem, vol. 25, p.241-262. 1939.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**. vol. 124, p. 90-97. 2010.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Review**. vol. 24 (1), p. 110 - 140. 2011.

FERGUSON, C.; ALTAVILLA, N.; ASHBOLT, N.J.; DEERE, D.A. Prioritizing watershed pathogen research. **Journal of American Water Works Association.** Vol. 95, n.2, p.92-102. 2003.

FERNANDES, L. N. **Caracterização molecular de isolados de *Giardia* de amostras de água e de esgoto provenientes do Estado de São Paulo**. 106p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2009.

FERNANDES, N. M. G. **Influência do pH de coagulação e dosagem de sulfato de alumínio na remoção de oocistos de por filtração direta descendente**. 144p. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília. Brasília – DF. 2007.

FERREIRA, G. R. **Diagnóstico parasitológico e avaliação de uma intervenção educativa no controle e prevenção de enteroparasitoses no município de Estiva Gerbi – SP.** 70p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2004.

FERREIRA, M. G. **Prevalência dos principais enteropatógenos em bezerras da fase de aleitamento em explorações leiteiras semi-intensivas de duas bacias leiteiras do Estado de Minas Gerais**. 79p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. 2009.

FIGUEIREDO, M. A. S. **Prevalência das enteroparasitoses em pacientes HIV – positivos atendidos no centro de saúde do município de Caruaru – PE – 2007.** 74p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife – PE. 2007.

FINCH, G. R. et al. Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 59 (11), p.3674-3680. 1993.

FINCH, G. R. et al. **Synergistic Effects of Multiple Disinfectants**. AWWA Research Foundation and American Water Works Association. 50 p. 2000.

FONSECA, J. E. **Implantação de cisternas para armazenamento de água de chuva e seus impactos na saúde infantil: um estudo de coorte em Berilo e Chapada do Norte, Minas Gerais.** 263p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte - MG. 2012.

FRANÇA, R. B. ***Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e ovos de helmintos em esgoto hospitalar: destruição e análise de dano estrutural dos protozoários após o processo fotoeletroquímico.** 160p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2007.

FRANCO, R. M. B. **Infecções parasitárias em creches: estudo em uma área urbana, com ênfase em *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis*.** 105p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 1996.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical São Paulo**. vol. 43(2), p.109-111. 2001.

FRANCY, D. S. et al. Comparative effectiveness of membrane bioreactors, conventional secondary treatment, and chlorine and UV disinfection to remove microorganisms from municipal wastewaters. **Water Research**. vol. 46, p. 4164-4178. 2012.

FREITAS, A. G. **Recirculação de água de lavagem de filtros em escala piloto: uma contribuição para avaliação de perigos associados à presença de protozoários**. 105 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 2007

FU, C. Y. et al. Monitoring and evaluation of removal of pathogens at municipal wastewater treatment plants. **Water Science Technology**. vol. 61, p. 1589-1599. 2010.

FUNADA, M. R. **Avaliação de métodos de extração de DNA de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais e comparação da *nested* PCR com o métodos coproparasitológico de centrifugo-flutuação em sacarose.** 76p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2009.

FURTADO, M. M. **Estudo epidemiológico de patógenos circulantes nas populações de onça-pintada e animais domésticos em áreas preservadas de três biomas brasileiros: Cerrado, Pantanal e Amazônia**. 282 p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo - SP. 2010.

GALLAS-LINDEMANN, C. et al. Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater and the surface, drinking and ground water in the Lower Rhine, Germany. **Epidemiology and Infection**. vol. 141, p. 9-21. 2013.

GARCIA, M. T**. Alimentação complementar e estado nutricional de crianças menores de dois anos em Acrelândia, Acre, Amazônia Ocidental Brasileira.** 127p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2009.

GARCIA, A. M. **Frequência do *Cryptosporidium* sp. (Tyzzer, 1907) em bezerros lactentes na bacia leiteira de Pará de Minas, MG, 1991**. 80p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte - MG. 1993.

GEHR, R. et al. Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatmen of municipal wastewater. **Water Research.** vol. 37, p.4573-4586. 2003.

GEORGE, I.; CROP, P.; SERVAIS, P. Fecal coliform removal in wastewater treatment plants studied by plate counts and enzymatic methods. **Water Research**. vol. 36, p. 2607-2617. 2002.

GERBA, C.P. et al. Sources of microbial pathogens in municipal solid waste landfills in the United States of America. **Waste Managment and Research**. vol. 29(8), p. 781-790. 2011.

GIROTTO, K. G. **Prevalência e fatores de risco para infecção por protozoários intestinais em idosos residentes em Instituições de Longa Permanência no Sudeste Brasileiro.** 136p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG. 2011.

GOMES, R. S. **Infecção natural por *Cryptosporidium* sp. em aves domésticas comercializadas em mercados municipais no Rio de Janeiro.** 43p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – RJ. 2006.

GONÇALVES, R. F.; JORDÃO, E. P.; SOBRINHO, P. A. Introdução. In: **Desinfecção de Efluentes Sanitários**. PROSAB 3. Ricardo Franci Gonçalves (coord), p.1-26. 2003a

GONÇALVES, E. M. N. **Incidência de enteroparasitas com caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. em diferentes comunidade brasileiras**. 183p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2007.

GONÇALVES, A. C. M. **Estudo de caso-controle sobre a etiologia da diarréia infecciosa em uma população soropositiva para o HIV do Noroeste paulista**. 93p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. São José do Rio Preto – SP. 2008a.

GONÇALVES, L. R. **Freqüência de endoparasitos e considerações sobre as espécies do gênero *Eimeria* Shneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) em suínos do município de Rio Claro, microrregião do Vale do Paraíba, Sul Fluminense, Estado do Rio de Janeiro.** 72 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – RJ. 2008b.

GRACZYK, T. K. et al. Human enteropathogen load in activated sewage sludge and corresponding sewage sludge end products. **Applied Environmental Microbiology**. vol. 73(6), 2013-2015. 2007.

GRACZYK, T. K. et al. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in sewage sludge and solid waste landfill leachate and quantitative comparative analysis of

sanitization treatments on pathogen inactivation. **Environmental Research**. vol.106, 27-33. 2008.

GUILHERME, M. S. **Análise do lodo de esgoto: seleção de métodos de recuperação de (oo)cistos de protozoários patogênicos**. 76 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 1998.

GURGEL, A. C. F. **Ocorrência de protozoários intestinais em chinchilas (*Chinchilla lanígera*) e capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), criadas em cativeiro, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.** 77 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS. 2005.

HAAS, C. N.; HELLER, B. Kinetics of inactivation of *Giardia lamblia* by free chlorine. **Water Research**. Vol. 24 (2), p.233-238. 1990.

HACHICH, E. M. et al. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source water of São Paulo State, Brazil. **Water Science and Technology.** Vol. 50, nº 1, p.239-245. 2004.

HARAMOTO, E. et al. Occurrence of viruses and protozoa in drinking water sources of Japan and their relationship to indicator microorganisms. **Food Environmental Virology.** vol. 4, p.93-101. 2012.

HASHIMOTO, A.; Kunikane, S.; Hirata, T. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the drinking water supply in Japan. **Water Research.** Vol. 36, p.519–526. 2002.

HASSEN, A. et al. Inactivation of indicator bacteria in wastewater by chlorine – a kinetics study. **Bioresource Technology**. v. 72, p. 85-93. 2000.

HELLER, L.; PÁDUA, V. L. (organizadores) **Abastecimento de água para consumo humano.** Editora UFMG. Belo Horizonte – MG. 859 p. 2006.

HELLER, L. et al. Association between the concentration of protozoa and surrogates in effluents of the slow sand filtration for water treatment. **Brazilian Journal of Microbiology.** Vol. 38, p.337-345. 2007.

HIJNEN, W. A. M.; BEERENDONK, E. F.; MEDEMA, G. J. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. **Water Research.** Vol.40, p. 3-22. 2006.

HINKE, T. Z. **Perfil nosológico da população ribeirinha do Baixo Rio Machado em Rondônia – Amazônia Ocidental – Brasil.** 150p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2009.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. Puerto Rico. **Journal of Public Health**, Oxford, v.9, p.281-298. 1934.

HU, J.; FENG, Y.; ONG, S.L.; NG, W.J.; SONG, L.; TAN, X.; CHU, X. Improvement of recoveries for the determination of protozoa *Cryptosporidium* and *Giardia* in water using method 1623. **Journal of Microbiology Methods**. vol.58, p.321-325. 2004.

HUBER, F. **Caracterização genotípica e estudo filogenético de *Cryptosporidium* spp. obtidos de diferentes hospedeiros**. 60p. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2007.

IACOVSKI, R.B.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Detection and Enumeration of *Cryptosporidium* sp. oocysts in sewage sludge samples from the city of Florianópolis (Brazil) by using Immunomagnetic Separation combined with Indirect Immunofluorescence Assay. **Waste Management and Research**, 22, 171- 176. 2004.

IASBIK, A. F. **Enteroparasitas em humanos e cisticercose em suínos da área rural de Viçosa – MG**. 61p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Atlas de Saneamento**. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão / Ministério das Cidades. Rio de Janeiro. 2011.

INSTRUÇÃO NORMATIVA nº 25 de julho. **Aprova Normas sobre as especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos fertilizantes orgânicos simples, mistos, compostos, organominerais e biofertilizantes destinados à agricultura.** Secretaria de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009.

JENKINS, M.W.; TIWARI, S.K.; DARBY, J. Bacterial, viral and turbidity removal by intermittent slow sand filtration for household use in developing countries: Experimental investigation and modeling. **Water Research**, 25, 6227-6239. 2011.

JEX, A. R.; SMITH, H. V.; MONIS, P. T.; CAMPBELL, B. E.; GASSER, R. B. *Cryptosporidium* - Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances.** vol. 26, p. 304-317. 2008.

JIN, X. et al. Synergistic effect of ultrasonic pre-treatment combined with UV irradiation for secondary effluent disinfection. **Ultrasonics Sonochemistry**. vol. 20, p. 1384 - 1389. 2013.

JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. 4ª ed. Rio de Janeiro, p.932. 2005.

JUNG, Y. J.; OH, B. S.; KANG, J.W. Synergistic effect of sequential or combined use of ozone and UV radiation for the disinfection of *Bacillus subtilis* spores. **Water Research**. vol. 42, p. 1613-1621. 2008.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreak and lessons learnt. **Journal Water Health**. vol. 5(1), p.1-38. 2007.

KEENAN, J. D.; HEGEMANN, D. A. Chlorination and Ozonation in water and wastewater treatment. **Chemosphere**. n° 1, p. 9-28. 1978.

KHOUJA, L. B. A.; CAMA, V.; XIAO, L. Parasitic contamination in wastewater and sludge samples in Tunisia using three diffent detection techniques. **Parasitology Research**. vol. 107, p. 109 - 116. 2010.

KISTEMANN, T. et al. A comparison of efficiencies of microbiological pollution removal in six sewage treatment plants with different treatment systems. International **Journal of Hygiene and Environmental Health**. vol. 211, p. 534-545. 2008.

KISTEMANN, T. et al. Effect of sewage treatment plants and diffuse pollution on the occurrence of protozoal parasites in the course of a small river. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. vol. 215(6), p. 577 - 583. 2012.

KOLLER, L. R. **Ultraviolet Radiation**. New York. John Wiley & Sons, Inc. London. Chapman & Hall, Ltd. 270 p. 1952.

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

KOIVUNEN, J.; HEINONEN-TANKSI, H. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. **Water Research.** vol. 39, p. 1519-1526. 2005.

KONOTÉ, Y. et al. Parasite removal by waste stabilisation pond in Burkina Faso, accumulation and inactivation in sludge. **Ecological Engineering**. vol. 50, p. 101-106. 2013.

KORICH, D. G. et al. Effects of Ozone, Chlorine Dioxide, Chlorine and Monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocysts viability. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol.56 (5), p.1423-1428. 1990.

KRAUSE, L. E. B. **Prevalência e fatores associados aos enteroparasitos em pacientes HIV positivos atendidos no Serviço de Assistência Especializada de Pelotas – RS, Brasil.** 73p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS. 2009.

KUZUHARA, F. S. R. **Desinfecção de esgoto sanitário tratado em sistema de lagoas de estabilização por meio de radiação ultravioleta**. 188p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo. 2005.

LABATIUK, C. W. et al. Comparison of animal infectivity, excystation, and fluorogenic dye as measures of *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 57 (11), p.3187-3192. 1991.

LANGENBACH, K. et al. Modeling of slow sand filtration for disinfection of secondary clarifier effluent. **Water Research**, 44, 159-166. 2010.

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R. **Ozone in water tretment: application and engineering.** Michigan: Lewis Publishers, 298 p. 1991.

LAPOLLI, F. R. et al. Desinfecção de Efluentes Sanitários por Meio da Ozonização. In: **Desinfecção de Efluentes Sanitários**. PROSAB 3. Ricardo Franci Gonçalves (coord), p.169-208. 2003.

LEAL, D. A. G. **Avaliação da contaminação de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) por espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* em um ambiente de estuário do litoral de São Paulo.** 188p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2008.

LECHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D. *Giardia* and *Cryptosporidium* in raw and finished water. **Journal of American Water Works Association**. September, p.54-68. 1995.

LEVANTESI, C. et al. Quantification of pathogenic microorganisms and microbial indicators in three wastewater reclamation and managed aquifer recharge facilities in Europe. **Science of Total Environment**. 408, 4923-4930. 2010.

LI, H. et al. Sequential inactivation of *Cryptosporidium parvum* using ozone and chlorine. **Water Research**. vol. 25 (18), p. 4339-4348. 2001.

LI Y., SMITH D.W., BELOSEVIC M. Morphological changes of *Giardia lamblia* cysts after treatment with ozone and chlorine. **Journal of Environmental Engineering and Science**. vol. 3, p. 495-506. 2004.

LI, D. et al. Survival of *Giardia lamblia t*rophozoites after exposure to UV light. **Federal of European Microbiological Societies Microbiological Letter**. 278. p. 56-61. 2008.

LI, D. et al. Infectivity of *Giardia lamblia* cysts obtained from wastewater treated with ultraviolet light. **Water Research.** vol. 43, p. 3037-3046. 2009.

LI, D. et al. Inactivation, reactivation and regrowth of indigenous bacteria in reclaimed water after chlorine disinfection of a municipal wastewater treatment plant. **Journal of Environmental Sciences**. vol. 25 (7), p. 1319 - 1325. 2013.

LIM, Y. A. L.; WAN HAFIZ, W. I.; NISSAPATORN, V. Reduction of *Cryptosporidium* and *Giardia* by wastewater treatment process. **Tropical Biomedicine**. vol. 24, p. 95-104. 2007.

LIM, Y. A. L.; AHMAD, R. A.; SMITH, H. V. Current status and future trends in *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology in Malaysia. **Journal of Water and Health**. Vol.6 (2), p. 239 - 254. 2008.

LINDEN, L. G. et al. UV disinfection of *Giardia lamblia* cysts in water. **Environemtal Science and Technology**. Vol. 36. p.2519-2522. 2002.

LIPPKE, R. T. **Estudo caso controle avaliando a frequência dos principais agentes causadores de diarreia neonatal em suínos.** 70p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS. 2008.

LLOYD, B. The construction of a sand profile sampler: its use in the study of the *Vorticella* populations and the general interstitial microfauna of slow sand filters. **Water Research**, 7, 963-973. 1973.

LOMAZI, E. A. **Identificação de agentes enteropatogênicos (bactérias, vírus e parasitas) nas fezes de crianças com diarreia aguda na cidade de Paulínia – SP**. 122p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 1990.

LONIGRO, A et al. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in membrane-filtered municipal wastewater used for irrigation. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 72, n.12, p.7916-7918. 2006.

LOPES, J. C. et al. Produção de alface com doses de lodo de esgoto. **Horticultura Brasileira.** vol. 23, p. 143 - 147. 2005.

LOPES, G. J. R. **Avaliação da turbidez e do tamanho de partículas como parâmetros indicadores da remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas etapas**

de clarificação no tratamento de água em ciclo completo. 128p. Dissertação (Mestrado). Universidade de Viçosa. Viçosa – MG. 2008.

LOPES, A. M. M. B. **Avaliação de ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de cistos de *Giardia* spp. e sua associação com indicadores bacteriológicos e turbidez na represa de Vargem das Flores – MG.** 109p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. 2009.

LOURENÇÃO, J. **Avaliação da resistência de microrganismos patogênicos à desinfecção seqüencial com Ozônio-radiação ultravioleta e Cloro-radiação ultravioleta**. 140p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos. 2009.

MACHADO, M. F. S. **A situação brasileira dos biossólidos**. Dissertação (Mestrado). UNICAMP. Universidade de Campinas. Campinas. 828 p. 2001.

MARQUES, M. O.; MELO, W. J.; MARQUES, T. A. Metais pesados e o uso de biossólidos na agricultura. In: Tsutiya et al. **Biossólidos na Agricultura**. São Paulo: SABESP. 2001.

MCCUIN, R. M.; CLANCY, J. L. Methods for the recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocysts in wastewaters. **Journal of Microbiological Methods**. vol.63, p.73-88. 2005.

MACHADO, E. C. L. **Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium spp*. em águas superficiais na região metropolitana de Recife – PE.** 141p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife – PE. 2006.

MACKENZIE, W. R. et al. A massive outbreak in Milwaukee of Cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. **New England Journal of Medicine.** vol. 331, p. 161-167. 1994.

MAGALHÃES, T. B. **Uso agrícola de biossólidos: análise crítica da Resolução CONAMA 375/2006 na perspectiva da metodologia de avaliação de risco microbiológico.** 180 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa - MG. 2012.

MAIA, M. M. M. **Estado nutricional, consumo alimentar, deficiência de micronutrientes e doenças parasitárias em crianças de 0 a 10 anos de idade atendidas em serviços de saúde da cidade de Manaus, Amazonas.** 190p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. 2006.

MALTA, R. C. G. **Estudo epidemiológico dos parasitas intestinais em crianças no município de Votuporanga – SP.** 110p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2005.

MARTINS, J. **Caracterização molecular de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana da Baixada Santista, estado de São Paulo, pela análise de fragmentos do gene codificador da glutamato desidrogenase (gdh) e beta-giardina (bg).** Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo - SP. 2010.

MASCARINI, L. M. **Epidemiologia da enteroparasitoses em crianças menores de sete anos em creches na cidade de Botucatu – SP.** 185p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2007.

MEDEMA, G. J.; BAHAR, M., SCHETS, F. M. Survival of *Cryptosporidium parvum, Escherichia Coli, Faecal enterococci* and *Clostridium perfringens* in river water: influence of temperature and autochthonous microorganisms. **Water Science and Technology.** Vol. 35, n.11-12, p.249-252. 1997.

MEDEMA, G. J.; SCHIJVEN, J. F. Modelling the Sewage Discharge and Dispersion of *Cryptosporidium* and *Giardia* in Surface Water. **Water Research**. Vol.35, nº18, p.4307–4316. 2001.

MEDEIROS, R. C. **Comparação da resistência de protozoários patogênicos – *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. – e de microrganismos indicadores à desinfecção seqüencial cloro-radiação ultravioleta e ozônio- radiação ultravioleta**. 210p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. São Carlos – SP. 2010.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O. Potencial do lodo de esgoto como fonte de nutrientes para as plantas. In: Betiol, W.; Camargo, O.A (Ed). **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto.** Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 312p. 2000.

METCALF; EDDY. **Wastewater engineering: treatment and reuse**. 4th Ed. McGraw-Hill Inc. New York. 1819 p. 2003.

MODIFI, A. A. et al. The effect of UV light on the inactivation of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cysts as determined by animal infectivity assay (P-2951-01). **Water Research.** Vol. 36, p.2098-2108. 2002.

MONTEMAYOR, M. et al. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. **Journal of Applied Microbiology**.vol. 99, p.1455-1462. 2005.

MOULIN L. et al. Contribution of treated wastewater to the microbiological quality of Seine River in Paris. **Water Research.** vol. 44, p. 5222-5231. 2010.

MOZOUA, S.; Chauveheid, E. Aerobic spore-forming bacteria for assessing quality of drinking water produced from surface water. **Water Research**. Vol. 39. p. 5186-5198. 2005.

MUNGRAY, A. K.; PATER. K. Coliforms removal in two UASB + ASP based systems. International **Biodeterioration and Biodegradation**. vol. 65, p. 23-28. 2011.

MULLER, A. P. B. **Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da Região Metropolitana de São Paulo**. 107p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 1999.

MURTHA, N.A.; HELLER, L. Avaliação da influência de parâmetros de projeto e das características da água bruta no comportamento de filtros lentos de areia. **Engenharia Sanitária e Ambiental.** vol. 8 (4), p. 257-267. 2003.

NADDEO, V. et al. Wastewater disinfection by combination of ultrasound and ultraviolet irradiation. **Journal of Hazardous Materials**. vol. 168, p. 925-929. 2009.

NAKAMURA, A. A. **Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em aves domésticas e aves exóticas mantidas em cativeiro no Brasil.** 88p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2008.

NASCIMENTO, M. F. **Remoção de oocistos de *Cryptosporidium* por meio da filtração direta ascendente em areia: avaliação em escala piloto.** 149p. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília. Brasília – DF. 2009.

NASSER, A. M. et al. Prevalence and fate of *Giardia* cysts in wastewater treatment plants - review article. **Journal of Applied Microbiology**. vol. 113; p. 477-484. 2012.

NIEMINSKI, E. C.; BELLAMY, W. D.; MOSS, L. R. Using surrogates to improve plant performance. **Journal American Water Works Association**. 92:3, p.67-78. 2000.

NOGUEIRA, A. J. M. N. **Novas dietoxifosfonil – N – acilarilidrazonas e dialquilfosforilidrazonas com potencial atividade biológica.** 167p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – RJ. 2007.

NORMA OFICIAL MEXICANA. **Protección ambiental - Lodos y biosólidos. Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final**. NOM - 004 - SEMARNAT - 2002.

OGUMA, K. et al. Determination of Pyrimidine Dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during UV light inactivation, photoreactivation, and dark repair. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol.67 (10), p.4630-4637. 2001.

OLIVEIRA, S. M. A; von SPERLING, M. Avaliação de 166 ETEs em operação no país, compreendendo diversas tecnologias. Parte I – análise de desempenho. **Engenharia Sanitária e Ambiental.** Vol.10, n.4, p.347-357. 2005.

OLIVEIRA, A. A. **Enteroparasitas em populações usuárias de diferentes sistemas de abastecimento de água em Viçosa-MG.** 112p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 2004.

OLIVEIRA, P. V. **Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no Rio Atibaia, bacia do Rio Piracicaba, Campinas, São Paulo.** 87p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2005.

OLIVERIA, A. B. A. **Condição Higiênico-sanitária da água, alimentos e ambiente de preparo da alimentação em escolas públicas atendidas pelo programa nacional de alimentação escolar no município de Porto Alegre - RS.** 159 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS. 2011a.

OLIVEIRA, M. A. A. **Prevalência de enteroparasitoses em comunidade carente de Fortaleza - CE: comparação entre duas décadas**. 74 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza - CE. 2011b.

OLIVEIRA, G. L. **Processo de tratamento biológico e físico-químico combinados visando o reúso de esgoto sanitário.** 177 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos - SP. 2012a.

OLIVEIRA, S. A. **Parasitos entéricos oportunistas em crianças nefropatas crônicas submetidas à hemodiálise.** 132 p. Dissertação (Mestrado). Universidade de Goiás. Goiânia - GO. 2012b.

OLIVEIRA, C. H. B. **Frequência de enteroparasitos em usuários do serviço público de saúde na mesorregião do oeste potiguar**. 46 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal - RN. 2013.

ONU. UN - HABITAT. **Global Atlas of excreta, wastewater sludge, and biosolids management: moving forward the sustainable and welcome uses of a global resource.** NU - HABITAT and Greater Moncton Sewerage Commission. 2008.

OTTOSON, J. et al. Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. **Water Research.** vol. 40, p.1449-1457. 2006.

PASSIG, F. H.; CAMPOS, J. R. Reator Anaeróbio Híbrido para tratamento de esgoto sanitário. **In: Anais do 23° Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental.** ABES. 2005.

PAULINO, R. C.; CASTRO, E. A.; SOCCOL, V. T. Tratamento anaeróbio de esgoto e sua eficiência na redução de viabilidade de ovos de helmintos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** vol. 34(5), p.421-428, 2001.

PAYMENT, P.; FRANCO, E. *Clostridium perfringens* and Somatic *Coliphages* as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 59 (8), p. 2418-2424. 1993.

PEREIRA, R. A. T. **Diagnóstico parasitológico e sorológico da Toxocaríase, Esquistossomose mansoni e parasitos intestinais.** 129p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2003.

PEREIRA, M. U. **A relação de fatores de risco ambientais e familiares com sibilância em escolares da cidade de Uruguaiana, RS**. 144p. Dissertação (Mestrado). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS. 2005.

PEREIRA, A. M. **Prevalência de parasitos zoonóticos em solos e fezes de praças públicas segundo testes diagnósticos. Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, 2006**. 37p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – RJ. 2007.

PEREIRA, M. A. **Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em hortaliças da Região Metropolitana de Campinas (SP), sua relação com a comunidade de trabalhadores e com a área agrícola**. 158p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2008.

PEREIRA, J. A. **Avaliação da contaminação da alface (*Lactuca sativa*) variedade crespa por bactérias e enteroparasitas.** 77p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa – PB. 2010.

PIVELI, R. P.; KATO, M. T. **Qualidade da águas e poluição: aspectos físico-químicos.** São Paulo, ABES. 2005.

PLUTZER, J.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. **International Journal of Hygiene and Environmental Health.** vol. 213, p. 321-333. 2010.

PRESOTTO, D. **Estudo da prevalência de infecção por endoparasitos em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) do município de Hortolândia – SP**. 99p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2009.

RAGAZZI, M. F. **Estudo comparativo da qualidade parasitológica de toxicológica entre hortaliças cultivadas com água de reuso e hortaliças comercializadas em Ribeirão Preto - SP.** 116 p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto - SP. 2011.

RAMOS, G. D. M. **Avaliação da qualidade da água consumida pela população do Distrito do Sana – Macaé – RJ.** 128p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica - RJ. 2008.

RAZZOLINI, M. T. P. et al. Risk of *Giardia* infection for drinking water and bathing in a peri-urban area in São Paulo, Brazil. **International Journal of Environmental Health Research.** vol. 21 (3), p. 222-234. 2011.

RECUERO, A. L. C. **Giardiose humana e bovina na bacia leiteira do município de Capão do Leão, RS.** 73p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS. 2007.

REINOSO, R.; TORRES, L.A.; BÉCARES, E. Efficiency of natural systems for removal of bacteria and pathogenic parasites from wastewater. **Science the Total Environment**. vol. 395, p. 80-86. 2008.

REIS, V. W. **Fatores de risco de diarréia humana associado às condições de saneamento básico em Ouro Preto, MG.** 69p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto – MG. 2007.

RENNECKER, J. L. et al. Synergy in sequential inactivation of C*ryptosporidium parvum* with ozone/free chlorine and ozone/monochloramine. **Water Research.** vol. 34 (17), p. 4121-4130. 2000.

RESOLUÇÃO CONAMA nº 375, de 29 de agosto (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**.

RIBEIRO, D. C. **Inquérito epidemiológico de infecções parasitárias intestinais em trabalhadores rurais canavieiros na regiões de Campinas e Ribeirão Preto.** 148 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas - SP. 2011a.

RIBEIRO, S. R. **Comparação de técnicas coproparasitológicas para o diagnóstico de protozoários e helmintos intestinais de importância médica**. 104 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória - ES. 2011b.

RIBEIRO JUNIOR, A. G. M. **Epidemiologia das parasitoses intestinais e toxocaríase no município de Pedro de Toledo – SP.** 86p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2002.

RICE E.W., HOFF J.C., SHAEFFER III F.W. Inactivation of *Giardia* cysts by chlorine**. Applied Environmental Microbiology**. vol. 43 (1), p.250-251. 1982.

RISEBRO, H. L. et al. Fault tree analysis of the causes of waterborne outbreaks. **Journal of Water Health**. vol. 5, p.1-18. 2007.

ROBERTSON, L. J. et al. Removal and destruction of intestinal parasitic protozoans by sewage treatment processes. **International Journal of Environmental Health Research.** vol. 9, p. 85-96. 1999.

ROBERTSON, L. J. et al. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. **Water Research**. vol. 34 (8) p. 2310-2322. 2000.

ROCHELLE, P. A et al. The response of *Cryptosporidium parvum* to UV light. **Trends in Parasitology**. vol. 21 (2). p.81-87. 2005.

ROMDHANA, M. H. et al. Monitoring of pathogenic microorganisms contamination during heat drying process of sewage sludge. **Process Safety and Environmental Protection.** vol. 87, p. 377-386. 2009.

RONDON, M. V. S. S. **Biodiversidade de parasitas intestinais em mamíferos silvestres de duas localidade do Estado de São Paulo.** 160 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas - SP. 2010.

ROSE, J. B. et al. Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a full-scale water reclamation facility. **Water Research.** Vol. 30 (11), p.2785-2797. 1996.

ROSE, J. B. Water reclamation, reuse and public health. **Water Science and Technology.** Vol. 55 (1-2), p. 275–282. 2007.

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes – modificação do método de Baermann. **Revista Instituto Adolfo Lutz.** vol. 14, p. 5-8. 1954.

RYU H., MENA K.D., ABBASZADEGAN M. Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-potable reclaimed water. **Water Science and Technoly**, vol. 55 (1-2), p. 283-290. 2007.

RYU, H. et al. Photocatalytic inactivation of *Cryptosporidium parvum* with TiO_2 and low-pressure ultraviolet irradiation. **Water Research**. vol.42, p. 1523-1530. 2008.

SADOVSKY, A. D. I. **Agentes infecciosos associados à diarreia aguda em crianças até três anos de idade: estudo em um hospital de referência no município de Vitória – ES.** 137p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória – ES. 2005.

SAGAYAR, M. I. T. L. *Giardia lamblia*. In: **Parasitologolia Humana**. 9.ed. Ed. Atheneu. David Pereira Neves, Alan Lane de Melo, Odair Genaro, Pedro Marcos Linardi. p.124-132. 1997.

SALES, T. F. S. M. **Detecção de enteroparasitas e organismos do zooplâncton em água de consumo humano: risco à saúde pública**. 100p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife – PE. 2006.

SALLES, S. P. X. **Perfil das condições sanitárias de cães domiciliados no Campus da UFRRJ com ênfase nos fatores associados à prevalência de endoparasitos intestinais.** 58p. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – RJ. 2006.

SALVADOR, R. M. **Detecção e quantificação de Enterovirus em lodo de esgoto proveniente de estações de tratamento de esgotos com potencial uso na agricultura do estado de São Paulo.** 65 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo. São Paulo - SP. 2011.

SANTOS, L. U. et al. Occurrence of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts inn activated sludge samples in Campinas, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. vol. 46(6), p. 309-313. 2004.

SANTOS, L. U. **Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em uma estação de tratamento de esgoto: avaliação das eficiências do processo de lodo ativado na remoção e de desinfecção por luz ultravioleta na inativação desses patógenos.** 132p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2007.

SANTOS, C. K. S. ***Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp.: prevalência e possíveis fatores associados à infecção em crianças procedentes de creches públicas de uma área de alta endemicidade no sudeste do Brasil.** 100p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG. 2008.

SANTOS, E. R. **Caracterização química, microbiológica e toxicidade do lodo de esgoto da estação Mangueira, Pernambuco, Brasil. 68p. Dissertação (Mestrado). Universidade Católica de Pernambuco**. Recife - PE. 2009.

SANTOS, C. B. **Análise espacial das enteroinfecções em lactentes do município de Laranjeiras - SE após a introdução da vacina contra rotavírus**. 73 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Sergipe. Aracaju - SE. 2012.

SATO, M. I. Z. et al. Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in São Paulo State, Brazil. **Science of the Total Environment.** vol. 442, p. 389-396. 2013.

SAVICHTCHEVA, O.; OKABE, S. Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water Research**. Vol. 40, p. 2463-2476. 2006.

SAWYER, C. N.; MCCARTY, P. L.; PARKIN, G. F. **Chemistry for Environmental Engineering and Science.** 5th Edition. 752p. 2003.

SCALIA, L. A. M. **Identificação molecular dos isolados de *Giardia duodenalis* em crianças procedentes dos municípios de Araguari e Uberlândia**. 94 p. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia - MG. 2012.

SEDLAK, D. L.; VON GUNTEN, U. The chlorine dilemma. **Science**. vol. 331, p. 42-43. 2011.

SEVÁ, A. P. **Identificação de assinaturas genéticas em região codificadora de menor unidade ribossômica de *Cryptosporidium* spp.: caracterização molecular de amostras de mamíferos e aves.** 96p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2009.

SHEATHER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique**. Journal Comp. Ther**., v.36, p.266-275. 1923.

SHEPHERD, K.M.; WYN-JONES, A.P. Evaluation of different filtration techniques for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. **Water Science and Technology.** vol. 31, p. 425-429. 1995.

SIDHU, J. P. S.; TOZE, S. G. Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. **Environmental International**. vol. 35, p. 187 - 201. 2009.

SILVA, E. R. **Relação entre hiper-reatividade brônquica e sibilância em escolares de Uruguaiana, Rio Grande do Sul**. 90p. Dissertação (Mestrado). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS. 2006.

SILVA, C. F. **Remoção de oocistos e de indicadores físicos de *Cryptosporidium parvum* em águas de abastecimento por meio da decantação – estudo em escala piloto**. 117p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. 2008.

SILVA, R. M. **Infecção natural por *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* em cordeiros da raça mestiça Santa Inês, na região semi-árida do Estado do Rio Grande do Norte.** 94p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. 2009.

SILVA, F. C. **Estudo fitoquímico e da atividade biológica do extrato hexânico de galhos de *Maytenus gonoclada* (Celastraceae).** 136p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. 2010a.

SILVA, S. M. M. D. **Prevalência de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp. em populações de cães de diferentes regiões do município de Porto Alegre, RS, Brasil**. 138p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS. 2010b.

SNIS. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de água e esgoto - 2010. Brasília. MC CIDADES. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. 2012.

SOARES, L. V. **Ozonização de esgoto sanitário: estudo da hidrodinâmica, transferência de massa e inativação de microrganismos indicadores.** 249p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo. 2007.

SOCCOL, V. T.; PAULINO, R. C. Riscos de contaminação do agroecossistema com parasitos pelo uso de lodo de esgoto. **In: Bettiol, W., Camargo, O. A. Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente**. p. 245 - 258. 2000.

SOLEIRO, C. A. **Parasitos gastrointestinais de avestruzes (*Struthio camelus*) de diferentes idades e sua ocorrência nas épocas seca e chuvosa em um criatório no município de Itaboaraí, Estado do Rio de Janeiro.** 42p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – RJ. 2009.

SOUZA, P. X. **Nova abordagem laboratorial na investigação das enteroparsitoses em humanos.** 80p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Fluminense. Niterói – RJ. 2005.

SOUZA, J. B. **Avaliação de métodos para desinfecção de água, empregando cloro, ácido peracético, ozônio e o processo de desinfecção combinado ozônio/cloro.** 176p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo. 2006.

SOUZA, S. L. P. **Caracterização genética de isolados de *Giardia* spp. provenientes de amostras fecais de origem humana e animal**. 91p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2007.

SYKORA, J. L. et al. Distribution of *Giardia* cysts in Wastewater. **Water Science and Technology.** Vol. 24 (2), p.187-192. 1991.

TELES, N. S. B. **Avaliação da eficácia terapêutica da *Mentha crispa* no tratamento da giardíase.** 169 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza - CE. 2008.

TEMBUE, A. A. S. M. **Epidemiologia das coccidioses em pequenos ruminantes do município de Ibimirim, Estado de Pernambuco, Brasil**. 115p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife – PE. 2007.

THOMAZ, A. **Caracterização genotípica de *Cryptosporidium* spp. isolados de amostras fecais de felinos, caninos e bovinos no Estado de São Paulo.** 55p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2006.

TINOCO, J. D. **Desinfecção por radiação ultravioleta: estudo do desempenho do processo e avaliação econômica**. 222p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. 2012.

TIWARI, M. et al. Influence of extrinsic factors on granulation in UASB reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**. vol. 71 (2), p. 145-154. 2006.

TONANI, K. A. A. **Bioagentes patogênicos em águas residuárias: destaque para *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., bactérias indicadoras e vírus entéricos.** 137p. Tese (Doutorado). Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP. 2011.

TONETTI, A. L. **Pós-tratamento de efluente anaeróbio por filtros de areia**. 140p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo – Universidade Estadual de Campinas – Unicamp – SP. 2004.

TOSETTO, M. S. **Tratamento terciário de esgoto sanitário para fins de reúso urbano.** 228p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2005.

TSUTIYA, M. T. Características de biossólidos gerados em estações de tratamento de esgotos. In: Tsutiya et al. **Biossólidos na Agricultura, São Paulo: SABESP**. p. 89-132. 2001.

TYAGI, V.K. et al. Slow sand filtration of UASB reactor effluent: A promising post treatment technique. **Desalination,** 249, 571-576. 2009.

TYRREL S.A., RIPPEY S.R., WATKINS W.D. Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chorine and ozone. **Water Research**, vol. 29 (11), p. 2483-2490. 1995.

TZIPORI, S.; WIDMER, G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. **Trends in Parasitology**. vol. 24 (4), p. 184 - 189. 2008.

USEPA – U. S. Environmental Protection Agency. **Alternative disinfectants and oxidants guidance manual**. New York, USA. 1999.

US Environmental Protection Agency. **Method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA**. Office of Water. EPA 821-R-99-061. 1999a.

US Environmental Protection Agency**. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA.** Office of Water. EPA 821-R-99-006. 1999b.

US Environmental Protection Agency. **Environmental Regulations and Technology - Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge**. EPA/625/R-92/013. Cincinnati, Ohio. 2003.

US Environmental Protection Agency**. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA.** Office of Water. EPA 815-R-05-002. 2005.

US Environmental Protection Agency. **Ultraviolet Disinfection Guidance Manual for the final long term 2 enhanced surface water treatment rule**. November. EPA 815-R-06-007. 2006.

US Environmental Protection Agency**. Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA.** Office of Water. EPA 816-R-12-001. 2012.

VAN HAANDEL, A.; MARAIS, G. **O Comportamento do Sistema de Lodo Ativado – Teoria e Aplicações para Projetos e Operação**. Campina Grande – PB. 488p. 1999.

VASQUES, G. I. H.; RESTREPO, I. M.; BOTERO, D. Cryptosporidioses. **Biomédica**, Bogotá. vol. 6, n.1/2, p. 48-70. 1986.

VENCZEL, L. V. et al. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. **Applied and Environmental Microbiology**. vol. 63 (4), p. 1598-1601. 1997.

VESCHETTI, E. et al. Pilot-plant comparative study of peracetic acid and sodium hypochlorite wastewater disinfection. **Water Research**. vol. 37, p. 78-94. 2003.

VESEY, G. et al. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. **Journal of Applied Bacteriology**. vol. 75, p. 82-86. 1993.

VILLARROEL, L. M. F. **Protozoários intestinais em material arqueológico**. 103p. Dissertação (Mestrado). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - FIOCRUZ. Rio de Janeiro - RJ. 2013.

WANG, L.; HU, H.; WANG, C. Effect of ammonia nitrogen and dissolved organic matter fractions on the genotoxicity of wastewater effluent during chlorine disinfection. **Environmental Science and Technology**. Vol. 41 (1), p. 160-165. 2007.

WANG X. et al. Sequential use of ultraviolet light and chlorine for reclaimed water disinfection. **Journal of Environmental Sciences**, vol. 23 (10), p.1605-1610. 2011.

WANG, X. et al. Synergistic effect of the sequential use of UV irradiation and chlorine to disinfect reclaimed water. **Water Research**. vol. 46, p. 1225-1232. 2012.

WEF - WATER ENVIRONMENT FEDERATION (1996). **Wasterwater Disinfection: Manual of Practice**.

WEN, Q. et al. Fate of pathogenic microorganisms and indicators in secondary activated sludge wastewater treatment plants. **Journal of Environmental Management**. vol. 90, p.1442-1447. 2009.

WHITE'S handbook of chlorination and alternative disinfectants. 5th ed. Black & Veatch Corporation . Revised edition of: Handbook of chlorination and alternative disinfectants, 4th ed 1999. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. New Jersey. USA. 2010.

WHO. World Health Organization. **Slow Sand Filtration**. 120p. 1974.

WHO. **Guidelines for drinking water quality**. Vol 1. Recommendations. Edited by: Geneva. World Health Organization, 2006.

WICKRAMANAYAKE, G. B.; RUBIN, A. J.; SPROUL, O. J. Inactivation of *Giardia lamblia* cysts with ozone. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 48 (3), p.671-672. 1984.

WU, J.; DOAN, H. Disinfection of recycled red-meat-processing wastewater by ozone. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. vol. 80, p. 828-833. 2005.

XIAO, G. et al. Occurrence and potential health risk of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the Three Gorges Reservoir, China. **Water Research**. vol. 47, p. 2431-2445. 2013.

XU, P. et al. Wastewater disinfection by ozone: main parameters for process design. **Water Research**. Vol. 36, p.1043-1055. 2002.

YAMASHIRO, S. **Monitoramento de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em um manancial eutrofizado com presença de florações de cianobactérias: Represa de Salto Grande, Americana - SP.** 155p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2010.

YU, J. R. et al. A common oocyst surface antigen of *Cryptosporidium* recognized by monoclonal antibodies. **Parasitology Research**. vol. 88, p. 412 - 420. 2002.

ZHANG, K.; FARAHBAKHSH, K. Removal of native *coliphages* and coliform bacteria from municipal wastewater by various wastewater treatment process: implication to water reuse. **Water Research**. vol. 41, p. 2816 - 2824. 2007.

ZIMMER, J. L.; SLAWSON, R. M. ; HUCK, P. M. Inactivation and potential repair of *Cryptosporidium parvum* following low- and medium- pressure ultraviolet irradiation. **Water Research**. vol. 37, p. 3517-3523. 2003.