UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
Departamento de Saúde Ambiental

Avaliação Sanitária de Águas Residuárias
Provenientes de Lagoas de Estabilização para
Irrigação de Culturas Agrícolas no Estado de
São Paulo

MARIA TEREZA PEPE RAZZOLINI

Tese de doutorado apresentada ao
Departamento de Saúde Ambiental da
Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo para obtenção
do Grau de Doutor.

Área de concentração: Saúde Ambiental

Orientador: Prof^a Dr^a Wanda Maria Risso Günther

São Paulo
2003

44448/2003 doc

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores.

Assinatura:

Data:

Agradecemos à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão da bolsa de estudos, a qual foi de fundamental importância na realização desse trabalho de pesquisa.

**À prof^a Dr^a Wanda Maria Risso
Günther pela atenção, apoio,
dedicação, carinho com que
me orientou e pelas valiosas
sugestões durante a
elaboração desse trabalho.**

**Ao meu marido, amor e
amigo, CHICO, e minhas
lindas filhas, ISABELLA e
LUÍSA, pela compreensão,
ajuda e sobretudo amor
em todos os momentos.**

Aos meus pais, LEONY e
LUIGI, e irmãs, MAFALDA e
ADRIANA e meus queridos
sobrinhos GABRIELA e
RAFAEL, pelo carinho e
atenção nos momentos
difíceis.

AGRADECIMENTOS

Desejamos agradecer a todos os que colaboraram na execução deste trabalho.

À Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo pelo apoio e oportunidade recebidos.

À Profª Drª Maria Helena Matté e ao Prof. Dr. Glavur Rogério Matté, do laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Prática de Saúde Pública da FSP/USP pela paciência, incentivo e pela ajuda na execução da parte de biologia molecular, um agradecimento muito especial.

À Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, e em especial à Gerência de Análises Microbiológicas pelo empréstimo do equipamento de filtragem para determinação de *Salmonella*.

Ao Prof. Dr. Roque Passos Piveli pela atenção e receptividade, e pela aceitação da participação no programa do PROSAB (CNPq/Finep) e tomada de amostras em Lins.

À Drª Petra Sanchez Sanchez e Drª Maria Inês Zanolli Sato pelo incentivo e carinho com que sempre me receberam.

Ao Prof. Dr. José Luiz Negrão Mucci pelo carinho, simpatia e atenção e pelas importantes sugestões para o desenvolvimento desse trabalho de pesquisa.

À Dr^a Lúcia Baldassi do Instituto Biológico, por ceder as cepas de *Salmonella* Typhimurium , *Salmonella* Enteritidis e *E. coli* O157.

À Dra Beatriz Ceballos, da Universidade Federal da Paraíba, pelo envio de material sobre reúso de águas.

Às amigas Francisca Alzira dos Santos, Silvana Audrá Cutolo, Solange Martone Rocha, Luciana Hypeck, Maria do Carmo Dória , Fernanda Souza Ramos e D. Wanda Araújo Carmo, do Departamento de Saúde Ambiental da FSP/USP pela força, carinho e amizade durante todo o trabalho desenvolvido.

Às amigas do Departamento de Prática de Saúde Pública da FSP/USP, Milena Dropa, Marisa Morita, Andrea Cabral , Suzete Contrera Pedro, Fernanda de Oliveira Martins, Míriam Lopes da Silva, Terezinha Travassos Carvalho de Almeida, Márcia, Suzi Barbone, Viraneide Marques Azevedo, Lúcia Schuller e Agnes Hanashiro agradeço pela amizade, ajuda e acolhida.

À Maria Aparecida Gomes Rodrigues, Cida, por cuidar da Isabella e Luísa com carinho durante minha ausência.

Aos professores, colegas e funcionários da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo pelo apoio recebido.

ÍNDICE

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 Reúso de águas residuárias na irrigação de culturas agrícolas	7
2.2 Risco de transmissão de doenças infecciosas através da água de reúso	12
2.2.1 Microrganismos patogênicos presentes em esgotos sanitários	14
2.2.2 Mecanismos de transmissão das doenças e doses infectantes necessárias do agente infectante	20
2.2.3 Concentrações e sobrevivência dos microrganismos patogênicos em esgotos sanitários	21
2.2.4 Incidência de doenças infecciosas associadas ao reúso de água	25
2.3 Utilização de indicadores na avaliação de qualidade de águas	27
2.4 Regulamentação microbiológica e parasitológica para águas de reúso na irrigação agrícola	29
2.5 Coliformes termotolerantes e ovos de helmintos como indicadores de qualidade sanitária para águas de reúso na irrigação agrícola	35
2.6 <i>E.coli</i> potencialmente patogênicas e O157 em esgotos sanitários	58
2.7 Presença de <i>Salmonella</i> em esgotos sanitários utilizados na irrigação agrícola	62
2.8 Colifagos em esgotos sanitários	69
3 JUSTIFICATIVA	76
4 HIPÓTESE	76
5 OBJETIVOS	77
5.1 Objetivos gerais	77
5.2 Objetivos específicos	77

6 METODOLOGIA	79
6.1 Tipo de pesquisa	79
6.2 Caracterização da área de estudo	80
6.3 Amostra e amostragem	83
6.4 Determinação de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	84
6.4.1 Isolamento de <i>Escherichia coli</i> potencialmente patogênicas	85
6.4.2 Sorotipagem de <i>E. coli</i>	87
6.4.3 Genotipagem de <i>E.coli</i> O157	87
6.5 Isolamento de <i>Salmonella</i>	93
6.5.1 Sorotipagem de <i>Salmonella</i>	95
6.5.2 Genotipagem de <i>Salmonella</i>	96
6.6 Quantificação de colifagos	98
6.7 Determinação de ovos de helmintos	99
6.8 Determinação de pH, turbidez e temperatura	101
7 RESULTADOS e DISCUSSÃO	102
7.1 Resultados microbiológicos e parasitológicos das amostras do esgoto tratado	102
7.1.1 Coliformes totais, <i>E. coli</i> e ovos de helmintos	102
7.1.2 Ocorrência de <i>Salmonella</i>	111
7.1.3 Presença de colifagos	114
7.2 Resultados dos parâmetros microbiológicos e parasitológicos em amostras do esgoto tratado submetido à desinfecção com hipoclorito de sódio	116
7.2.1 Coliformes totais, <i>E. coli</i> e ovos de helmintos	116
7.2.2 Ocorrência de <i>Salmonella</i>	126
7.2.3 Ocorrência de colifagos	126
7.3 Resultados dos parâmetros microbiológicos e parasitológicos em amostras do esgoto tratado submetido à desinfecção com ozônio	129
7.3.1 Coliformes totais, <i>E. coli</i> e ovos de helmintos	129
7.3.2 Ocorrência de <i>Salmonella</i>	132
7.3.3 Presença de colifagos	132

7.4 Presença de <i>E. coli</i> potencialmente patogênica O157	133
7.5 Parâmetros físico-químicos: turbidez, pH e temperatura	138
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	140
9 CONCLUSÕES	143
10 RECOMENDAÇÕES	146
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148

ANEXOS

Anexo 1 – Densidade de coliformes totais e *E. coli* em amostras do esgoto tratado e submetido ao processo de desinfecção por hipoclorito de sódio e por ozônio.

Anexo 2 – Determinação de *Salmonella* em amostras do esgoto tratado e submetido ao processo de desinfecção por hipoclorito de sódio e por ozônio.

Anexo 3 – Determinação de colifagos em amostras do esgoto tratado e submetido ao processo de desinfecção por hipoclorito de sódio e por ozônio.

Anexo 4 – Presença de ovos de helmintos em amostras do esgoto tratado

Anexo 5 – Presença de ovos de helmintos em amostras do esgoto tratado submetido ao processo de desinfecção por hipoclorito de sódio.

Anexo 6 – Presença de ovos de helmintos em amostras do esgoto tratado submetido ao processo de desinfecção por ozônio.

Anexo 7 – Determinações de pH, temperatura e turbidez em amostras de esgoto tratado e submetido aos processos de desinfecção por hipoclorito de sódio e ozônio.

Anexo 8 – Tabela de resultados, em NMP/100mL, fornecida pelo fabricante para a obtenção dos resultados da densidade de coliformes totais e *E. coli*.

Anexo 9 - Meios de cultura e reagentes utilizados.

LISTAS DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1: Exemplos de microrganismos patogênicos encontrados em águas de esgoto e lodo de esgoto	15
Quadro 2: Doses infectantes de alguns microrganismos patogênicos	21
Quadro 3: Concentrações de microrganismos no esgoto bruto	22
Quadro 4: Sobrevivência de microrganismos patogênicos a temperaturas entre 20°C – 30°C	23
Quadro 5: Comparação das recomendações de qualidade microbiológica e parasitológica de águas de reúso para utilização na irrigação agrícola e dos critérios de irrigação da OMS(1989), do Estado da Califórnia (1978) e USEPA (1992)	32
Quadro 6: Legislação sobre águas de reúso vigente no Estado de Israel em 1994	33
Quadro 7: Regulamentações em relação ao reúso de água na agricultura	34
Quadro 8: Recomendações revisadas de padrões microbiológicos para uso de esgotos tratados na agricultura	50
Quadro 9: Tipos de patógenos de origem hídrica e possíveis indicadores que podem ser utilizados	53
Quadro 10: Valores médios das características físico-químicas do esgoto bruto e do esgoto tratado no município de Lins (SP)	81
Quadro 11: Remoção (log) de coliformes totais e <i>E. coli</i> após aplicação de ozônio no esgoto tratado	130
Quadro 12: Resultados das reações sorológicas cruzadas em cepas presuntivas de O157 isoladas do esgoto bruto e esgoto tratado, Lins (SP)	134

LISTAS DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Frequência da ocorrência, em porcentagem, de ovos de helmintos em amostras de esgoto tratado, Lins (SP), no período de agosto de 2001 a novembro de 2002.	106
Tabela 2: Ocorrência do gênero <i>Salmonella</i> , segundo as estações do ano, em amostras do esgoto tratado, Lins (SP), novembro de 2001 a setembro de 2002	113
Tabela 3: Taxa de remoção de colifagos, em porcentagem e log, e concentração de sólidos em amostras de esgoto tratado submetido à desinfecção por hipoclorito de sódio em diferentes doses e tempos de contato aplicados, Lins (SP), novembro de 2001 a setembro de 2002.	127
Tabela 4: Taxa de remoção de colifagos, em porcentagem e log, em amostras de esgoto tratado submetido à desinfecção com ozônio em diferentes doses e tempos de contato aplicados, Lins (SP), novembro de 2001 a setembro de 2002	132

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: O papel do tratamento, recuperação e reúso no ciclo da água.	8
Figura 2: Modelo geral de controle para redução de riscos à saúde associadas ao reúso de águas servidas	25
Figura 3: Localização do município de Lins (SP)	81
Figura 4: Esquema do processo de tratamento de esgotos de Lins (SP) mediante sistema de lagoas de estabilização	81
Figura 5: Sistema de tratamento de esgotos sanitários de Lins (SP) e unidades de desinfecção	83
Figura 6: Características de cepas de <i>E. coli</i> em tubos de IAL	86
Figura 7: Colônias típicas de <i>E. coli</i> O157 (correspondente a cepa ATCC 43895) no meio McConkey sorbitol	86
Figura 8: Características do gênero <i>Salmonella</i> em tubos de IAL	95
Figura 9: Densidade de coliformes totais e <i>E.coli</i> em amostras de esgoto tratado por lagoas de estabilização, Lins (SP), novembro de 2001 a setembro de 2002	103
Figura 10: Ocorrência de ovos de helmintos no esgoto tratado, Lins (SP), agosto de 2001 a setembro de 2002.	107
Figura 11: Ocorrência do gênero <i>Salmonella</i> em amostras de esgoto sanitário tratado por sistema de lagoas de estabilização, Lins (SP).	111
Figura 12: Imagem do gel de agarose obtido da corrida eletroforética do ensaio de PCR em algumas cepas de <i>Salmonella</i> oriundas do esgoto tratado, Lins (SP)	112

Figura 13: Densidade de colifagos em amostras do esgoto tratado por lagoas de estabilização, Lins (SP), período de novembro de 2001 a setembro de 2002.	115
Figura 14: Remoção (log) de coliformes totais e <i>E. coli</i> após desinfecção do esgoto tratado com hipoclorito de sódio, doses de 1,6 a 9,7 mg/L, frente diferentes tempos de contato.	118
Figura 15: Remoção (log) de coliformes totais e <i>E. coli</i> após desinfecção do esgoto tratado com hipoclorito de sódio, doses de 10 a 26,6 mg/L, frente diferentes tempos de contato.	119
Figura 16: Ocorrência de ovos de helmintos no esgoto doméstico tratado e submetido ao processo de desinfecção com hipoclorito de sódio, agosto de 2001 a setembro de 2002.	123
Figura 17: Presença de ovos de helmintos no esgoto doméstico tratado por ozonização, Lins (SP), novembro de 2001 a setembro de 2002	131
Figura 18: Imagem do gel de agarose obtido a partir do ensaio de PCR em cepas presuntivas de <i>E. coli</i> O157 isoladas de amostras de esgoto bruto e esgoto tratado, Lins (SP).	135
Figura 19: Imagem do gel de agarose contendo perfis moleculares obtidos a partir de ensaio de RSS-PCR para cepas presuntivas de <i>E. coli</i> O157 oriundas de amostras de esgoto bruto e tratado, Lins (SP).	136
Figura 20: Representação gráfica da matriz de similaridade de Dice de cepas presuntivas de <i>E. coli</i> O157 oriundas do esgoto bruto e esgoto tratado, submetidas a técnica de RSS-PCR.	137

RESUMO

Razzolini MTP. Avaliação sanitária de águas residuárias provenientes de lagoas de estabilização para irrigação de culturas agrícolas no Estado de São Paulo. São Paulo; 2003.(Tese de doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP).

Em decorrência da escassez de água e para melhor aproveitamento de recursos hídricos considera-se o reúso de águas residuárias como alternativa de oferta desses recursos na irrigação de culturas agrícolas e outras atividades. No entanto, o reúso de águas requer cuidados específicos pois muitos agentes de doenças são veiculados pela água. No caso da irrigação agrícola o controle da qualidade microbiológica e parasitológica de águas de reúso é de fundamental importância para assegurar níveis de qualidade satisfatórios, minimizando assim riscos à saúde pública. **Objetivo.** Estudar a viabilidade da utilização dos esgotos sanitários tratados pelo sistema de lagoas de estabilização do município de Lins (SP) na irrigação de áreas agrícolas, sob o ponto de vista sanitário. A avaliação da qualidade microbiológica e parasitológica dos esgotos tratados foi segundo as recomendações da OMS(1989) para águas de reúso na agricultura; a verificação da presença de cepas de *E. coli* potencialmente patogênicas, mediante sorologia e ensaios de amplificação em cadeia pela polimerase (PCR); pesquisar a presença de *Salmonella*; investigar a presença e viabilidade de ovos de helmintos; quantificação de colifagos e avaliação da eficiência da desinfecção dos esgotos com hipoclorito de sódio e ozônio. **Métodos.** A determinação de coliformes totais e *E. coli* efetuou-se mediante uso do *kit* Colilert (Iddex) e a pesquisa de cepas de *E. coli* potencialmente patogênicas por meio de teste sorológico e PCR. O isolamento de *Salmonella*, quantificação de colifagos e determinação de ovos de helmintos foi efetuado segundo Normas Cetesb e *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (20th ed. 2000) e a viabilidade dos ovos de helmintos de acordo com Yanko (1988). **Resultados.** A concentração de *E.coli* nas amostras de esgoto sanitário tratado revelou

densidade acima dos níveis recomendados pela OMS para irrigação irrestrita e restrita. Foram detectados ovos de *Ascaris* e *Salmonella*. A densidade de colifagos situou-se entre $6,0 \times 10^2$ a $8,5 \times 10^4$ UFP/100mL não sendo considerada elevada nas amostras analisadas. Nas amostras de esgoto tratado submetidas à desinfecção com hipoclorito de sódio observou-se variação na densidade de coliformes totais e *E. coli*, dependendo da dosagem e tempo de contato aplicados. Os melhores níveis de remoção dessas bactérias ocorreu na faixa de 8,6 a 15 mg/L de hipoclorito de sódio e tempo de contato de 30 minutos. Quando da aplicação de ozônio não se verificou eficiência satisfatória na remoção de coliformes totais e *E. coli*. Em relação à eliminação de ovos de helmintos não se observou eliminação após a aplicação de ambos os agentes desinfectantes. A remoção de colifagos após desinfecção com hipoclorito de sódio foi de 0 a 2 logs dependendo da dose e tempos de contato aplicados e após desinfecção com ozônio a remoção desses organismos ficou entre 0 e 1 log. **Conclusão.** Os esgotos sanitários tratados não apresentaram qualidade microbiológica e parasitológica satisfatória para irrigação irrestrita (categoria A) e restrita (categoria B) conforme valores-guia da OMS. Nas condições da pesquisa realizada, os desinfectantes utilizados não resultaram em remoção efetiva de microrganismos indicadores, não atendendo às recomendações da OMS. Detectou-se *Samonella* nas amostras de esgoto tratado analisadas e densidade de colifagos em níveis compatíveis com os registros da literatura, 10^3 a 10^4 UFP/100mL. Não se observou a ocorrência de *E. coli* O157 nas amostras de esgotos tratados analisadas. Portanto, conclui-se que os esgotos tratados procedentes da Estação de Tratamento de Esgotos utilizado na cidade de Lins (SP) não devem ser utilizados na irrigação de cultivos enquadrados na categoria A (irrigação irrestrita) e categoria B (irrigação restrita) estabelecidas pela OMS (1989) como medida de proteção à saúde de grupos expostos a essas águas.

ABSTRACT

Razzolini MTP. Sanitary evaluation of wastewater from stabilization ponds for agricultural irrigation at São Paulo state. São Paulo, 2003, .(PhD dissertation – Faculdade de Saúde Pública da USP).

Due the water scarcity and the necessity to improve of hydric systems management the reuse appears as an alternative to agricultural irrigation and other activities. However, wastewater reuse demands special attention because there are many diseases transmitted by contaminated waters. This concern shows the importance of the satisfactory sanitary quality to protect public health. **Objective.** Studying the viability of treated wastewater by stabilization ponds located in Lins (SP) to reuse in agricultural in relation to WHO recommendations (1989), presence of *E.coli* O157 through out sorological reaction and polymerase chain reaction (PCR), *Salmonella* detection, presence and viability of helminthes eggs, quantification of coliphages and efficiency of disinfection using sodium hypochlorite and ozone. **Methods.** The enumeration of total coliform and *E. coli*, *Salmonella* isolation, coliphages density and helminthes eggs determination were carried out according to Cetesb guidelines and Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (20th ed., 2000). The viability of helminthes eggs was determined according Yanko(1988). **Results.** *E. coli* concentration in treated wastewater samples revealed values higher than WHO guidelines (1989) to unrestricted (category A) and restricted (category B) irrigation, *Ascaris* eggs were detected as well as *Salmonella* . The coliphages density, $6,0 \times 10^2$ to $8,5 \times 10^4$ UFP/100mL , was not high in the analyzed samples. There was variation in the concentration of total coliform and *E.coli* in treated wastewater disinfected with sodium hypochlorite depending of dosis and contact time employed. The best results were observed in the range between 8,6 – 15 mg/L of sodium hypochlorite at 30 minutes of contact time. When the ozone was used the results obtained did not reveal satisfactory efficiency in total coliform and *E. coli* reduction. In relation to

helminthes eggs elimination the disinfectant agents used were not efficient. The coliphages reduction using sodium hypochlorite was between 0 – 2 logs units depending of dosis and contact time employed, after ozone disinfection the reduction of these microorganisms was low. **Conclusions.** The treated wastewater did not present satisfactory microbiological and parasitological quality to irrestricted (category A) and restricted (category B) irrigation according to WHO (1989) guidelines. Under the conditions of this investigation, the disinfectants agents used were not effective in the elimination of fecal indicators to reach WHO (1989) recommendations. *Salmonella* was detected in treated wastewater samples studied and coliphages concentration was compatible with literature data, between 10^3 to 10^4 UFP/100mL. *E. coli* O157 was not detected in treated wastewater sample analyzed. Even though, due the acquired results the final effluent from stabilization ponds system in Lins (SP) should not be used in irrestricted and restricted irrigation second WHO (1989) recommendations as public health protect measure to exposed groups to this kind of waters.

1.INTRODUÇÃO

Nota-se que há um desequilíbrio entre a disponibilidade de recursos hídricos e o crescimento explosivo dos grandes centros urbanos aliado ao desenvolvimento industrial, o que evidencia que deve ser priorizado o uso desses recursos para o abastecimento público e para a produção de energia elétrica (MOSCOSO e LEÓN 1995). Por outro lado, a idéia de valorização dos efluentes como forma de aumentar a oferta de água em regiões onde ela é escassa e/ou como alternativa à disposição final dos esgotos vem sendo considerada como possibilidade cada vez mais atraente (MANCUSO 1992).

A discussão sobre o uso de águas servidas envolve aspectos sociais, econômicos, políticos e ambientais. A reutilização planejada de águas residuárias pode trazer múltiplos benefícios como por exemplo: redução de lançamentos de contaminantes e matéria orgânica em corpos d'água e da conseqüente poluição hídrica; diminuição dos custos de tratamento de águas residuárias, já que para determinados usos a qualidade pode ser menos restritiva que para lançamento em cursos naturais de água; economia de energia; aproveitamento de elementos nutritivos presentes no efluente, especialmente para uso em irrigação agrícola e jardins ornamentais; e uma maior regularidade da vazão de água disponível (CIFUENTES e col. 1994; MUJERIEGO 1997).

Dentre os vários usos de águas residuárias cabe destacar: reutilização urbana (jardinagem, incêndios, lavagem de ruas e automóveis), reutilização industrial (refrigeração, jardinagem, lavagem de áreas externas e pátios), reutilização agrícola e florestal, reutilização ornamental e recarga de aquíferos.

O reúso agrícola e de jardinagem constitui o aproveitamento mais amplo de águas residuárias. Na utilização para irrigação de culturas são utilizadas

tanto em cultivos de hortaliças (consumo cru) como em cultivos que passam por processos industriais (cereais, cítricos e vinícolas) e na aquicultura. HESPANHOL (2003) evidenciou que o uso consumptivo de água para a agricultura, de modo geral, é de 70% do total consumido atualmente e ainda estima que esse valor aumente para 80% ainda nessa década, o que implicaria em conflitos de uso da água em bacias hidrográficas brasileiras, em especial as localizadas em áreas urbanas.

Muitos são os relatos que ressaltam a importância do controle microbiológico e parasitológico em águas servidas empregadas na agricultura, com a finalidade de se evitar a ocorrência de doenças, tanto na população consumidora como nos agricultores, diminuindo ao máximo o risco das populações expostas (*The Engelberg Report* 1985; OMS 1989; CIFUENTES e col. 1993; CIFUENTES e col. 1994; MOSCOSO e LEÓN 1995; MUREJIEGO 1997).

No estado de São Paulo, a Companhia de Saneamento Básico de São Paulo (SABESP) opera 195 sistemas de lagoas de estabilização para tratamento de esgotos sanitários. Há interesse da SABESP na investigação de formas de viabilizar o uso desses efluentes na irrigação de culturas agrícolas, nas diversas cidades do interior do estado, onde essas lagoas de estabilização são operadas. Segundo MOSCOSO e LEÓN (1995), o uso de efluentes oriundos de lagoas de estabilização é uma ótima opção já que esses efluentes, em geral, não apresentam patógenos. Vários autores reconhecem que tratamento de esgotos domésticos por sistemas de lagoas de estabilização apresentam remoção de microrganismos patógenos e, portanto, podem alcançar qualidade sanitária adequada para fins agrícolas (SHUVAL 1986; VAZ da COSTA VARGAS e col. 1996; SALGOT e PASCUAL, 1996; CAMPOS, 1999).

A eliminação de patógenos e indicadores de contaminação fecal em sistemas de lagoas de estabilização pode ocorrer em três situações: 1) criando-se condições adversas extremas, 2) longa permanência desses microrganismos dentro do reator (tempo de retenção hidráulico longo) e 3) aceleração metabólica e estímulo da cadeia alimentar onde suprimento de oxigênio e relação alimento/microrganismo sirva de estímulo para rápido consumo de matéria orgânica. Em lagoas anaeróbias, a sedimentação é o principal mecanismo de eliminação de microrganismos. Devido ao alto peso os ovos de helmintos sedimentam, enquanto vírus aderem aos sólidos, os quais sofrem sedimentação. A principal causa de decaimento de microrganismos em condições anaeróbias seria a decomposição da matéria orgânica. Em lagoas facultativas, a remoção pode se dar em função de fatores como sedimentação, radiação solar, pH alto, baixo nível de CO₂, alta concentração de oxigênio dissolvido, presença de toxinas de algas, presença de predadores e tempo de retenção hidráulico (ROLIM 2000 *apud* CAMPOS e col. 2002). SHUVAL (1986) estudou as vantagens de sistema de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização a saber: baixo custo e facilidade de operação, exigência de pouco ou nenhum equipamento mecânico e robustez. Ainda mostrou que em sistemas compreendidos por 4 a 5 células, em países quentes (temperaturas acima de 20°C), com tempo de retenção hidráulico de 20 a 25 dias, a eficiência de remoção de ovos de helmintos pode chegar a 100%, para coliformes fecais de 4 a 6 logs (aproximadamente 99,9%) e de 2 a 4 logs para vírus. Dados semelhantes foram observados em pesquisa sobre remoção de microrganismos em sistemas de tratamento de esgotos por lagoas de estabilização, onde BOTERO e col. (1997) encontraram remoção de 98,0% de coliformes totais e fecais e de 97,0% de colifagos.

Qualquer que seja a aplicação de águas residuárias deve-se considerar que muitos agentes patogênicos estão associados a esgotos e biossólidos gerados em estações de tratamento de esgotos (ETEs), os quais podem representar risco à saúde da população exposta. Dentre os patógenos que podem estar presentes estão as bactérias, vírus, e parasitas como helmintos e protozoários.

O estudo da qualidade sanitária de águas servidas em áreas agrícolas é de fundamental importância. Diante desse quadro a Organização Mundial de Saúde (OMS 1989) estabeleceu diretrizes sanitárias sobre o uso de águas residuárias na agricultura e aquicultura. Em relação ao uso agrícola, as normas ou diretrizes sobre a qualidade dessas águas a serem utilizadas na irrigação de culturas sem restrições (inclusive legumes e verduras que se consomem cruas) implicam em regras explícitas como número máximo de bactérias do grupo coliforme, requisitos mínimos de tratamento e redução do número de ovos de helmintos, especialmente em regiões onde as parasitoses são endêmicas (redução de 99,9%). Segundo SHUVAL (1986), o risco sanitário de contaminação pelo reúso d'água proveniente de esgotos sanitários na agricultura varia de acordo com o tipo de microrganismo presente. O autor, entretanto, ressalta que esse risco é mais elevado no caso de ovos de helmintos e de menor risco para as infecções bacterianas e por protozoários seguidas por infecções virais. Essa classificação está de acordo com as considerações feitas por FEACHEM e col. (1983).

No intuito de se alcançar qualidade satisfatória de esgotos sanitários com potencial de reúso na agricultura há a possibilidade de utilização de métodos de desinfecção.

Dentre os métodos de desinfecção a cloração tem sido a técnica mais utilizada, necessitando, entretanto, de conhecimento mais detalhado sobre sua

eficiência em efluentes de lagoas de estabilização. Da mesma forma outras técnicas alternativas de desinfecção, como o emprego da ozonização, merecem ser melhor avaliadas.

A cloração de esgoto sanitário apresenta maior complexidade do que a de água de abastecimento, necessitando dosagens superiores a 10 mg/L para resultar concentração de coliformes inferior a 100/100 mL. O emprego de cloro em água que contenha substâncias húmicas e outros compostos orgânicos pode levar à formação de vários produtos prejudiciais à saúde. A presença de trihalometanos (clorofórmio, bromofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e dicloro-iodometano) normalmente é atribuída às reações do cloro com substâncias húmicas (DANIEL e CAMPOS 1993). O principal do efeito resultante da exposição aos trihalometanos, particularmente clorofórmio, é o desenvolvimento de tumores. Outra desvantagem da aplicação de cloro na desinfecção de águas residuárias é a necessidade de descloração antes do lançamento dessas águas em corpos d'água receptores. A segurança quanto ao uso do cloro foi questionada quando se constatou a formação de trihalometanos em águas de abastecimento cloradas. A partir de então reconhece-se a necessidade de pesquisas a respeito do emprego de desinfetantes alternativos.

A aplicação do ozônio destaca-se pela sua alta capacidade desinfetante, pela remoção de compostos que causam cor e odor, diminuição da dosagem de cloro na pós-cloração, redução dos precursores de trihalometanos, remoção de nutrientes, grande capacidade oxidante, redução de teores de ferro e manganês, controle da turbidez, não conferindo odor e sabor, oxigenação do efluente tratado e decomposição rápida após aplicação. Alguns aspectos negativos do uso do ozônio podem ser observados, tais como: alto custo em comparação com o uso de cloro e elevado consumo de energia. Segundo JOLLEY e col. *apud* DANIEL (1993), sabe-se relativamente pouco sobre a

comparação com o uso de cloro e elevado consumo de energia. Segundo JOLLEY e col. *apud* DANIEL (1993), sabe-se relativamente pouco sobre a formação (ou possível formação) de subprodutos da ozonização, embora seja suposto que os primeiros produtos da oxidação de moléculas orgânicas sejam materiais oxigenados não voláteis e solúveis na água.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Reúso de águas residuárias na irrigação de culturas agrícolas

O uso de esgotos sanitários na produção agrícola tem sido praticado por vários séculos de diferentes formas.

Há relatos de uso de esgotos na irrigação de culturas agrícolas desde o século XIX, quando da publicação em 1865, na Inglaterra, do *"First Royal Commission"*, o qual regulamentava a utilização de dejetos na agricultura. Em 1875 conheciam-se, aproximadamente, 50 propriedades no Reino Unido que se utilizavam dessa prática, dentre elas Edimburgo, Londres e Manchester. Essa prática estendeu-se a outros países da Europa, como França e Alemanha, e a outros continentes como Oceania e América. Como exemplo cita-se a cidade de Paris onde, entre 1868 e 1904, foram interrompidas descargas de esgotos no Rio Sena para aplicação em propriedades rurais, totalizando uma área de 5.300 ha. Em Berlim, do ano de 1876 a 1910, havia 17.200 ha irrigados com águas servidas. Em Melbourne, Austrália, no ano de 1897 os esgotos gerados eram utilizados na irrigação de pasto para gado e ovelhas (SHUVAL 1986).

MOSCOSO (1993) relatou a experiência de reúso de águas no Peru, desde a década de 60, com a implementação de lagoas de estabilização em Lima. Desde 1977, o *Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente* (CEPIS) e instituições peruanas têm estudado os sistemas de lagoas de estabilização como fonte de águas servidas para uso agrícola, pois a região da costa peruana é bastante carente em água e o reúso é de extrema importância para o desenvolvimento dessa região.

A reutilização de águas servidas é uma tendência mundial, tendo em vista a distribuição heterogênea de água no planeta Terra, onde há abundância

em algumas regiões e escassez em outras. Outro aspecto que deve ser considerado é que mesmo em muitas regiões onde há oferta de água a sua qualidade encontra-se comprometida e a preservação desses recursos torna-se fundamental.

Considera-se que a prática de reúso de águas servidas está de acordo com a filosofia de se valorizar águas residuárias e também de atender às demandas de água que são cada vez maiores (MANCUSO 1992; MUJERIEGO 1997). Nessa mesma orientação AYRES e MARA (1996) abordaram que o reúso dessas águas estaria de acordo com políticas de proteção ambiental com a obtenção de sociedades mais fechadas nas quais as substâncias circulam e são reutilizadas na mesma localidade, como mostra a figura 1.

Figura 1: O papel do tratamento, recuperação e reúso no ciclo da água (ASANO e LEVINE 1996).

Muitos autores ressaltam a importância da reutilização de esgotos sanitários na irrigação agrícola como um recurso de desenvolvimento econômico de regiões áridas. SALGOT e PASCUAL (1996) enfatizaram essa forte necessidade em várias regiões espanholas – ilhas Baleares, Andalucia e

Catalúnia - e destacaram a importância de leis que regulamentem a qualidade dessas águas para reuso agrícola.

Em compilação de casos práticos de utilização de águas residuárias na agricultura LÉON e CAVALLINI (1999), relatam que no estado da Califórnia (EUA) a água residuária bruta era utilizada diretamente sobre as áreas de cultivo desde 1890. Em 1987, foram utilizados diretamente mais de 63% de águas residuárias para irrigação, 14% para recarga de aquíferos, 13% para irrigação de áreas verdes urbanas e 10% para outras aplicações industriais, recreativas e para a vida silvestre. A maior parte da água recuperada foi usada no Vale Central e na Costa Sul da Califórnia em cultivos de maçã, aspargo, abacate, cevada, feijão, brócolis, couve, couve-flor, aipo, cítricos, uvas, alface, milho, pêssego, pimenta, pistachos, ameixa, beterraba e trigo. Como essa prática é bastante difundida nesse estado americano, o Departamento de Serviços de Saúde da Califórnia, desde 1978, estabeleceu critérios para a recuperação de águas residuárias. Os autores citaram também a prática de reuso no Kuwait, onde iniciou-se, em 1975, um projeto de tratamento de águas servidas para aproveitamento na irrigação de cultivos agrícolas – alfafa, berinjela, pimentão e cebola. Processos de tratamento de esgotos como lodos ativados e lagoas de estabilização foram empregados, sendo que em alguns deles há tratamento terciário (desinfecção com cloro). Outro caso prático muito importante comentado pelos autores é o do Vale do Mezquital (México). Nessa região o reuso de águas residuárias data do final do século XIX onde, em 1996, 70.000 ha eram irrigados com essas águas e 45.000 famílias de agricultores assentadas na região, cultivando-se principalmente milho e alfafa e em menor proporção, aveia, cevada, feijão, trigo, pimentão e tomate. Informação mais recente registrada por BAHRI (1999) noticia que são cerca de 90.000 ha irrigados com água de reuso no Vale do Mezquital, utilizando 74,5 m³/s de águas incluindo-se águas pluviais. Esse autor assinala ainda importantes aspectos nesse caso de reuso como o ótimo aproveitamento de nutrientes, o

uso seguro dessas águas na agricultura e a preocupação com questões econômicas da região.

BAHRI (1999) relatou que 11 cidades da Tunísia, as quais captam água da área de Medjerda, formaram um modelo integrado de reúso de esgoto tratado em áreas agrícolas, resultando ainda na proteção dos reservatórios de água para abastecimento da região contra eutrofização, pois além da diminuição das descargas de esgotos nesses reservatórios, as águas que não são reutilizadas passam por tratamento para remoção de fosfatos. Segundo BAHRI, essa prática é usada na Tunísia desde 1988 com um volume da ordem de 78 milhões de m³ por ano de água residuária tratada por lodos ativados, lagoas de estabilização, filtros biológicos e valos de oxidação, irrigando uma área de 1.750 ha. Nesse mesmo trabalho a projeção do volume de esgotos tratados foi de aproximadamente 125 milhões de m³ para o ano 2000, para irrigação de uma área de 6.700 ha. A área da região de Tunis, geradora de 60% das águas residuárias do país, seria a mais beneficiada.

MATHEW e col. (2000) apresentaram caso de reúso de esgotos sanitários tratados por valos de oxidação na irrigação agrícola de comunidades aborígenes da zona árida do oeste da Austrália. Além de trazer vantagens econômicas para essas comunidades, essa prática resulta em conservação dos escassos recursos de água doce e controle de poluição hídrica. No Marrocos, país semi-árido e árido, gerava-se 370 milhões de m³ de águas residuárias em 1990 e a projeção para o ano de 2010 é de 900 milhões de m³. Em 1993, uma pesquisa nacional indicava que mais de 7.200 ha de cultivos de cereais, frutas e vegetais com esgotos brutos mostrando o potencial de reúso naquele país (HABBARI e col. 2000b).

Em 2001, ANGELAKIS e BONTOUX relataram a situação de reúso de águas servidas nos países denominados *Eureau* (Áustria, Bélgica, Dinamarca,

Finlândia, França, Irlanda, Itália, Alemanha, Grécia, Luxemburgo, Holanda, Portugal, Espanha, Suécia, Reino Unido, Suíça, Noruega e Islândia) e países considerados como membros observadores – Bulgária, Croácia, Chipre, Estônia, Hungria, Polônia e Romênia. Ressaltaram a importância da utilização de águas residuárias tratadas em diversas atividades e enfatizaram a tendência no aumento de seu consumo na irrigação de áreas agrícolas nos países mediterrâneos. Segundo os autores, alguns países *Eureau* não consideram a prática de reúso de águas servidas tratadas na irrigação agrícola por possuírem abundância de água doce, dentre eles citam-se Áustria, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Irlanda, Noruega, Luxemburgo e Suíça. Nesses países o reúso de água é apenas relevante com a finalidade de reduzir poluição e custos, ocorrendo primordialmente em instalações industriais, utilizada como material de recirculação e de fechamento de circuitos. Já em países como França, Portugal, Espanha, Itália e Grécia esse recurso hídrico é bastante considerado na irrigação de áreas agrícolas. Na França, por exemplo, a prática de irrigação com águas residuárias vem de longa data nas regiões mais áridas do país. Em Portugal o reúso de águas servidas tratadas na irrigação agrícola representou significativo desenvolvimento em zonas mais áridas do país – Beja, Évora, Setúbal, assim como ocorre na Espanha. Segundo BARBAGALLO e col. (2001) o consumo de água na Itália é de 50 bilhões m³/ano, 50% desse montante é utilizado na irrigação agrícola deixando claro a importância de novos conceitos em gestão de recursos hídricos. FRIEDLER (2001), relatou que em Israel 65% dos esgotos são reutilizados e que se pretende que esse percentual alcance 90% ainda nessa década, como recurso hídrico importante no fechamento do balanço hídrico daquele país.

Em análise realizada por XU e col. (2001) referente ao reúso de águas servidas para irrigação de cultivos agrícolas na árida ilha francesa de Noirmoutier, os autores consideraram que a prática de reúso na agricultura seria excelente alternativa para minimizar a escassez de água na região. O

mesmo foi apontado por VÉLEZ e col. (2002) sobre o potencial de reúso na agricultura na província de Mendoza (Argentina) cuja aridez é bastante notificada, como alternativa ao seu desenvolvimento relataram planos na área de tratamento de esgotos para atendimento aos padrões recomendados pela OMS (1989) e reúso dos esgotos tratados em 10 plantas de tratamento, sendo o potencial de irrigação para aproximadamente 8.000ha, atendendo em torno de 750 pessoas.

Muitos autores relatam a importância do reúso de águas servidas na agricultura e concordam com a importância do monitoramento da qualidade sanitária dessas águas para minimizar problemas de saúde pública.

2.2 Risco de transmissão de doenças infecciosas através da água de reúso.

Os efeitos à saúde humana associados, direta ou indiretamente, à prática de reúso de esgotos sanitários na irrigação agrícola podem se apresentar de duas maneiras: problemas de saúde aos agricultores e à população vizinha a essas áreas de reúso de águas, e contaminação de produtos agrícolas irrigados por essas águas servidas, os quais podem veicular patógenos a humanos e/ou animais mediante seu consumo ou manuseio, ou ainda pela contaminação secundária através do consumo de animais oriundos de áreas cuja irrigação se dá pelo reúso de esgotos sanitários (OMS1989). HESPANHOL (1990) discutiu aspectos sanitários do reúso de águas residuárias na irrigação agrícola, ressaltando a importância do monitoramento e controle de microrganismos de interesse em saúde pública e enfatizou a importância do tratamento dos esgotos sanitários para reúso.

O uso de águas residuárias para irrigação de hortaliças na Região Metropolitana de Santiago do Chile, é feito sem nenhum tratamento prévio e com vazão diária de 11 m³/s. Dois terços dessa vazão é lançada ao rio Zanjón

(curso d'água estacional) e um terço no rio Mapocho (apresenta pequena vazão). Em ambos os casos as águas eram utilizadas na irrigação de hortaliças. Nessa época foi identificado na região que o principal mecanismo de transmissão de cólera e outras doenças entéricas dava-se pela água utilizada na irrigação agrícola (FAO 1993; SHUVAL 1993). Os resultados obtidos demonstraram que a substituição de cultivo de risco (hortaliças), o qual era irrigado com águas cuja densidade de coliformes fecais era superior a 1.000/100 mL, por cultivos de baixo risco (batata, feijão, parreiras), permitiu uma redução significativa de casos de distúrbios gastrointestinais na região estudada (MONREAL 1993).

Segundo relataram JIMENÉZ e col. (2001), o Instituto Nacional de Saúde Pública do México demonstrou que a incidência de distúrbios gastrointestinais era 13 vezes maior em áreas onde havia a utilização de águas servidas brutas na agricultura do que em regiões onde essas águas eram tratadas ou então não eram utilizadas.

A sobrevivência e a maneira como potenciais patógenos podem infectar o homem devem ser estudados no intuito de se eliminar ou minimizar riscos à saúde pública associados ao uso de águas provenientes de esgotos sanitários.

Os aspectos sobre a saúde humana devem ser abordados considerando-se as seguintes premissas em relação aos microrganismos :

- ♦ Quais os patógenos provavelmente presentes no esgoto sanitário;
- ♦ Qual a densidade desses patógenos nessas águas;
- ♦ Se há a possibilidade desses patógenos sobreviverem por tempo e em número suficientes para infectar agricultores e consumidores;
- ♦ Quais os tipos de patógenos capazes de alcançar os campos ou cultivos;
- ♦ Qual é a rota de infecção dos prováveis patógenos presentes.

2.2.1 Microrganismos patogênicos presentes em esgotos sanitários

É grande a variedade de bactérias, vírus e parasitas de origem entérica que podem estar presentes nas águas servidas, em quantidade e variedade, dependentes da morbidade da população que deu origem a esse esgoto, do grau de saneamento e dos hábitos de higiene dessa população, uma vez que a maior parte dessas doenças é transmitida por contato pessoal, através de alimentos e águas contaminadas. Esses agentes também podem ser provenientes de indústrias que processam carnes, peixes e outros produtos alimentícios. Exemplos importantes, do ponto de vista da relevância clínica da doença, são as bactérias dos gêneros *Salmonella* e *Shigella*, vírus da hepatite, vírus Norwalk e rotavírus e os parasitas que causam giardíase, criptosporidiose, teníase e ascaridíase. No quadro 1 pode ser observada uma relação de organismos patogênicos que podem estar presentes no esgoto bruto e no lodo de esgoto (USEPA 1992; WESTCOT 1997).

Uma das bactérias mais comuns presentes em águas residuárias municipais é a *Salmonella*. Este gênero abrange uma grande variedade de sorotipos que podem causar doenças em humanos e animais. A salmonelose manifesta-se em humanos através de três diferentes formas clínicas: febres entéricas, septicemias e gastroenterites agudas. A forma mais grave de salmonelose é a febre tifóide, causada pela *Salmonella typhi*. As septicemias por *Salmonella* não são muito comuns na população humana. A terceira forma da doença, as gastroenterites agudas são muito freqüentes, com mais de 1500 sorotipos diferentes que podem causá-la (COOPER 1991; USEPA 1992).

Quadro 1 – Exemplos de microrganismos patogênicos encontrados em águas de esgoto bruto e lodo de esgoto

Classe de Microrganismo	Exemplos	Doença
Bactérias	<i>Shigella</i> sp <i>Salmonella</i> sp <i>Salmonella typhi</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>E. coli</i> enteropatogênica <i>Yersinia</i> sp <i>Campilobacter jejuni</i>	Disenteria bacilar Salmonelose (gastroenterite) Febre tifóide Cólera Gastroenterites Gastroenterites Gastroenterites
Vírus	Hepatite A Vírus Norwalk Rotavírus Poliovírus Vírus Cocksackie Echovírus	Hepatite infecciosa Gastroenterite aguda Gastroenterite aguda Poliomielite Sintomas de gripe Sintomas de gripe
Protozoários	<i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Cryptosporidium</i> sp <i>Balantidium coli</i>	Amebíase (disenteria amebiana) Giardiase (gastroenterite) Criptosporidiose (gastroenterite) Balantidiase (gastroenterite)
Helmintos	<i>Ascaris</i> sp <i>Taenia</i> sp <i>Necator americanus</i> <i>Trichuris trichiura</i>	Ascaridíase Teníase Ancilostomíase Tricuríase

Fonte: USEPA 1992; WESTCOT 1997

Um gênero menos comum de bactéria em esgotos é a *Shigella*, causadora de uma doença denominada disenteria bacilar ou shigelose, tendo sido relatados surtos dessa doença devido ao consumo de água proveniente de poços contaminados com águas de esgoto. A sobrevivência dessa bactéria no esgoto é relativamente breve e, provavelmente, o contato pessoal desempenha um papel mais importante na transmissão dessa doença. A *Shigella* é entretanto a principal causa de surtos em exposição recreacional em lagos e rios (COOPER 1991, USEPA 1992).

Há outras bactérias de importância que já foram isoladas em esgoto bruto, tais como espécies de *Vibrio*, *Mycobacterium*, *Leptospira* e *Yersinia*. Embora esses microrganismos patogênicos possam estar presentes, as concentrações são normalmente muito baixas para causar surtos de doença. O *Vibrio cholerae* é comum e prevalente em muitos países do mundo, inclusive no Brasil, podendo causar doenças no homem como diarreias e até septicemias e sendo a água a forma mais comum de transmissão. O *Mycobacterium tuberculosis* já foi detectado no esgoto particularmente em sistemas coletores de esgotos de instituições responsáveis pelo tratamento de pessoas com tuberculose, ou indústrias alimentícias, como por exemplo, laticínios ou matadouros que manipulam animais portadores (TOZE 1997).

Existem relatos freqüentes de surtos de gastroenterites de transmissão hídrica de causa desconhecida, cujo provável agente etiológico é bacteriano. São causas potenciais dessa doença algumas bactérias gram-negativas, em geral não-patogênicas, tais como a *Escherichia coli* enteropatogênica que podem atingir os recém-nascidos e a *Escherichia coli* enterotoxigênica (TOZE 1997).

Campylobacter coli, além de causar doença em animais, também já foi apontado como causa de doença diarreica em humanos em vários surtos de doença de transmissão hídrica (TOZE 1997).

Muitos protozoários patogênicos para o homem ocorrem nos esgotos, provavelmente, sendo o mais importante *Entamoeba histolytica*, responsável pela disenteria e hepatite amebiana. Esse organismo é encontrado nos esgotos na forma cística, no qual é excretado pelas pessoas infectadas. Após ingestão por um hospedeiro suscetível, através da água ou alimentos contaminados, os cistos iniciam o ciclo infeccioso no intestino e estômago. Essa doença é

bastante comum em muitos países do mundo, sendo um agente de importância secundária desde a década de 50 nos Estados Unidos (TOZE 1997)

Os protozoários *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* destacam-se pela elevada incidência de casos e devido às suas características de resistência aos tratamentos convencionais e capacidade de permanência no ambiente (TOZE 1997).

A maior parte dos casos de diarreia não-bacteriana na América do Norte é causada pela *Giardia lamblia*, estimando-se em 2% da população americana a incidência de infecção, com prevalência mais elevada em crianças. A giardíase assintomática crônica é mais comum em adultos que em crianças. Os principais surtos da doença foram associados ao consumo de água proveniente de sistemas produtores que não utilizavam filtração em areia ou apresentavam deficiências no processo de tratamento. Doentes e portadores eliminam cistos do microrganismo pelas fezes, a forma infectante e ambientalmente resistente, particularmente aos processos de desinfecção utilizados no tratamento da água. Trata-se de uma doença de remissão espontânea em adultos saudáveis, mas extremamente grave em grupos mais vulneráveis, tais como crianças, idosos e imunodeprimidos, ou seja pacientes transplantados, sob tratamento para certos tipos de câncer e principalmente aqueles portadores de AIDS, com o agravante de não se conhecer tratamento efetivo. O principal sintoma é a diarreia aquosa e abundante, podendo ocorrer casos assintomáticos (TOZE 1997).

O protozoário *Cryptosporidium parvum*, responsável pela criptosporidiose, foi reconhecido como patógeno na década de 70, quando foram diagnosticados os primeiros casos, sendo assim uma típica doença emergente. A transmissão da doença ocorre pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos (forma infectante) do protozoário, cuja

resistência ao cloro é bastante elevada. A diarreia é o sintoma mais característico, mas também ocorrem náusea, vômito e cólicas abdominais. Entre 1983 e 1999 foram relatados 69 surtos de criptosporidiose atribuídos principalmente à água, mas também a alimentos contaminados em vários países incluindo Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, alguns países da Europa, Austrália, Nova Zelândia e Japão (HACHICH e SATO 2001).

Vários helmintos patogênicos estão presentes no esgoto, destacando-se entre eles o *Ascaris lumbricoides*, *Taenia saginata*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e o *Strongyloides stercoralis*. O ciclo de vida da maior parte desses organismos é complexo, muitos deles tendo um hospedeiro intermediário. A forma infecciosa pode ser o organismo na forma adulta, de larva, ou os ovos, esses últimos sendo resistentes a condições ambientais adversas, podendo sobreviver aos processos comuns de tratamento dos esgotos (SHUVAL 1986, COOPER 1991).

Os vírus entéricos multiplicam-se no trato intestinal e são eliminados com as fezes dos seres humanos, conhecendo-se mais de 100 desses organismos que são capazes de causar infecção e doença. Os mais importantes são classificados como enterovírus (polio, echo- e coxsackie), rotavírus, reovírus, parvovírus, adenovírus e vírus da hepatite A. Os reovírus e adenovírus causam doenças respiratórias, gastroenterites e infecções oculares e já foram detectados no esgoto. Os rotavírus e o vírus Norwalk são causa bastante comum de diarreias. Vários casos de transmissão de hepatite através da água foram atribuídos ao vírus da hepatite A (TOZE 1997).

SHUVAL e col. (1997) em Jerusalém, Israel, desenvolveram uma avaliação de risco baseada em modelo matemático e dados experimentais tomando-se como referência modelo proposto por HASS e col. (1993) *apud* SHUVAL e col. (1997) para estimar a probabilidade de infecção e doença pela

ingestão de microrganismos em água de consumo, modificado para ingestão de vegetais irrigados com águas residuárias. Para determinar a quantidade de microrganismos patogênicos ingeridos durante o consumo de hortaliças irrigadas com águas residuárias, foi inicialmente avaliada, através de ensaios laboratoriais, a quantidade de água que poderia permanecer aderida nas hortaliças após irrigação. Esses valores foram calculados com águas servidas brutas e tratadas que atendiam aos valores guia da OMS (1989). Na estimativa dessas quantidades levou-se em conta que, em condições de campo, até o momento de consumo final ocorria certo decréscimo e/ou remoção de indicadores de contaminação fecal e patógenos antes da ingestão pelos consumidores como resultado da dessecação, sedimentação, adsorção, competição biológica, radiação ultravioleta solar e pela lavagem das verduras. Estimaram, então, uma redução de 3 logs de vírus totais, desde a fonte até o consumo doméstico. Com base nos ensaios de laboratório e pressupostos assumidos pelos autores, estimaram o risco de contrair hepatite A (doença de transmissão hídrica grave). A dose infectante (N_{50} – que atinge 50% dos indivíduos) seria de 30 a 1.000 UFP e, na pior das hipóteses, 50% dos indivíduos infectados desenvolveriam clinicamente a doença. Nessa mesma direção, estimaram o consumo de hortaliças por um indivíduo em Israel (100 g de pepinos/150 dias ou 100 g de alface/150 dias) e concluíram que haveria a probabilidade de 1/10.000 pepinos ou 1/1.000 folhas de alface conterem vírus entéricos. No caso em que as águas servidas tivessem sido submetidas a tratamento para obedecerem aos valores recomendados pela OMS, o risco seria ainda menor. Para fins comparativos, a Agência Ambiental de Proteção Americana – USEPA – determina que os valores guia para padrões de água de consumo humano devem ser estabelecidos para assegurar que a população não seja submetida a um risco de infecção entérica superior a 10^{-4} (1 caso/10.000 pessoas/ano). Portanto, os valores guia propostos pela OMS proporcionam um fator de segurança de 1 a 2 ordens de grandeza, em relação aos padrões propostos pela USEPA para águas de consumo humano.

2.2.2 Mecanismos de transmissão das doenças e doses infectantes necessárias do agente infectante

As doenças infecciosas podem ser transmitidas por contato pessoal, ingestão ou inalação do agente infeccioso. A infecção pode ser conceituada como a capacidade do microrganismo instalar-se e multiplicar-se no hospedeiro sem necessariamente causar sintomas clínicos da doença. Para que a infecção por um determinado agente tenha início através da exposição à água de reúso, esse agente deve estar presente na comunidade e portanto nos esgotos dessa comunidade. Deve ainda sobreviver aos processos de tratamento do esgoto e estar presente em concentrações suficientes para causar a infecção no momento da exposição.

Após a infecção, o fato da doença ocorrer ou não depende de uma série de relações complexas entre o agente e o hospedeiro, incluindo a patogenicidade do primeiro e a suscetibilidade do segundo.

Uma questão fundamental para avaliação do risco de transmissão diz respeito à dose necessária para causar a doença. Para bactérias, em condições controladas, essas doses variaram entre 10^2 a 10^{10} unidades formadoras de colônias, em 25 a 75% de voluntários expostos, embora seja citado que em muitos casos, quantidades bem menores tenham sido suficientes para causar sintomas clínicos de infecção. A maior parte desses estudos é realizada em populações homogêneas, com voluntários sadios, situação bastante diferente daquela verificada nas comunidades expostas, cujo estado geral de saúde e faixa etária são os mais variados. Existem poucos dados relacionando dose e resposta para vírus entéricos e a maior parte dos estudos desenvolvidos empregaram metodologias sujeitas a algumas críticas, podendo, entretanto, concluir-se que, de maneira geral, doses infectantes desses microrganismos são bem menores que de bactérias (COOPER 1991). Para os protozoários *Giardia lamblia* e *Entamoeba coli*, foi observada uma porcentagem de 60 a 70%

de infecção em pessoas que receberam cerca de 100 cistos dos parasitas, enquanto que para o protozoário *Cryptosporidium* são estimadas doses similares (RENDTORFF 1979; ROSE 1990 *apud* COOPER 1991). O quadro 2 ilustra alguns exemplos de microrganismos patogênicos e suas correspondentes doses infectantes.

Quadro 2 – Doses infectantes de alguns microrganismos patogênicos

Microrganismo	Dose Infectante
<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica	10 ⁶ -10 ¹⁰ UFC
<i>Salmonella typhi</i>	10 ⁴ -10 ⁷ UFC
<i>Vibrio cholerae</i>	10 ³ -10 ⁷ UFC
<i>Shigella flexneri</i> 2A	180 UFC
<i>Entamoeba histolytica</i>	20 cistos
<i>Shigella dysenteriae</i>	10 UFC
<i>Giardia lamblia</i>	<10 cistos
Vírus	1-10 UFP
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1-10 ovos

Adaptado de USEPA 1992

2.2.3 Concentrações e sobrevivência dos microrganismos patogênicos em esgotos sanitários

Vários fatores influem não só na ocorrência como também na concentração de microrganismos patogênicos nas águas de esgotos sanitários, dentre elas o estado geral de saúde da população geradora, a existência de portadores assintomáticos e a capacidade do agente em sobreviver, após eliminação pelo hospedeiro, sob uma variedade de condições ambientais. No quadro 3, é apresentada a variação e ordem de magnitude da concentração de certos microrganismos que podem estar presentes no esgoto bruto.

Normalmente, os vírus não são excretados durante períodos prolongados por indivíduos sãos e sua ocorrência no esgoto varia bastante, sendo as concentrações mais elevadas no verão e no início do outono. Os vírus são, em geral, mais resistentes a condições ambientais adversas que muitas bactérias, embora alguns sobrevivam por períodos de tempo muito curtos em esgotos municipais.

Quadro 3 – Concentrações de microrganismos no esgoto bruto

Microrganismo	Concentração (Número/100mL)
Coliformes fecais	$10^4 - 10^9$
Estreptococos fecais	$10^4 - 10^6$
<i>Shigella</i>	$1 - 10^3$
<i>Salmonella</i>	$400 - 8 \times 10^3$
Ovos de helmintos	$1 - 800$
Vírus entéricos	$100 - 5 \times 10^4$
Cistos de <i>Giardia lamblia</i>	$50 - 10^4$
Cistos de <i>Entamoeba histolytica</i>	$0 - 10$

Fonte: USEPA 1992

Sob condições favoráveis, os microrganismos patogênicos podem sobreviver por longos períodos em culturas, na água ou no solo. Fatores importantes são: quantidades e tipo do microrganismo, conteúdo de matéria orgânica do solo, temperatura (sobrevivência mais prolongada a baixas temperaturas), umidade (favorecendo a sobrevivência), pH, ocorrência de chuvas, luz solar (radiação solar prejudica a sobrevivência), proteção conferida pela vegetação e fauna microbiana competitiva. Os tempos de sobrevivência dos diferentes organismos variam consideravelmente sob diferentes condições. No quadro 4 são apresentados os tempos de sobrevivência típicos para alguns organismos em culturas, água e solo.

A sobrevivência dos vírus pode ser mais longa que das bactérias e ainda pode ser incrementada em determinadas faixas de temperatura. No intervalo de temperatura entre 20 –30°C podem sobreviver por 2 meses, enquanto que a valores próximos de 10 °C, por 9 meses. Há evidências que a sobrevivência dos vírus seria fortalecida em águas poluídas, como resultado de sua adsorção por sólidos suspensos presentes nessas águas (WESTCOT 1997).

Quadro 4 – Sobrevivência de microrganismos patogênicos a temperaturas entre 20°- 30°C

Tempo de Sobrevivência (dias)			
Microrganismo	Águas doces e Esgotos	Culturas	Solos
Vírus^a			
Enterovírus ^b	< 120 normalmente < 50	< 60 normalmente < 15	< 100 normalmente < 20
Bactérias			
Coliformes fecais ^a	< 60 normalmente < 30	< 30 normalmente < 15	< 70 normalmente < 20
<i>Salmonella</i> spp ^a	< 60 normalmente < 30	< 30 normalmente < 15	< 70 normalmente < 20
<i>Shigella</i> spp ^a	< 30 normalmente <10	< 10 normalmente < 5	
<i>Vibrio cholerae</i> ^c	< 30 normalmente <10	< 5 normalmente < 2	< 20 normalmente < 10
Protozoários			
Cistos de <i>Entamoeba histolytica</i>	< 30 normalmente < 15	< 10 normalmente <2	< 20 normalmente < 10
Helmintos			
ovos de <i>Ascaris lumbricoides</i>	Muitos meses	<60 normalmente < 30	Muitos meses

^a Na água do mar a sobrevivência dos vírus é menor, e das bactérias menor ainda

^b Inclui poliovírus, echovírus e vírus coxsackie, ^c A sobrevivência de *V. cholerae* em ambientes aquáticos é controversa.

Fonte: USEPA, 1992

Os ovos de helmintos variam de muito frágeis a muito persistentes. O mais persistente é o ovo de *Ascaris* o qual pode sobreviver por 1 ano ou mais no ambiente. A principal preocupação em relação aos ovos de helmintos se dá quando estão no solo, por serem capazes de infectar/reinfectar o homem (WESTCOT 1997).

A OMS (1989) chama a atenção que, se a entrada de patógenos provenientes de excretas em áreas de irrigação ocorre pela água utilizada, medidas preventivas devem ser tomadas para que o ciclo infeccioso seja interrompido.

STRAUSS (1991) relatou a importância do reúso e da valorização de águas servidas diante de um panorama de crescente demanda de água. Ressaltou, no entanto, os riscos à saúde pública associados a essa prática. Nesse sentido, aplicou modelo desenvolvido por BLUMENTHAL e col.(1989) *apud* STRAUSS (1991) ilustrado na figura 2, o qual descreve os efeitos de medidas de controle, que podem ser aplicadas separadamente ou combinadas, para reduzir riscos de transmissão de doenças quando esgotos são utilizados na irrigação agrícola.

O autor ainda discute que cada país, onde tal prática é adotada, toma distintas medidas de proteção por diversas razões: demanda sócio-econômica e de mercado - onde os agricultores usam fontes de água disponível; falta ou gerenciamento deficiente dos recursos hídricos; falta ou estrutura deficiente para análises laboratoriais (equipamentos e mão de obra qualificada) no monitoramento da qualidade sanitária das águas servidas para reúso, ausência ou rede coletora deficitária e falta de tratamento de esgotos.

Figura 2: Modelo geral de controle para redução de riscos à saúde associadas ao reúso de águas servidas (STRAUSS, 1991).

2.2.4 Incidência de doenças infecciosas associadas ao reúso de água

Relatos sobre a ocorrência de doenças infecciosas associadas à irrigação de culturas com águas residuárias estão comumente associadas à utilização de esgoto sanitário ou de águas residuárias de má qualidade. De acordo com SHUVAL (1990) citado por USEPA (1992), uma revisão dos

estudos epidemiológicos indicou que apenas águas residuárias não tratadas estão associadas à transmissão de doenças infecciosas. Grande parte da literatura relacionada à exposição humana às águas de esgoto sanitário refere-se aos operadores e pessoal de manutenção de estações de tratamento. De acordo com uma revisão da literatura realizada por COOPER (1991), raramente é relatada a ocorrência de doença pela exposição ocupacional nesses trabalhadores. Portanto, é razoável supor que os agricultores expostos às águas residuárias para irrigação estarão sob menor risco de infecção que os trabalhadores das ETEs (USEPA 1992).

O efeito potencial dos aerossóis gerados por ETEs nas comunidades adjacentes também foi bastante estudado. As concentrações de microrganismos nos aerossóis é função de sua concentração na água residuária aplicada e da eficiência na formação de aerossóis pelo processo de irrigação através de pulverização. Infecção ou doença podem ser causadas indiretamente, pela deposição dos aerossóis em superfícies, como por exemplo, nos alimentos, vegetação e roupas. A dose infectante de alguns microrganismos patogênicos é menor por via respiratória que oral, portanto, a inalação pode ser uma via mais provável de transmissão da doença que o contato ou a ingestão. Num estudo realizado no Texas, em uma comunidade rural, na qual se realizava irrigação através de pulverização de água recuperada não-desinfetada, foi observada uma elevação nas concentrações de várias bactérias no ar. Entretanto, não foi observada uma associação entre a ocorrência de doenças agudas (auto-relatadas) e a exposição aos aerossóis, mas verificou-se, através de exames de sangue, uma taxa ligeiramente mais elevada de infecção viral na população mais exposta (CAMANN e col. 1986, citado por USEPA 1992). Assim, embora não existam surtos documentados de doenças associadas à irrigação através de pulverização de águas de reúso, até que sejam disponíveis estudos mais conclusivos sobre a transmissão de doenças infecciosas por microrganismos patogênicos presentes nos aerossóis,

a exposição à água de reúso que não tenha sido submetida a processos altamente eficientes de desinfecção deve ser limitada (USEPA, 1992).

2.3 Utilização de indicadores na avaliação da qualidade de águas

A grande diversidade de microrganismos patogênicos presente nos esgotos e a conseqüente presença potencial na água de reúso torna impraticável o seu monitoramento direto. A utilização de microrganismos indicadores é a estratégia tradicionalmente empregada e viável para avaliar a qualidade sanitária das águas. As bactérias do grupo coliforme têm sido bastante utilizadas com esse objetivo, particularmente o subgrupo dos coliformes termotolerantes, cuja presença no ambiente é uma indicação da presença de material fecal humano ou animal e, portanto, da possível presença de microrganismos patogênicos. Os microrganismos patogênicos entéricos irão reagir aos fenômenos ambientais de forma similar aos coliformes fecais e, assim, as taxas de remoção de coliformes durante a recuperação da água ou processamento do esgoto irão refletir uma redução na taxa de microrganismos patogênicos. Por outro lado, a determinação de coliformes não irá prever de forma adequada a presença de vírus, protozoários ou helmintos. Muitos vírus entéricos, por exemplo, serão mais resistentes à desinfecção química e irradiação do que a maior parte dos indicadores bacterianos. Segundo COOPER (1991), para fins práticos, esse problema é superável, pois embora a eficiência de desinfecção possa ser maior para os coliformes que para os vírus, os primeiros estarão presentes em quantidades muito maiores, portanto, o tempo necessário para redução dos coliformes a baixas concentrações é, em geral, adequado para a redução das concentrações virais "*in situ*" a níveis aceitáveis. Muitos parasitas clinicamente importantes estarão presentes em formas encistadas, sendo assim muito resistentes à desinfecção. Como não se dispõem de indicadores adequados para parasitas, exige-se a utilização de um processo de tratamento reconhecidamente efetivo para a remoção desses organismos. Esquemas de monitoramento padronizados, que incluem a

determinação de coliformes, devem ser adotados para assegurar-se que o processo, como um todo, esteja funcionando adequadamente.

O monitoramento pode ser baseado na determinação dos coliformes totais ou fecais, os primeiros devendo ser utilizados para água de consumo humano tratada. Para a água reciclada, ambos podem ser utilizados, dependendo do meio de distribuição e destino final da água. Entretanto, se a água for armazenada, há chances de contaminação por coliformes não-fecais, seja de fontes externas ou por multiplicação, ambos de pouco significado sanitário, indicando que nesse caso, seria mais adequada a utilização de coliformes fecais.

Outros indicadores bacterianos podem ser igualmente utilizados, tendo sido sugeridos os enterococos, *Clostridium perfringens*, *Mycobacterium*, *Bacteroides* e os vírus de bactérias, os bacteriófagos. O *Clostridium perfringens* está presente em altas densidades nas águas residuárias, é de fácil e rápida detecção e quantificação, seus esporos são resistentes à desinfecção, sendo assim considerado um bom indicador da eficiência dos processos de tratamento.

A utilização de métodos imunológicos e de biologia molecular na microbiologia ambiental vem crescendo e oferecendo possibilidades para detecção de baixas concentrações de microrganismos patogênicos, diretamente em amostras ambientais, como água e solo. Métodos empregando imunofluorescência (FA) são disponíveis para determinação qualitativa e quantitativa de *Giardia* e *Cryptosporidium*. A metodologia que utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) também pode determinar quantidades mínimas de ácidos nucleicos de cada microrganismo, o que permite inferir-se sobre a presença do mesmo. Embora essas técnicas possuam alta sensibilidade e, portanto, maior eficiência no monitoramento, permanece o questionamento

sobre a viabilidade dos microrganismos e o significado sanitário da detecção de níveis tão baixos.

2.4 Regulamentação microbiológica e parasitológica para águas de reúso na irrigação agrícola

As regulamentações relativas ao reúso de águas servidas na agricultura têm evoluído através da influência histórica e tendências sociais. No princípio do século, as normas eram extremamente severas. Para se ter uma idéia, os padrões estabelecidos pelas normas do estado da Califórnia (EUA), no início da década de 70, indicavam uma qualidade microbiológica para a água de reúso de 2,2 coliformes/100 mL (CAMPOS, 1999).

Em 1952, as autoridades sanitárias de Israel publicaram normas sanitárias baseadas nas normas californianas. Em 1973, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) recomendou que a água para irrigação não ultrapassasse a 10^3 coliformes/100mL.

Em 1973, especialistas da OMS (OMS 1989) recomendaram que alimentos consumidos crus deveriam ser irrigados com efluentes biologicamente tratados e desinfetados para alcançar concentração de coliformes fecais de ≤ 100 NMP/100 mL em 80% de amostras analisadas. Em reavaliação feita por um grupo de especialistas da OMS e outras entidades em relação ao reúso de águas residuárias na agricultura e aquicultura e efeitos à saúde humana, esse grupo considerou que não se justificava uma concentração tão restritiva, pois julgaram que não havia evidências epidemiológicas para tanto. Novas diretrizes contendo normas menos restritivas foram estabelecidas para coliformes fecais (10^3 NMP/ 100 mL), entretanto mais restritivas em relação aos ovos de helmintos que reconhecidamente oferecem maior risco à saúde pública, especialmente em áreas endêmicas. O grupo enfatizou a necessidade de

eliminação quase completa de ovos de helmintos nessas águas de reúso (≤ 1 ovo/L), utilizando como indicadores os parasitas *Ascaris*, *Trichuris* e ancilostomídeos.

As recomendações feitas pela OMS (1989) são muito importantes, pois há dados confirmando que contaminação fecal é um dos problemas de saúde em países em desenvolvimento onde 3 milhões de crianças morrem de doenças entéricas a cada ano e milhares estão debilitados por doenças causadas por parasitas intestinais. O nemátoda *Ascaris lumbricoides* infecta anualmente, aproximadamente, 25% da população mundial. Embora as infecções sejam, freqüentemente, assintomáticas, seu efeito pode contribuir substancialmente na morbidade infantil quando associadas a subnutrição, pneumonia, doenças entéricas e deficiência de vitamina A (CARNEIRO e col., 2002) O mesmo autor ainda cita dados de que, no Brasil, 70% das admissões em hospitais do setor público refletem deficiências na área de saneamento ambiental.

Os valores guia estabelecidos pela OMS (1989) tornaram-se referência para a prática de reúso de águas servidas na agricultura e base para investigações científicas sobre o assunto, sejam de convergência ou divergência, reforçando a necessidade de mais estudos epidemiológicos para melhor avaliação da qualidade microbiológica dessas águas ou adotando-os na prática de reúso. A legislação francesa, por exemplo, guia-se pelas recomendações estabelecidas pela OMS (1989) com algumas modificações feitas pelas autoridades sanitárias, estabelecendo que cultivos pertencentes à categoria A não devem ser irrigados por técnicas em que há encharcamento de frutas e verduras, e que irrigação de locais públicos (parques e campos de golfe) por aspersão deve ser efetuada fora do horário de funcionamento. No México, adotou-se critérios microbiológicos segundo situação epidemiológica do país e circunstâncias econômicas. Introduziu-se limite máximo de ovos ≤ 5 ovos de nemátoda/L para águas de reúso utilizadas na irrigação agrícola e para

irrigação irrestrita uma média diária de ≤ 2000 coliformes fecais/100mL e média mensal de ≤ 1000 coliformes fecais/100mL (BLUMENTHAL e col. 2000).

HESPANHOL e PROST (1994) afirmaram que muitos países estão desenvolvendo seus próprios padrões com base nos valores guia propostos pela OMS, enquanto outros estabelecem sua legislação com base nas suas próprias condições e possibilidades, devendo-se levar em conta questões sociais, econômicas, culturais e geográficas. O quadro 5 ilustra as recomendações do Estado da Califórnia e OMS para reúso de águas na agricultura, assim como as recomendações da Agência Americana de Proteção Ambiental (USEPA, 1992).

Quadro 5: Comparação das recomendações de qualidade microbiológica de águas de reúso para utilização na irrigação agrícola e dos critérios de irrigação da OMS (1989) , do Estado da Califórnia (1978) e USEPA (1992).

Organismo/ Instituição	Tipos de Irrigação	Condições de reutilização	Nemátodos Intestinais ^a	Coliformes totais e fecais ^b	Tratamento recomendado
O M S	Categoria A	Irrigação de cultivos consumidos crus	< 1/L	<1000/100mL de CF	Lagoas de estabilização (ou equivalente), configurada para atender as diretrizes
	Categoria B	Irrigação de cereais, cultivos industriais, forrageiras, pastos e árvores	< 1/L	SR	Lagoas de estabilização com 8 a 10 dias de retenção (ou equivalente)
	Categoria C	Irrigação de cultivos da categoria B, sem exposição de trabalhadores/público	SR	SR	No mínimo sedimentação primária
ESTADO da CALIFÓRNIA		Irrigação (aspersão ou superfície) de cultivos comestíveis	SR	<2,2/100 mL de CT	Tratamento secundário seguido de desinfecção
		Irrigação de pasto para animais produtores de leite	SR	<23/100 mL de CT	Tratamento secundário seguido de desinfecção
U S E P A		Irrigação de cultivos consumidos crus	SR	Ausência de CF	Tratamento secundário, filtração e desinfecção
		Irrigação de acesso restrito e alimentos submetidos a processo industrial	SR	<200/100mL de CF	Tratamento secundário seguido de desinfecção

^a Nemátodos intestinais (*Ascaris*, *Trichuris* e *Ancylostoma*) que se expressam como a média aritmética do número de ovos por litro durante o período de irrigação.

^b média do número de coliformes totais por 100 mL determinada a partir dos resultados bacteriológicos dos últimos sete dias em que foi feito o controle.

SR – Sem recomendação / CT- Coliformes totais / CF – Coliformes fecais

Fonte : ASANO e LEVINE, 1998 *apud* CAMPOS 1999., USEPA, 1992.

A legislação vigente no Estado de Israel é apresentada no quadro 6, já que esse é um dos países com mais tradição e experiência na reutilização de águas residuárias para irrigação agrícola.

Quadro 6: Legislação sobre águas de reúso vigente no Estado de Israel em 1994

Tratamento	Crítérios	Condições	Tipo de cultura
---	DBO ₅ 60 mg/L SS 50 mg/L	300 m zona residencial 30 m estradas	Algodão, cereais e forragem
---	DBO ₅ 35 mg/L SS 20 mg/L OD 0,5 mg/L	250 m zona residencial 25 m de estradas	Oliveiras, cítricos, bananas e amendoim
Desinfecção com cloro (60' contato)	DBO ₅ 35 mg/L SS 20 mg/L OD 0,5 mg/L 250 CF/100 mL*	---	Vegetais sem casca e cozidos
Filtração e desinfecção com Cloro (120' contato)	DBO ₅ 15 mg/L SS 15 mg/L OD 0,5 mg/L 12 CT/100 mL*	---	Todo tipo de cultivo e vegetais consumidos crus

CF – Coliformes fecais / CT – Coliformes totais / SS – Sólidos Sedimentáveis / DBO₅ – Demanda Bioquímica de Oxigênio de 5 dias / OD – Oxigênio Dissolvido

Fonte: CAMPOS 1999.

As recomendações e critérios para a qualidade sanitária das águas servidas que se destinam à irrigação dependem, como já visto anteriormente, de cada região, da disponibilidade local de água, do tipo de cultivo e das condições sócio-econômicas dos países que fazem uso desse recurso. Nota-se também que não há uma regulamentação única na determinação dos valores máximos de indicadores de contaminação fecal.

Distintamente do Estado americano da Califórnia, o Estado da Flórida determina a utilização de águas de reúso na irrigação agrícola somente em cultivos consumidos descascados, cozidos ou submetidos a processos térmicos antes do consumo e essas águas devem atender a limites de qualidade como: ausência de coliformes fecais/100 mL e concentração de sólidos suspensos totais e DBO de 5 mg/L e 20 mg/L, respectivamente, e ainda são requeridos

tratamento secundário, filtração e desinfecção do efluente (CROOK e SURAMPALLI 1996).

Nos últimos anos observa-se um crescente interesse quanto à ocorrência e significância de protozoários como *Giardia* e *Cryptosporidium* em águas de reúso, portanto as etapas de filtração e desinfecção são requeridas por alguns Estados americanos para assegurar que a água de reúso esteja livre desses protozoários e de outros patógenos (CROOK e SURAMPALLI, 1996).

O quadro 7 apresenta outros exemplos de regulamentações para reúso de água para a irrigação de culturas agrícolas, em alguns países.

Quadro 7: Regulamentações em relação ao reúso de águas na agricultura.

País	Padrão microbiológico	Restrições
Índia	----	Irrigação proibida para vegetais consumidos cru
México	≤ 1000 CT/100mL para vegetais consumidos cru	Irrigação proibida: alface, repolho, cenoura e espinafre
Peru	≤ 1000 CT/100mL para uso de esgotos sanitários sem tratamento prévio	Irrigação proibida: tuberosas consumidas cruas e vegetais de crescimento rasteiro
Tunísia	Ausência de <i>V. cholerae</i> e <i>Salmonella</i> ≤ 1 ovo de nemátodo/L Toda água de reúso deve sofrer tratamento prévio apropriado	Irrigação proibida: cultivos que são consumidos crus

CT – Coliformes totais

Fonte: STRAUSS 1991

2.5 Coliformes termotolerantes e ovos de helmintos como indicadores de qualidade sanitária para águas de reúso na irrigação agrícola.

As bactérias do grupo coliforme são consideradas como indicadores para a detecção de contaminação fecal no ambiente aquático, pois fazem parte da microbiota normal do trato intestinal de animais homeotermos, evidenciando o risco da ocorrência de patógenos em amostras de água. O grupo de coliformes totais está formado pelos gêneros *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. Estas bactérias são eliminadas através das fezes humanas em uma concentração média de 10^7 organismos/g. Alguns dos representantes do grupo coliforme, entretanto, não são, exclusivamente, de origem fecal e podem ser encontrados no solo e na vegetação. Portanto, a presença de coliformes totais não é uma prova definitiva de contaminação fecal.

Os coliformes termotolerantes (*Escherichia coli* e algumas espécies de *Klebsiella*), subgrupo dos coliformes totais, são de origem fecal e refletem melhor e com mais segurança a presença de contaminação fecal e possíveis riscos associados a presença de fezes em águas.

A fonte de contaminação por parasitas entéricos mais freqüente em águas residuárias são águas de origem doméstica (fezes de animais domésticos e silvestres e lodos de estações de tratamento de esgotos).

A pesquisa da presença de ovos de helmintos é fundamental já que esses organismos representam o principal risco à saúde na utilização de esgotos sanitários na irrigação de culturas agrícolas (HESPANHOL e PROST 1994).

Em Lima (Peru), CASTRO de ESPARZA e MUÑOZ (1990) analisaram 70 amostras de águas residuárias utilizadas na irrigação agrícola. As áreas estudadas foram: Fundo San Agustín, Callao (mistura de esgotos domésticos,

efluentes industriais e água de rio); Fundo Santa Rosa, San Martín de Porres (esgotos domésticos sem tratamento); Lagunas de San Juan, San Juan de Miraflores (esgotos domésticos tratados por lagoas de estabilização); Cienguilla, Rio Lurín (águas superficiais). Os parâmetros analisados foram coliformes totais e fecais, *Salmonella*, protozoários e ovos de helmintos. Os resultados obtidos revelaram que a média geométrica de coliformes totais e coliformes fecais na região de Callao e San Martín de Porres foi de 2×10^8 NMP/100 mL e $8,5 \times 10^7$ NMP/100mL, respectivamente; e *Samonella* de 2×10^3 NMP/100mL. Nos efluentes das lagoas de estabilização de San Juan o nível de coliformes fecais foi de $5,2 \times 10^6$ NMP/100mL, na lagoa primária, $2,5 \times 10^6$ NMP/100mL, na lagoa secundária; e na terciária de $1,7 \times 10^5$ NMP/100mL. Para *Salmonella* não detectaram densidades maiores que 100 NMP/100mL. As águas superficiais do rio Lurín apresentaram médias geométricas de coliformes fecais de 2×10^2 NMP/100mL e não foi detectada a presença de *Salmonella*. Nas águas residuárias brutas a concentração de helmintos e protozoários compreendeu-se entre 100 a 1000 microrganismos/L de amostras analisada. Na lagoa primária detectaram protozoários mas não ovos de helmintos e na lagoa secundária não encontraram protozoários e helmintos. Efetuaram também análises em alimentos irrigados com essas águas e obtiveram os seguintes resultados: nos produtos de Callao e Santa Rosa detectaram presença de *Salmonella* em 49% das amostras analisadas, a densidade de coliformes fecais ficou entre 100 a 1000 NMP/100mL; e em 57% das amostras a densidade de *E.coli* ficou entre 10 a 1000 NMP/100mL; San Juan, San Juan de Miraflores 34% das amostras estudadas apresentavam níveis de coliformes fecais entre 100 a 1000 NMP/100mL e para *E.coli* 58% delas situou-se entre 10 a 1000 NMP/100mL; e Cieneguilla, rio Lurín a concentração de coliformes fecais em 3% das amostras deu-se entre 100 a 1000 NMP/100mL e para *E.coli* entre 10 a 1000 NMP/100mL em 6% das amostras estudadas. Em relação aos protozoários e helmintos detectados nos vegetais produzidos na região de Callao, Santa Rosa foram encontradas as seguintes espécies: *Entamoeba coli*

(68,52%), *Iodamoeba butschlii* (9,26%), *Giardia lamblia* (38,89%), *Endolimax nana* (31,49%), *Ascaris lumbricoides* (24,08%) e *Trichuris trichiura* (12,97%). Em San Martín 59,26% das amostras investigadas continham *Entamoeba coli*, 29,63% *Endolimax nana*, 12,97% *Iodamoeba butschlii*, 35,19% *Giardia lamblia*, 27,78% *Ascaris lumbricoides* e 11,12% *Trichuris trichiuris*. Em San Juan os níveis encontrados foram 80% de *Entamoeba coli*, 6,67% de *Entamoeba histolytica*, 44,67% de *Endolimax nana*, 26,67% de *Iodamoeba butschlii*, 53,34% de *Giardia lamblia*, 53,34% de *Ascaris lumbricoides* e 26,67% de *Trichuris trichiura*. Nas lagoas de San Juan as amostras estudadas de esgotos tratados apresentaram ocorrência de 17,78% de *Entamoeba coli*, 8,89% de *Giardia lamblia* e 4,45% de *Ascaris lumbricoides*. Os autores, em função dos resultados obtidos, concluíram que a qualidade dos produtos agrícolas está diretamente relacionada com a qualidade da água utilizada em sua irrigação e recomendaram que esgotos sanitários destinados a irrigação devem ser submetidos a prévio tratamento e alcançar níveis de no máximo 10.000 NMP de coliformes fecais/100 mL e ausência de ovos de helmintos intestinais. Acreditam também que medidas de saneamento e bons hábitos de higiene das populações expostas a essas águas são muito importantes para minimizar os riscos associados ao reúso de águas servidas na agricultura.

SHUVAL (1991) relatou os efeitos da prática de irrigação utilizando-se esgotos sanitários brutos revelou evidências epidemiológicas de seus efeitos negativos e deletérios à saúde. O autor citou exemplos de estudos pioneiros como o realizado, em 1949, em cidades alemãs o qual mostrava a alta prevalência de *Ascaris* em populações consumidoras de vegetais crus irrigados com esgoto sanitário bruto em relação a populações que consumiam os mesmos tipos de vegetais irrigados com esgoto tratado e em populações que viviam em cidades cuja prática de reúso não era utilizada. Outro exemplo mencionado foi o de Jerusalém, no período de 1935 a 1982, também sobre a ocorrência de *Ascaris* em populações cuja irrigação de vegetais consumidos

crus era efetuada com esgotos sem tratamento algum, essa investigação mostrou que quando se cessava a irrigação com essas águas, a ocorrência de *Ascaris* caía vertiginosamente. O mesmo tipo de pesquisa foi realizada na Índia, em 1973, onde agricultores que se utilizavam de esgotos sanitários na irrigação agrícola apresentavam altas taxas de infecção por *Ascaris* e *Ancylostoma* em relação a outros agricultores.

VAZ da COSTA-VARGAS e col. (1991) analisaram, por 2 anos, a qualidade bacteriológica de esgotos tratados mediante filtro biológico, na irrigação, por aspersão, de alface. Como parte do estudo avaliaram os níveis de contaminação fecal nas folhas de alface comercializadas e a caminho da comercialização. Na água de irrigação da densidade de *E. coli* foi de 5×10^6 NMP/100mL e de 6×10^6 NMP/100mL, no primeiro e segundo ano de análise, respectivamente. Nas folhas de alface produzidas verificaram concentração de *E. coli* de $9,95 \times 10^5$ NMP/100g de peso seco a caminho da comercialização e de $4,04 \times 10^5$ NMP/100g de peso seco, sendo comercializadas.

Estudo epidemiológico conduzido por BLUMENTHAL e col. (1991-92), em seqüência ao realizado por CIFUENTES e col. (1991-92), envolvendo populações cuja exposição às águas servidas eram distintas denominadas: grupo exposto – área de utilização de águas residuárias sem tratamento; grupo semi-exposto – área onde havia estocagem do esgoto antes da utilização; e grupo não exposto que se utilizava de águas pluviais. A qualidade microbiológica do esgoto bruto, registrada por CIFUENTES e col. (1991-92), mostrava densidade de 10^8 coliformes fecais/100mL e 70 ovos de *Ascaris*/L e o esgoto retido nos 2 reservatórios era de 10^4 coliformes fecais/100mL e ausência de ovos de *Ascaris*. O chamado grupo exposto teve aumento de doenças diarreicas em menores de 15 anos, um pequeno aumento em infecções por *Entamoeba histolytica* em crianças entre 5 – 14 anos, nenhum efeito a respeito de infecções por *Giardia* e elevação do risco de infecção por *Ascaris* em todas

as idades. Para o grupo semi-exposto houve diminuição do nível de risco de infecção por *Ascaris* e doenças diarréicas e não houve diferença significativa com o grupo não exposto.

ÁLVAREZ (1993) relatou estudos epidemiológicos realizados, no Vale do Mezquital (México), entre agricultores que utilizavam águas residuárias sem tratamento convencional prévio na irrigação de cultivos de milho e alfafa e em menor proporção aveia, tomate, trigo e feijão. Os estudos epidemiológicos mostraram que os riscos por infecção parasitária (*Ascaris lumbricoides*) e distúrbios gastrointestinais era maior nos grupos de mais elevada exposição (agricultores), dependendo da qualidade microbiológica das águas empregadas na irrigação. A conclusão obtida foi que se deve continuar incentivando o uso de águas residuárias na agricultura, entretanto, ressalta-se a importância dos aspectos sanitários, ambientais e educativos para que esta prática seja segura para a saúde humana.

No Vale do Mezquital, zona central mexicana compreendida por 85.000 ha, cuja irrigação era realizada por águas residuais, CIFUENTES e col. (1993) estudaram a prevalência de doenças diarréicas e infecções intestinais por *Ascaris lumbricoides*, na época de seca. Em famílias de agricultores que utilizavam águas servidas sem prévio tratamento na irrigação agrícola foram consideradas como “grupo de alta exposição”; famílias que utilizavam águas residuais previamente armazenadas em barragens de retenção compuseram o “grupo de exposição moderada”; e famílias que se utilizavam apenas das águas de chuva para a irrigação de suas áreas agrícolas representavam o “grupo controle ou de baixa exposição”. As análises microbiológicas efetuadas mostraram que a densidade de coliformes fecais no esgoto bruto foi de $10^8/100\text{mL}$ e de 70 ovos/L de *Ascaris lumbricoides* e relataram que esses valores diminuíam consideravelmente após armazenamento na barragem. Os resultados evidenciaram maior prevalência de infecção por *Ascaris lumbricoides*

e doenças diarreicas no grupo denominado de alta exposição em todas as faixas etárias estudadas seguida do grupo de exposição moderada e grupo controle.

Dando continuidade aos seus estudos, no ano seguinte CIFUENTES e col. (1994) investigaram a prevalência dos mesmos distúrbios nos mesmos grupos anteriormente avaliados. Os resultados revelaram prevalência de infecção por *A.lumbricoides* e doença diarreica elevada no grupo de alta exposição em todas as faixas etárias e observaram ainda que as prevalências diminuía paralelamente com o grau de exposição aos diferentes tipos de água utilizadas. Os autores ressaltaram a importância de estudos epidemiológicos na busca de medidas de proteção à saúde de populações envolvidas nos programas de reúso de águas residuárias na agricultura.

Em Marrakesh (Marrocos), OUZZANI e col. (1995) compararam por 2 anos a remoção de ovos de helmintos em 3 tipos de tratamento de esgotos a saber: lagoa macrófita, lagoa facultativa e lagoa anaeróbia. Encontraram ovos de helmintos nos esgotos brutos, 88% eram nemátodos (*Ascaris*, *Trichuris* e *Enterobius*) e 12% de cestoda (*Hymenolepis* e *Taenia*). Ovos de *Ascaris* e *Hymenolepis* eram os gêneros predominantes de suas respectivas famílias. O afluente da lagoa macrófita exibia valores de 0 a 120 ovos de helmintos/L (média de 32 ovos/L), da lagoa facultativa valores de 0 a 88 ovos/L (média de 11,7 ovos/L) e da lagoa anaeróbia de 0 a 22 ovos/L (média de 4 ovos/L). Nos efluentes das lagoas macrófita e facultativa não detectaram a presença de ovos de helmintos nas estações fria e quente, o que representa 100% de remoção desses organismos. Na lagoa anaeróbia a porcentagem de remoção foi de 79% e 100% no período frio e quente, respectivamente. Constataram, também, que nos 3 tipos de tratamento a concentração de coliformes fecais excedeu 10^3 UFC/100mL. Os 3 sistemas de tratamento nunca produziram efluentes melhores que a categoria B e no período frio a lagoa anaeróbia produziu

efluente correspondente a categoria C, categorias essas estabelecidas pela OMS (1989). Os autores recomendaram a irrigação de cereais, pastos, árvores e alimentos a serem industrializados, ou seja, produtos de uso restrito, e ainda que agricultores e público deveriam evitar a exposição e essas águas.

Em estudo realizado por BASTOS & MARA (1995) foram avaliadas as condições sanitárias de alface e rabanete irrigados com esgoto tratado por lagoas de estabilização e filtros biológicos em Santo André Alentejo (Portugal) e Leeds (Inglaterra). Os resultados obtidos revelaram que a qualidade sanitária do esgoto tratado por ambos os sistemas apresentava-se levemente inferior ao recomendado pela OMS (1989) e apenas em amostras provenientes do sistema de filtro biológico não se detectou a presença de *Salmonella*. Em análises efetuadas para verificação da qualidade sanitária das hortaliças o maior nível de contaminação encontrado foi da ordem de 10^3 a 10^4 *E. coli*/100g e a presença de *Salmonella* não foi detectada.

CEBALLOS e col.(1995) estudaram a qualidade microbiológica de esgotos sanitários tratados por uma única célula de lagoa facultativa na cidade de Sapé (Paraíba), durante março de 1991 a março de 1992. A lagoa facultativa apresentava as seguintes características: 61 dias de tempo de retenção hidráulica, vazão de 11L/s e carga orgânica de 296 kg DBO₅/hab./dia. Encontraram média de coliformes fecais de $1,2 \times 10^8$ UFC/100mL e *Streptococcus faecalis* de $1,2 \times 10^7$ UFC/100mL; e 2300 ovos/L de *Ascaris lumbricoides* no esgoto bruto. No esgoto tratado a média de coliformes fecais detectada foi de $4,6 \times 10^5$ UFC/100mL e de *Streptococcus faecalis* de $3,2 \times 10^4$ UFC/100mL, demonstrando eficiência de remoção de 99,6% para coliformes fecais e de 99,6% para *Streptococcus faecalis*. Nessa pesquisa houve completa remoção de ovos de *Ascaris lumbricoides*. O sistema de tratamento apresentou alta eficiência na remoção de indicadores bacteriológicos, mas não o suficiente para alcançar o limite recomendado pela OMS (1989) para irrigação

irrestrita. Em relação aos ovos de *Ascaris lumbricoides* alcançou-se a qualidade desejada. Os autores sugeriram a inclusão de mais uma lagoa para a produção de efluente com melhor qualidade bacteriológica, para que se atinja qualidade recomendada para irrigação agrícola irrestrita. Não foram realizados ensaios para detectar outros ovos de helmintos constantes nos valores-guia da OMS (1989), o que seria de grande valor na avaliação dessas águas e tomada de decisão sobre a melhor forma de utilizá-la.

BLUMENTHAL e col. (1996) realizaram estudo epidemiológico em área agrícola no Estado de Hidalgo (México) onde se pratica reúso de águas residuárias na irrigação de culturas. Para efetuar tal estudo, compararam a prevalência de infecção por *Ascaris* em 3 grupos de agricultores e seus familiares. O primeiro deles utilizava esgoto sanitário bruto na irrigação, o segundo grupo de esgoto sanitário após estocagem em reservatórios (períodos de 1 a 7 meses e 2 a 6 meses dependendo da época do ano) e o terceiro grupo de águas pluviais. Observaram que a qualidade sanitária do esgoto após estocagem no primeiro reservatório atendia os valores guia da OMS (1989) para irrigação sem restrições. Os resultados obtidos demonstraram aumento na prevalência de infecções por *Ascaris* em todas as faixas etárias estudadas (2-4 anos, 5-14 anos e ≥ 15 anos) no grupo que se utilizava de esgotos brutos (sem prévio tratamento). No grupo de agricultores cuja água era estocada em um reservatório houve diminuição na prevalência na faixa etária de ≥ 15 anos mas não foi observado decréscimo para crianças. No grupo onde a água foi estocada nos 2 reservatórios notaram níveis de infecção similar ao grupo que se utilizava de águas de chuva para irrigação em todas as faixas etárias analisadas. Os autores citaram trabalhos realizados no nordeste do Brasil e Leeds (Inglaterra). No caso brasileiro, o esgoto bruto que continha >100 ovos/L de helmintos usado na irrigação por *spray* em campos de alface. O efluente da lagoa anaeróbia apresentava uma concentração de 14 a 18 ovos/L; o efluente após lagoa facultativa apresentava valores de 0,2 a 0,4 ovos/L e ausência

desses organismos após passagem pela lagoa de maturação. Quando os pés de alface eram irrigados com esgoto tratado pelas lagoas anaeróbias a contaminação era reduzida para aproximadamente 0,5 ovos por planta. Após o tratamento por lagoa facultativa nenhum ovo foi detectado nas plantas. Em Leeds, quando campos de alface eram irrigados com efluentes contendo 50 ovos/L de *Ascaris galli* foram detectados aproximadamente 1-2 ovos, em média, nas folhas de alface após 5 semanas de irrigação. Quando a contaminação foi reduzida a 10 ovos/L, o número médio de ovos foi de 1 ovo ou menos por planta. Os autores ponderaram a importância do tratamento de esgotos para reúso na agricultura, considerando que 1 ovo/L protege consumidores mas não necessariamente agricultores e familiares, especialmente em sistemas de tratamento não estáveis como o relatado nesse trabalho, em vista disso, os autores sugeriram 0,5 ovo/L como valor máximo permitido. Em relação aos indicadores de contaminação fecal os autores acreditam que uma densidade $\leq 10^4/100\text{mL}$ de coliformes fecais deve ser considerada como valor máximo para irrigação de alimentos com restrição, já que não há fortes evidências de riscos de infecções bacterianas e virais em agricultores.

Em Portugal, MARECOS do MONTE e col. (1996) investigaram a qualidade sanitária de esgoto doméstico tratado (tratamento primário, secundário e lagoa facultativa) para sua utilização na irrigação de campos de grãos, milho, e girassol (para produção de óleo). Os parâmetros microbiológicos estudados foram coliformes fecais, estreptococos fecais e ovos de helmintos. Verificaram média geométrica de coliformes fecais de $2,86 \times 10^6/100 \text{ mL}$ após tratamento primário, de $1,1 \times 10^6/100 \text{ mL}$ após tratamento secundário e após lagoa facultativa de $3,1 \times 10^3/100 \text{ mL}$. Para estreptococos fecais as médias geométricas encontradas foram $5,0 \times 10^5 /100 \text{ mL}$ após tratamento primário, $1,0 \times 10^5/100 \text{ mL}$ após tratamento secundário e $6,8 \times 10^2/100\text{mL}$ na saída da lagoa facultativa. Em relação aos ovos de helmintos, apresentaram média geométrica de 56,2 ovos/L após tratamento

primário, 22 ovos/L após tratamento secundário e ausência após a lagoa facultativa. Os autores consideraram comprometida a qualidade bacteriológica do esgoto estudado, sugeriram desinfecção, implantação de lagoa de maturação e mistura com águas naturais. No que se refere à presença de ovos de helmintos o tratamento mostrou-se adequado.

VAZ da COSTA VARGAS e col. (1996), em Santo André, região de Alentejo (Portugal), conduziram estudo da qualidade bacteriológica de esgotos tratados por sistema de lagoas de estabilização a saber: lagoa aerada seguida por lagoa facultativa. As culturas irrigadas foram alface e rabanete e os sistemas de irrigação empregados foram por inundação e gotejamento. Os resultados revelaram média geométrica de *E. coli* de $5,0 \times 10^3/100\text{mL}$ em 1987 e 1988 e de $1,7 \times 10^3/100\text{mL}$ em 1989, ou seja, qualidade levemente inferior ao recomendado pelas diretrizes da OMS (1989). A qualidade sanitária dos cultivos de experimento foi similar ao encontrado nos mesmos tipos de produtos comercializados no mercado local. Para os autores, em vista dos resultados obtidos, valores de *E. coli* de $10^4/100\text{mL}$ pareceram ser apropriados como valor máximo. Não pesquisaram a ocorrência de ovos de helmintos, o que certamente seria fundamental na avaliação dessas águas, em especial na tomada de decisão sobre que tipo de cultura poderia ser irrigada com essas águas, tipo de sistema de irrigação empregado e embasamento no planejamento de futuros estudos epidemiológicos na região, e ainda, na reavaliação dos valores guia sugeridos pela OMS (1989).

Na cidade de Maracaibo, Venezuela, BOTERO e col. (1997) investigaram a qualidade sanitária de esgotos domésticos tratados por sistema piloto de lagoas de estabilização. O sistema de tratamento contava com 9 lagoas interconectadas em série com a seguinte seqüência: 3 lagoas facultativas e 6 lagoas de maturação distribuídas em 3 sistemas denominados A,B e C, onde o tempo de retenção hidráulico era de 19,3 dias com capacidade de $1,296 \text{ m}^3/\text{d}$.

O esgoto bruto exibiu média de coliformes totais (CT) de $4,1 \times 10^6$ NMP/100mL e de $2,8 \times 10^6$ NMP/100mL de coliformes fecais (CF). No sistema A média de CT e CF na lagoa facultativa foi de $4,6 \times 10^6$ NMP/100mL e $3,5 \times 10^6$ NMP/100mL; $1,7 \times 10^6$ NMP/100mL e $1,3 \times 10^6$ NMP/100mL na primeira lagoa de maturação e $6,8 \times 10^5$ NMP/100mL e $5,2 \times 10^4$ NMP/100mL na segunda lagoa de maturação, respectivamente. Em relação ao sistema B as médias encontradas de CT e CF foram, respectivamente, de $4,3 \times 10^6$ NMP/100mL e $1,1 \times 10^6$ NMP/100mL na lagoa facultativa, $1,5 \times 10^6$ NMP/100mL e $1,1 \times 10^6$ NMP/100mL na primeira lagoa de maturação e na segunda lagoa de maturação de $5,4 \times 10^4$ NMP/100mL e $5,2 \times 10^4$ NMP/100mL. No sistema C, a média de CT e CF foi de $5,1 \times 10^6$ NMP/100mL e $3,6 \times 10^6$ NMP/100mL na lagoa facultativa, na primeira lagoa de maturação encontraram $3,0 \times 10^6$ /100mL e $1,6 \times 10^6$ NMP/100mL e na segunda lagoa de maturação de $1,4 \times 10^5$ NMP/100mL e $1,3 \times 10^5$ NMP/100mL, respectivamente. Os autores avaliaram que o sistema de tratamento, mesmo apresentando alta eficiência de remoção de coliformes totais e fecais (98%), não foi suficiente para alcançar a qualidade bacteriológica sugerida pela OMS (1989), portanto desaconselharam a utilização desses esgotos tratados na irrigação agrícola.

Na Paraíba, KÖNIG e col. (1997) compararam o efeito de 4 tratamentos de irrigação no plantio da forrageira *Pennisetum purpureum* (capim): água potável sem cloro, água potável + NPK adicionado ao solo e esgoto tratado na ETE de Guarabira pelo sistema de lagoas de estabilização em duas diferentes situações: esgoto tratado + NPK adicionado ao solo e sem adição de insumos. Avaliaram a qualidade sanitária dos esgotos utilizados na irrigação do capim segundo as recomendações da OMS (1989) e ainda a produtividade e qualidade sanitária do capim. Detectaram densidade de coliformes fecais no efluente final superior a 10^5 /100 mL, compatível ao padrão sugerido pela OMS para irrigação restrita ($>10^3$ /100 mL). Os autores observaram elevada produtividade do capim com a utilização do esgoto tratado, no entanto a

qualidade sanitária ficou comprometida exibindo valores de coliformes fecais que variaram entre $1,8 \times 10^6$ e $3,3 \times 10^3$ NMP/100g de material verde na estação seca e entre $1,7 \times 10^7$ e $3,2 \times 10^3$ NMP/100g de matéria verde na estação chuvosa. Os autores concluíram que a utilização de esgoto tratado em irrigação é uma boa alternativa desde que observados os procedimentos corretos de irrigação e controle sanitário.

Nas províncias de Rio Negro e Neuquén (Patagônia, Argentina), SEMENAS e col. (1999) avaliaram a presença de patógenos em águas servidas tratadas e utilizadas na irrigação de áreas agrícolas. Das 10 amostras processadas, 6 mostraram-se aptas para reutilização em irrigação agrícola, pois atenderam às recomendações da OMS (1989). Outras amostras acusaram a presença de cistos de *Giardia* sp, ovos de *Hymenolepis nana*, *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*, não reunindo condições para seu uso na agricultura. Os autores ressaltaram a importância do controle de contaminação ambiental como proteção à saúde e os benefícios trazidos pelo reúso de águas servidas na região estudada, no entanto, frisaram a necessidade de controles específicos sobre a presença de patógenos.

Em 1999, no Marrocos, AMAHMID e col. estudaram a contaminação por *Ascaris* e *Giardia* de culturas agrícolas – cenoura, menta e rabanete – irrigados com água fresca, esgoto bruto e tratado por lagoas de estabilização (sedimentação e 16 dias de retenção hidráulica). Os resultados revelaram que não houve contaminação dos vegetais estudados quando irrigados com água fresca e esgoto tratado. Quando irrigados com esgoto bruto apresentaram níveis de contaminação diferentes para cada tipo de cultura analisada. Ovos de *Ascaris* foram encontrados em 25% das amostras de cenouras, 50% das amostras de menta e 33,3% nas de rabanete. Cistos de *Giardia* foram detectados em 33,3% das amostras de cenouras, 50% nas amostras de menta e em rabanetes a ocorrência foi de 83,3%.

Investigação conduzida por BOUHOUM & AMAHMID em 2000, em Marrakech (Marrocos) sobre o impacto à saúde pelo uso de esgoto sanitário na agricultura. Utilizou 2 grupos de crianças para verificação de ocorrência de infecções por protozoários e ovos de helmintos. Um grupo vivia em áreas onde se praticava o reúso de esgoto sanitário (grupo exposto) e o outro não estava exposto a essa condição (grupo controle). Os resultados obtidos mostraram que 73% das crianças da zona de reúso apresentavam infecções por helmintos contra 30% no grupo controle. As infecções por protozoários foram de 72% no grupo exposto, especialmente giardíase e amebíases, contra 45% no grupo controle.

No Marrocos, HABBARI e col. (2000a) , avaliaram a prevalência de parasitas intestinais – *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* – em crianças que viviam em áreas de reúso de esgoto doméstico bruto na agricultura, área de 600 ha no oeste de Beni-Mellal, sendo que o grupo controle situava-se ao norte da cidade. O grupo de exposição às águas residuárias e o grupo controle compreendiam 740 e 603 crianças com idades de 7 a 14 anos, respectivamente. Observaram que o grupo exposto às águas servidas apresentava prevalência de infecção por *Ascaris lumbricoides* de 20,5% contra 3,8% no grupo controle. Para *Trichuris trichiura* a diferença de prevalência não foi significativa entre os grupos estudados: 0,4% no grupo exposto contra 0,3% no grupo controle. As análises microbiológicas realizadas em amostras do esgoto sanitário bruto da cidade acusaram concentração de 8,8 ovos /L de *A. lumbricoides* e 3,4 ovos/L de *T. trichiura*, na interpretação dos autores isso poderia explicar a menor prevalência de *T. trichiura* nas populações estudadas. No mesmo ano (2000b), os autores investigaram infecções parasitárias em crianças em Beni-Mellal. Selecionaram 1343 crianças, dentre as quais 740 viviam em 4 regiões onde se praticava reúso de esgoto bruto na agricultura e 603 provenientes de regiões onde tal prática não ocorria, denominada grupo controle. Constataram que 50,8% das crianças que viviam na área de reúso

apresentavam infecções parasitárias contra 8,2% no grupo controle. Os parasitas identificados foram *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Hymenolepis nana* e *Taenia saginata* com ocorrência de 34,3%, 5,1%, 20,5%, 0,4%, 5,2%, 7,2% e 0,5% na população exposta ao esgoto bruto e de 4,3%, 0,3%, 3,8%, 0,3%, 1,0%, 0,6% e ausência no grupo controle, respectivamente. Apontaram que os esgotos gerados na cidade marroquina em questão podem ser considerados de risco na transmissão de infecções parasitárias e que tratamento adequado desses esgotos e educação sanitária são altamente recomendados.

BLUMENTHAL e col.(2000), revisaram vários trabalhos relativos aos riscos de reúso de águas servidas na agricultura e reavaliaram as recomendações de limites microbiológicos referentes à águas de reúso para irrigação agrícola da OMS (1989) e da legislação californiana propondo novas diretrizes. O quadro 8 ilustra a proposta dos autores. Para os autores, no que diz respeito à irrigação irrestrita, nada indicou a necessidade de revisar-se o limite para coliformes fecais sugerido pela OMS (1989). Quanto ao limite ≤ 1 ovo helminto/L julgaram inadequado quando há condições ambientais de sobrevivência desses ovos (temperatura e irrigação de superfície), nessas condições recomendaram limite de $\leq 0,1$ ovos/L. Em relação à irrigação restrita apontaram a necessidade de se estabelecer limites orientativos para a proteção contra infecções gastrointestinais virais e bacterianas de agricultores e seus familiares e também para populações vizinhas à áreas de utilização de águas servidas. Tais valores, segundo os autores, devem estar vinculados ao tipo de irrigação empregada e das pessoas sujeitas à exposição a esses recursos hídricos. Para agricultores adultos expostos, que se utilizam do método por aspersão, o limite seria de $\leq 10^5$ coliformes fecais/100mL, para agricultores utilitários de irrigação por inundação ou sulcos o limite mais adequado seria de $\leq 10^3$ coliformes fecais/100mL, igualmente seria esse o limite quando jovens menores de 15 anos são expostos, seja como atividade laboral ou lúdica. No

que se refere ao limite para ovos de nemátodos, ≤ 1 ovo/L foi considerado suficiente quando crianças não são expostas, do contrário $\leq 0,1$ ovos/L é recomendado. Quanto às diretrizes para vírus e protozoários não evidenciaram justificativas para limites específicos.

Em 2001, JIMENÉZ e col. abordaram o impacto do uso de esgotos sanitários sem tratamento sobre a saúde pública e avaliaram a remoção de microrganismos em diferentes estágios de tratamento na Cidade do México. As amostras de esgoto bruto revelaram densidade de coliformes fecais de $6,5 \times 10^8$ NMP/100 mL ($4,1 \times 10^7$ a $5,5 \times 10^9$ NMP/100 mL) e média de 24,8 ovos de helmintos/L (6 a 96 ovos/L). No intuito de alcançar os valores guia da OMS (1989) utilizaram-se de tratamento primário avançado (gradeamento e coagulação/floculação), filtro de areia e desinfecção com cloro. A remoção de coliformes fecais após a etapa de filtração foi de 1 log e após adição de 8 mg/L e 10 mg/L de cloro e 3 horas de contato, a remoção observada foi de 4 a 5 logs e de 5 a 6 logs, respectivamente. Valor menor que 10^3 coliformes fecais/100 mL ($5,8 \times 10^1$ /100mL) só foi alcançado quando aplicada dose de 12 mg/L de cloro por 3 horas de tempo de contato. Embora os autores reconheçam a importância da presença de ovos de helmintos nessas água, a remoção desses organismos não foi avaliada.

Quadro 8: Recomendações revisadas de padrões microbiológicos para uso de esgotos tratados na agricultura ^a.

Categoria	Condições de reúso	Grupo exposto	Técnica de irrigação	Nemátodos Intestinais ^{b,c}	Coliformes fecais ^d	Tratamento requerido
A	Irrigação irrestrita					
	A1 Verduras e saladas consumidas cruas, campos de esporte e parques públicos ^e	-Agricultor -Consumidor -Público	Sem restrição	$\leq 0,1^f$	$\leq 10^3$	1)Lagoas de estabilização 2)Reservatórios alimentados em batelada e estocagem 3)Tratamento equivalente (tratamento secundário convencional seguido de lagoas de polimento ou filtração e desinfecção)
B	Irrigação restrita					
	Cultivos industriais, pastos, cereais, gramíneas e árvores	B1 Agricultores (exceto crianças <15 anos) e comunidades próximas	<i>Spary ou sprinkler</i>	≤ 1	$\leq 10^5$	1)Lagoas de estabilização incluindo lagoa de maturação 2)Como em categoria A 3)Como em categoria A
		B2 = B1	Inundação/sulcos	≤ 1	$\leq 10^3$	Igual categoria A
		B3 Agricultores (incluindo crianças <15 anos) e comunidades próximas	Sem restrição	$\leq 0,1$	$\leq 10^3$	Igual categoria A
C	Como categoria B quando a exposição de agricultores e público não ocorrer	Nenhum		Não aplicável	Não aplicável	Requerido pré-tratamento de acordo com o tipo de irrigação, mas deve haver sedimentação primária.

^a Em casos específicos, condições epidemiológicas locais, fatores socioculturais e ambientais devem ser levados em conta e os valores guia podem ser modificados.

^b *Ascaris* e *Trichuris* e ancilostomídeos, os limites pretendem proteção contra riscos advindos de protozoários parasitas.

^c Durante a época de irrigação (se o tratamento for por meio de sistemas de lagoas de estabilização ou reservatórios, os quais são configurados para obtenção de número de ovos de helmintos dentro dos valores guia, não há necessidade de monitorar-se a qualidade do efluente rotineiramente).

^d Durante a época de irrigação a quantificação de coliformes fecais deve ser efetuada preferencialmente semanalmente ou pelo menos mensalmente.

^e Limite restritivo (≤ 200 coliformes fecais/100 mL) é apropriado para áreas verdes públicas onde pode haver contato direto com o público.

^f O limite pode ser aumentado para < 1 ovo/L se: (i) condições climáticas são de seca e calor e irrigação de superfície não for utilizada e (ii) se o tratamento de águas residuárias for suplementado com campanhas de ingestão de antihelmínticos em áreas de irrigação.

^g No caso de árvores frutíferas, a irrigação deve ser suspensa 2 semanas antes da colheita e as frutas não devem ser recolhidas do solo. Irrigação por aspersão não deve ser empregada.

Fonte: BLUMENTHAL e col.2000.

Estudo seccional efetuado por BLUMENTHAL e col. (2001) objetivaram avaliar os efeitos de estocagem de esgoto sanitário como forma de tratamento para reduzir riscos de infecções por *Ascaris* e doenças diarreicas atribuíveis à exposição a esgotos brutos na irrigação agrícola, efeito da estação de seca e chuva e atendimento aos valores guia da OMS (1989) referentes a presença de ovos de helmintos para a proteção de agricultores e familiares. O esgoto bruto apresentava alta concentração de coliformes fecais e ovos de helmintos, média geométrica de $6,0 \times 10^7$ coliformes fecais /100mL e uma faixa de 90 a 135 ovos/L. O efluente proveniente dos reservatórios I e II exibiam média geométrica de 10^5 /100 mL para coliformes fecais e <1 ovo de helminto/L e $4,0 \times 10^3$ /100 mL para coliformes fecais e ausência de ovos de helmintos, respectivamente. Os autores obtiveram que o risco de infecções por *Ascaris lumbricoides* na população exposta aos esgotos brutos foi maior na estação seca que na chuvosa, similar em crianças maiores de 5 anos nas duas estações. Para doenças diarreicas verificaram que na estação seca o risco foi maior e mais significativo que no período chuvoso, em todas as idades. Quanto à estocagem observaram que a exposição ao efluente de um reservatório foi fortemente associado ao aumento do risco por infecção por *A.lumbricoides*; para os dois reservatórios o risco verificado foi menor mas ainda significativo. Para doenças diarreicas o fator de risco foi significativo para a exposição ao efluente do primeiro reservatório, mas o mesmo não ocorreu à exposição ao segundo reservatório. Na conclusão dos autores a redução na concentração de ovos de helmintos/L após estocagem no primeiro reservatório não alcança

qualidade sanitária adequada para proteger a população exposta ao risco de infecção por *Ascaris lumbricoides* mesmo estando de acordo com as recomendações da OMS (1989), quando ocorre a irrigação por inundação, tratamento não típico (tempo de retenção variável) e possibilidade de entrada de esgoto bruto na rede de irrigação. Esclareceram, entretanto, que estudos equivalentes ou correspondentes a esse devem ser feitos no intuito de verificar que se utilizando-se de tratamentos estáveis como lagoas de estabilização ou estocagem em reservatórios operados como reatores em bateladas são apropriados no tratamento de esgotos usados na irrigação e na proteção da saúde de agricultores utilitários dessas águas e seus familiares.

SALGOT e col., 2001, analisaram o uso de indicadores na verificação da qualidade microbiológica de águas servidas para agricultura. Criticaram o uso do indicador de contaminação fecal *E. coli*, por apenas refletir a qualidade bacteriológica e não a presença de outros patógenos. Pontuaram que a detecção de outros indicadores se faz necessária, porém, que exige escolha cuidadosa devendo-se levar em conta os tipos de águas residuárias. Os autores elaboraram quadro (quadro 9) o qual mostra tipos de patógenos de veiculação hídrica e seus possíveis indicadores e observações relativas ao seu uso.

Na cidade de Arad (Israel), ORON e col. (2001), relataram uma concentração de coliformes fecais de 10^6 NMP/100mL em esgoto sanitário tratado por lagoas de estabilização utilizado na irrigação de parreiras. Verificaram que após armazenagem e subsequente uso há a eliminação de coliformes fecais em amostras analisadas de solo, e ainda não detectaram a presença de ovos de helmintos nessas amostras.

Quadro 9: Tipos de patógenos de origem hídrica e possíveis indicadores que podem ser utilizados.

Tipos de organismos	Indicadores	Observações
Bactérias	<i>E. coli</i> Coliformes fecais Coliformes totais <i>Streptococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Salmonella</i> <i>Clostridium</i>	Determinação de Coliformes fecais é mais usual e está sendo substituída pela determinação de <i>E. coli</i> .
Vírus	Enterovírus Vírus da Hepatite A Bacteriófago	Não existe nenhum indicador aceitável até o momento.
Helmintos – Nemátoda	<i>Ascaris</i> <i>Trichuris</i> <i>Ancylostoma</i>	Muitos resultados negativos em vários países
Outros helmintos	Não conhecidos	Em alguns casos importante relação com a saúde animal
Protozoa(incluindo <i>Giardia</i> , <i>Cryptosporidium</i> , Amebas e <i>Balantidium</i>)	Não conhecido.	Procedimentos analíticos não foram ainda bem desenvolvidos
Fungos, toxinas de algas	Não conhecido	Poucos casos detectados.

Fonte: Salgot e col. (2001)

Na ilha de Clermont-Ferrand (França) DEVAUX e col.(2001) realizaram pesquisa epidemiológica sobre o impacto do uso de esgoto tratado, por sistema de lagoas de estabilização e aplicação na irrigação de culturas de milho, sobre a saúde de agricultores e seus familiares. Compararam a qualidade bacteriológica do esgoto tratado e águas superficiais da região utilizadas na irrigação agrícola. Observaram que amostras do efluente secundário e terciário exibiam concentrações de coliformes fecais de 10^5 UFC/100mL e <1000 UFC/100mL, respectivamente. As amostras de águas superficiais oriundas de 3 rios da região, designados A, B e C apresentaram concentração de coliformes fecais de 10^3 UFC/100mL, 10^5 UFC/100mL e 10^5 UFC/100mL, respectivamente. A qualidade bacteriológica das águas dos rios B e C foi equivalente à encontrada no efluente secundário. Os estudos epidemiológicos realizados como maior consumo de medicamentos, queixas de doenças diarreicas e distúrbios gastrointestinais, dermatoses e doenças respiratórias não

evidenciaram qualquer ocorrência de problemas epidêmicos. Ressaltaram, entretanto, que os resultados obtidos não são nenhuma garantia de inocuidade do uso de águas servidas a longo prazo e frisaram a necessidade de realização de estudos epidemiológicos.

Em 2001, na Tailândia, KEAWWICHIT e col. pesquisaram a qualidade sanitária de esgoto doméstico tratado por sistema de lagoa aerada e água de irrigação oriunda de corpos d'água, ambas utilizadas em campos de *Brassica oleracea* var *acephala* – vegetal comestível. Encontraram número e tipos de bactérias similares em ambas as amostras de água como: *Escherichia coli*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio cholerae* não O1 e não O139, parasitas não foram detectados. Os autores concluíram que o uso do esgoto tratado para irrigação pode ser utilizado com segurança do cultivo agrícola em questão.

AMAHMID e col. (2002), investigaram a presença de ovos de *Ascaris* e cistos de *Giardia* em esgoto sanitário bruto e tratado por sistema de lagoas de estabilização (2 lagoas em série com tempo de retenção hidráulica de 16 dias). em Marrakech (Marrocos) por um período de 24 meses. Constataram a presença de ovos de *Ascaris* em 39,5% (19/48) das amostras de esgoto sanitário bruto analisadas em concentrações variando de 0,3 a 6,1 ovos/L, com média geométrica de 1,7 ovos/L. Cistos de *Giardia* foram encontrados em 50% (24/48) das amostras investigadas, exibindo média geométrica de $2,8 \times 10^3$ cistos/L (29 a $8,3 \times 10^3$ cistos/L). Em amostras de esgoto tratado não observaram a presença de ovos de *Ascaris* e cistos de *Giardia* foram encontrados em apenas 4,2% (2/48) das amostras estudadas, indicando que esses organismos foram satisfatoriamente removidos pelo sistema de tratamento utilizado. Em trabalho realizado por STOTT e col. (1994) no nordeste brasileiro *apud* AMAHMID e col.(2001), encontraram concentração média de 50 ovos/L de *Ascaris* em esgoto sanitário tratado. Assim como essa pesquisa citada pelos

autores, outras foram realizadas e mostraram resultados diferentes como no Canadá onde relataram-se 150 ovos de *Ascaris*/L em esgoto bruto (GRAHAM, 1981 *apud* AMAHMID 2001) e no Quênia com concentrações da ordem de 17,5 a 133,3 ovos/L em esgoto bruto.

Na cidade de Beslimane (Marrocos) KOURAA e col. (2002) avaliaram a eficiência de remoção de coliformes fecais e ovos de helmintos por sistema de lagoa de estabilização, durante 12 meses, e ainda a viabilidade da utilização do esgoto tratado na irrigação de áreas agrícolas. O sistema de tratamento consistia de unidade de pré-tratamento, lagoas anaeróbias (2 a 3 dias de retenção hidráulica), lagoas aeradas (3 a 4 dias de retenção) e lagoas facultativas (12 dias de retenção), apresentando reservatórios para estocagem do esgoto tratado (40 dias). Os autores obtiveram eficiência na remoção de coliformes fecais de 6 a 7 logs e ausência de ovos de helmintos, satisfazendo as recomendações sanitárias da OMS (1989) para irrigação agrícola de culturas sem restrição alguma.

Na cidade de Junín, província de Mendoza (Argentina), FASCILOLO e col. (2002) avaliaram a qualidade sanitária do esgoto doméstico tratado por valo de oxidação, no período de 1998 a 1999, utilizado na irrigação de alho e cebola. As características microbiológicas do esgoto tratado foram: média geométrica de *E. coli* de $2,14 \times 10^3$ NMP/100mL (valor máximo de $4,43 \times 10^5$ NMP/100mL e mínimo de $8,31 \times 10^2$ NMP/100mL), presença de *Salmonella* e média aritmética de ovos de helmintos de 2,5 ovos/L (valor máximo e mínimo de 23 e < 1 ovos/L, respectivamente). Os autores observaram que houve maior produtividade dos cultivos de alho e cebola quando da utilização de esgotos tratados do que com águas superficiais. Que os produtos estavam dentro dos padrões microbiológicos de aceitabilidade para consumo após 90 dias e 55 dias para alho e cebola, respectivamente, após a colheita.

MADERA e col. (2002), no Valle del Cauca (Colômbia), estudaram o potencial de reúso de esgoto tratado na irrigação de cana de açúcar. O tratamento dos esgotos consistia de lagoa anaeróbia, lagoa facultativa e lagoa de maturação com tempo de retenção hidráulico de 12 dias, sendo 9 dias nas lagoas anaeróbia e facultativa e 3 dias na lagoa de maturação. As amostragens semanais foram realizadas durante 55 dias nos meses de outubro a dezembro de 1999 (estação seca). Para irrigação dos campos de cana de açúcar, próximo ao sistema de tratamento, o esgoto utilizado era proveniente da lagoa facultativa. A qualidade microbiológica de esgoto bruto apresentava média geométrica de coliformes fecais e de estreptococos fecais de $8,3 \times 10^7$ e $4,7 \times 10^5$ /100mL, respectivamente, e 440 ovos de helmintos/L, sendo os parasitas encontrados: *Ascaris*, *Taenia*, *Trichuris*, *Enterobius*, *Hymenolepis nana* e *Hymenolepis diminuta*. Após a lagoa facultativa, a média geométrica de coliformes fecais foi de $7,0 \times 10^4$ /100mL, apresentando remoção de 3 logs, e na lagoa de maturação de $6,6 \times 10^3$ /100mL. Para estreptococos fecais a média geométrica após a lagoa facultativa foi de $1,9 \times 10^4$ /100mL e após maturação de $9,4 \times 10^3$ /100mL. Não detectaram a presença de ovos de helmintos após a lagoa facultativa, mesmo com 9 dias de retenção hidráulica, levemente inferior ao encontrado no nordeste brasileiro por MARA & SILVA (1986), cuja retenção hidráulica era de 11 dias. Como análise comparativa, amostras do rio Cauca foram analisadas e revelaram concentrações de coliformes fecais de $2,0 \times 10^5$ a $2,0 \times 10^7$ /100mL, o efluente da lagoa de maturação apresentou melhor qualidade microbiológica. Os autores concluíram que o sistema de tratamento produz efluente viável para irrigação de cultivos restritos, pois não atende aos valores-guia da OMS (1989) para cultivos enquadrados na categoria A (irrestritos) para coliformes fecais para irrigação irrestrita, mesmo estando próximo aos valores sugeridos.

Em pesquisa conduzida por CUTOLO (2002) foi demonstrada a presença de ovos de helmintos em esgoto sanitário tratado por lodos ativados na Estação

de Tratamento de Esgotos de Barueri, onde se efetua o tratamento de esgotos da Região Metropolitana de São Paulo (SP). As espécies mais freqüentemente encontradas foram *Ascaris*, *Enterobius*, *Hymenolepis* e *Strongyloides*. Também foram detectados, embora menos freqüentes, ovos de *Taenia* e *Trichuris* e raramente de *Clonorchis*, *Dyphyllobotrium* e *Paragonius*. Destacou-se que a ocorrência desses organismos representa o principal entrave no reúso de águas no espaço urbano.

ARAÚJO (2003) pesquisou a ocorrência de ovos de helmintos em esgotos sanitários tratados por diferentes sistemas de tratamento na cidade de Feira de Santana (BA). As estações de tratamento de esgoto apresentavam diferentes configurações, sendo alguns sistemas mistos constituídos por reatores anaeróbios e aeróbios, e em alguns casos sistemas de lagoas de estabilização. Os resultados obtidos demonstraram a presença de ovos de helmintos em todas as amostras examinadas. Dentre os ovos mais freqüentes estavam *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma duodenale*, *Hymenolepis nana* e *Hymenolepis diminuta*. Em relação aos coliformes fecais, a concentração dessas bactérias variou de 10^5 a 10^7 NMP/100mL no esgoto tratado. Se o destino dessas águas fosse a irrigação agrícola, uma possibilidade existente, não apresentariam conformidade às recomendações da OMS (1989) para irrigação irrestrita e restrita da categoria B.

Pode-se observar, de acordo com a literatura consultada, que há muito ainda o que se estudar e debater em relação à qualidade sanitária de águas residuárias na irrigação agrícola como pontuou SALGOT e col.(2001) a respeito da importância de novos indicadores ou então BLUMENTHAL e col. (2000) revisando os padrões microbiológicos sugeridos pela OMS (1989) e Estado da Califórnia (USA), o que recomenda estudos epidemiológicos nessa área. Também de grande relevância é a realização de análise de risco acerca da

segurança da reutilização dessas águas e a determinação do risco aceitável, especialmente, em meios urbanos, que apresenta alto risco de contato direto para o homem, podendo resultar na transmissão de microrganismos patogênicos.

2.6 *E.coli* potencialmente patogênicas e O157 em esgotos sanitários

A presença de *E. coli* em água, além de ser importante por indicar contaminação fecal, pode representar risco à saúde humana, pois algumas linhagens são associadas com diarreia humana, principalmente a diarreia infantil.

São conhecidas categorias de *E. coli* reconhecidas como agentes etiológicos da diarreia humana. *E. coli* entropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* entroagregativa (EaggEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC) (SEARS e KAPER 1996; NATARO e KAPER 1998; CAMPOS e TRABULSI 1999) Cada uma dessas categorias apresenta características diferentes relacionadas à patogenicidade, síndrome clínica e epidemiológica, assim como estão associadas a grupos específicos de antígenos somáticos e flagelares.

E. coli enterohemorrágica (EHEC) emergiu recentemente como causa predominante de colite hemorrágica em seres humanos, caracterizada por sintomas como diarreia sanguinolenta e dores abdominais, podendo progredir para quadros bastante severos. A principal complicação advinda da colonização de *E. coli* EHEC é a síndrome hemolítica urêmica (SHU) (FENG, 1995).

A patogenicidade de linhagens EHEC aparece associada à produção de citotoxinas – Shiga-like I e II (SLT-I e STL-II), que parecem atuar na indução da diarreia (CDC 1995; SEARS e KAPER 1996; CAMPOS e TRABULSI 1999).

E. coli O157, por suas características, faz parte da categoria das linhagens enterohemorrágicas (EHEC), sendo que a pesquisa da presença desse agente etiológico é de muita relevância considerando o importante papel que esse patógeno vem assumindo nos surtos de diarreia veiculada por alimentos e também pela escassez de informações a seu respeito em nosso meio.

Dentre os sorotipos de EHEC, a *E. coli* O157:H7 é o sorotipo predominante desse grupo e que mais freqüentemente associa-se a infecções humanas (FENG 1995). O sorotipo O157 foi primeiramente considerado responsável por surtos alimentares em 1982 (FENG,1995). Em 1985 sugeriu-se rota hídrica de Vero-toxina (VETC) produzida por *E. coli* O157 (CHALMERS e col. 2000) e desde então surtos relacionados com indesejável qualidade sanitária de águas têm sido relatados.

Apesar do interesse que vem despertando, as características epidemiológicas desse agente ainda não estão totalmente claras (KARCH & BIELASZEWSKA, 2001) mas alguns aspectos podem ser mencionados: a) atinge, especialmente, crianças menores que 10 anos e idosos; b) a transmissão dá-se por alimentos, água e pessoa a pessoa; c) infecções têm sido relatadas em países do hemisfério norte (EUA, Japão e Europa), no entanto nos países do hemisfério sul (Brasil, Argentina, Austrália e Bangladesh), a freqüência de isolamento é baixa (FENG 1995; NATARO e KAPER 1988; IRINO e col.2002; BLANK e col.,2003).

O principal reservatório de *E. coli* O157 é o trato intestinal de gado e ovelhas e de outros animais (porcos, cabras, cavalos, cães, pássaros) (NATARO e KAPER 1998; MAULE 2000), sendo que as fezes desses animais podem apresentar grandes quantidades dessas bactérias.

A capacidade dessas bactérias sobreviverem em fezes, pastos e associadas a sistemas aquáticos traz implicações importantes em relação a cultivos agrícolas em áreas onde há aplicação de esterco animal na adubação e irrigação com águas contaminadas e ainda, no contato direto do homem com animais e solo contaminado (MAULE 2000). NATARO e KAPER (1998) relataram que em estudo soroepidemiológico, no Canadá, incidência elevada de níveis de anticorpo LPS O157 em família que viviam em fazendas quando comparado aos níveis encontrados em famílias que viviam em ambiente urbano. O mesmo ocorreu quando se pesquisou níveis de anticorpos STx1. A exposição de famílias rurais a esses microrganismos foi associada a infecções subclínicas, condição essa que lhes conferiu aquisição de imunidade.

As condições de sobrevivência de *E. coli* O157 no ambiente estão estreitamente relacionadas a temperatura. Segundo CHALMERS e col. (2000), VTEC O157 apresenta capacidade de sobrevivência na água por vários dias a baixas temperaturas. O decaimento de 5 logs foi verificado após 35 dias em temperatura de 20°C, e de 3 –5 logs após 70 dias a 5°C. RICE e col.(1992) *apud* CHALMERS (2000) onde se verificou que cepas VTEC O157 mostraram sobrevivência similar ao de *E. coli* não patogênica isolada de amostras ambientais.

As informações sobre a ocorrência de *E. coli* O157 em águas naturais e esgotos, tratados ou não, são bastante escassas. SHEIKH e col. (1999) que investigaram a presença de *E. coli* O157:H7 em esgotos brutos, após

tratamento secundário e água reciclada desinfetada; e águas de tanques de estocagem utilizada como controle. Os esgotos tratados são empregados na irrigação de culturas agrícolas em uma área de 47.000 ha em Monterrey, Califórnia (EUA). Os resultados mostraram ausência de *E. coli* O157:H7 em todas as amostras coletadas e analisadas.

CHALMERS e col. (2000) evidenciaram o risco da possibilidade de esgotos brutos contaminarem, acidentalmente, sistemas de distribuição de águas e essas águas contaminadas tornarem-se veículos da VTEC O157 e causar infecções a seus consumidores, já que a dose infectante é baixa, de 10 – 100 organismos. Relataram alguns casos de detecção de VTEC O157 em reservatórios de água na Filadélfia (EUA) e em águas recreacionais associadas a surtos de VTEC O157 em Portland (Oregon, EUA), Illinois (EUA), África do Sul e Londres.

Na África do Sul, MÜLLER e col. (2001) pesquisaram a ocorrência de *E. coli* O157 em distintos recursos hídricos. Coletaram amostras de 9 diferentes pontos do rio Klip, totalizando 108 amostras; 14 amostras do ponto de entrada da represa Vaal; 51 amostras dos pontos de captação dos rios Svikerbosrant e Riestsprint; e 19 amostras de água de esgoto. Os resultados obtidos revelaram ausência de EHEC O157 em todas as amostras avaliadas, embora tenham observado a presença de STx1 em 2 amostras de rio e STx2 em água de rio em apenas uma ocasião estudada. Detectaram presença de hemolisina em 7 amostras de água de rio, sendo que em uma oportunidade ocorreu também a presença de STx1 e em outra STx2. Os autores evidenciaram que o risco de adquirir-se infecção e doença pela ingestão de águas é baixo, mas que a presença de fatores de virulência de EHEC podem constituir-se em risco à saúde.

Segundo IRINO e col. (2002) e BLANK e col. (2003) cepas de *E. coli* O157 apresentam baixa frequência em nosso país. Na pesquisa de IRINO e col. (2002) analisaram 3 cepas de *E. coli* provenientes de amostras clínicas da cidade de Campinas (SP) com suspeita de pertencerem ao sorotipo O157, já que as avaliações fenotípicas efetuadas apresentavam compatibilidade a O157. Consideraram essas cepas como *E. coli* O157:H7 STEC. Não foi realizada, entretanto a caracterização genotípica desses isolamentos. O segundo grupo de pesquisadores encontrou cepas suspeitas de pertencerem ao sorotipo O157 em amostras clínicas, mas análises genotípicas e fenotípicas demonstraram que as suspeitas não eram verdadeiras.

2.7 Presença de *Salmonella* em esgotos sanitários utilizados na irrigação agrícola

O gênero *Salmonella* é considerado como um patógeno de importância na avaliação sanitária de águas servidas para irrigação agrícola por sua forte associação ao uso desses resíduos em campos de cultivo. Devido a sua larga distribuição (tanto em países temperados como tropicais), ocorrência em seres humanos e animais homeotermos, significativa resistência a adversidades ambientais, sendo capazes de multiplicação fora de seus hospedeiros (STRAUSS 1986). Segundo PALACIOS e col. (2001), *Samonella* apresenta limitações de sobrevivência baixo certas condições ambientais como alta concentração de nutrientes em solos, especialmente os irrigados com águas residuárias, e condições de temperatura e umidade favoráveis à sobrevivência e multiplicação. Essas hipóteses não estão de acordo com relatos de VAZ da COSTA-VARGAS e col. (1991) que afirmaram que a sobrevivência de bactérias patogênicas, como *Salmonella*, referem-se a regiões de clima temperado e que não há validade em se

tratando de regiões de clima quente, já que a sobrevivência desses microrganismos está fortemente vinculada às condições climáticas.

EMPARANZA-KNÖRR e TORRELLA (1995) e FANE e col.(2002) consideraram a possibilidade de proliferação de *Salmonella* em microhabitats anaeróbios presentes em lagoas e a possibilidade de crescimento dessas bactérias no meio ambiente.

Alguns trabalhos científicos mostram a importância do controle do gênero *Salmonella*, como o de MARECOS de MONTE e col. (1996) em Portugal, no qual colocaram o grupo de bactérias patogênicas, especialmente *Salmonella*, logo após ovos de helmintos como grupo de alto risco para a saúde pública quando se trata de reúso de águas servidas na irrigação de culturas agrícolas. Os autores recomendaram que o monitoramento da presença de *Salmonella*, quando tecnicamente possível, seja incluído na avaliação da qualidade sanitária dessas águas, principalmente no caso de irrigação de verduras/hortaliças; outros autores como EMPARANZA-KNÖRR & TORRELLA (1995) têm a mesma visão do assunto. O monitoramento torna-se ainda mais importante em regiões endêmicas para *Salmonella* como em Campina Grande (Paraíba) relatado por ARRIDGE e col.(1995).

Em Santiago, Chile, houve epidemia de grandes proporções de febre tifóide, no período de 1973 a 1983, fortemente associada ao uso de esgoto sanitário na irrigação agrícola (SHUVAL 1993). As condições que evidenciaram essa associação foram: a) incidência elevada de febre tifóide na região metropolitana de Santiago onde se praticava irrigação de cultivos de alimentos crus no período de seca e início do outono; b) a incidência de febre tifóide da região de Santiago apresentava-se bastante elevada em relação à média do país; c) distribuição dos casos de febre tifóide apresentava-se praticamente homogênea nos diferentes bairros da região

atingida; d) a incidência entre crianças (0-2 anos) e jovens era mais baixa, esses grupos populacionais são mais suscetíveis mas nesse caso estão menos expostos por, geralmente, não ingerirem alimentos crus; e) a detecção de *Salmonella typhi* em amostras de esgoto utilizado na irrigação agrícola; f) a promulgação de lei pelo Ministério da Saúde do Chile proibindo utilização de esgotos sem tratamento na irrigação de culturas consumidas cruas (tomate, alface e repolho), representou uma queda de 50% na incidência de casos de febre tifóide em Santiago, ainda que exibindo níveis mais elevados do que o restante do país. O autor ressaltou a importância do tratamento das águas servidas para prática de irrigação e da devida atenção dedicada por parte das autoridades sanitárias (SHUVAL 1993).

No sudeste da Espanha, EMPARANZA-KNÖRR & TORRELLA (1995) estudaram a presença de *Samonella* e remoção desse patógeno em sistemas de lagoas de estabilização. O sistema consistia de 3 lagoas anaeróbias em paralelo (A, B e C) e 2 lagoas facultativas também em paralelo. Os autores informaram que o sistema de tratamento apresentava-se sobrecarregado devido às características físico-químicas analisadas além da presença da sulfobactéria *Thiocapsa reseopersicina*, indicando condições anóxicas na lagoa facultativa. Em todas as amostras analisadas constatarem a ocorrência de *Salmonella*, variando na entrada do sistema de 40 a 4600 NMP/100mL e de 23 a 430 NMP/100mL no efluente tratado. Enfatizaram a importância do controle de patógenos humanos como *Salmonella* em efluentes tratados, especialmente efluentes resultantes de sistemas sobrecarregados, e que são utilizados na irrigação de hortaliças e outros vegetais. Os autores não propuseram nenhuma medida para a melhoria do efluente produzido.

Em 1995, ARRIDGE e col. pesquisaram a remoção de *Salmonella* e *Vibrio cholerae* O1 em dois sistemas de tratamento de esgotos por lagoas

de estabilização em Campina Grande, Paraíba. O primeiro sistema compreendia 10 lagoas em série, sendo 1 lagoa anaeróbia, 1 lagoa facultativa e 8 lagoas de maturação, exibiam tempo de retenção hidráulico de 1 dia na lagoa anaeróbia e 2 dias em cada uma das outras lagoas do sistema, correspondendo a um tempo total de 19 dias. O segundo sistema constituído por 17 lagoas em paralelo apresentava a seguinte formação: 2 lagoas anaeróbias apresentando 1 dia de tempo de retenção em cada lagoa, 5 lagoas facultativas com os seguintes tempos de retenção: 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias e 6 dias; após as lagoas facultativas seguia-se 1 lagoa de maturação primária com 3,8 dias de retenção; e 5 lagoas de maturação secundárias com 7 dias, 5 dias, 3 dias, 3 dias e 1 dia de retenção; após as lagoas de maturação secundárias haviam 4 lagoas de maturação terciárias com tempos de 5 dias de retenção nas quatro primeiras lagoas de maturação terciária e 4,2 dias na última lagoa de maturação terciária. No primeiro sistema estudado a média geométrica de *Salmonella* do esgoto bruto foi de 130 NMP/100mL e após tratamento verificaram ausência desse patógeno. Em relação à densidade de *V.cholerae* após a lagoa anaeróbia a média geométrica encontrada foi de 10 NMP/100mL assim como após a lagoa facultativa, nos efluentes resultantes das lagoas de maturação não foi verificada a presença desse organismo. A média geométrica de coliformes fecais encontrada no esgoto bruto foi de $2,3 \times 10^7$ UFC/100mL e após o processo de tratamento a densidade detectada foi de 500 UFC/100mL. No segundo complexo de tratamento, o esgoto bruto exibiu média geométrica de *Salmonella* de 470 NMP/100mL e de *V. cholerae* de 40 NMP/100mL. Após todo o processo de tratamento a densidade de *Salmonella* foi de 1 NMP/100mL e ausência de *V. cholerae*.

Em 1996, VAZ da COSTA VARGAS e col. em Santo André (Portugal), investigaram, por 2 anos, a presença de *Salmonella* em águas servidas e tratadas por filtros biológicos destinadas à irrigação agrícola. O efluente

resultante exibiu média geométrica de 23 NMP/100mL (15 a 36 NMP/100mL) no primeiro ano de estudo e no segundo ano apresentou média geométrica de 17 NMP/100mL (12 a 23NMP/100mL). A presença de *Campylobacter jejuni*, analisada apenas no primeiro ano de trabalho, exibindo média geométrica de 6 NMP/100mL. Nas folhas de alface produzidas não houve presença desses organismos.

SHEIKH e col. (1999) avaliaram a ocorrência de *Salmonella* em águas servidas para irrigação agrícola em uma área de 47.000 ha em Monterrey (Califórnia). As amostras analisadas eram oriundas dos esgotos “in natura”, após tratamento secundário e terciário (desinfecção) e águas de tanque de estocagem usadas como controle. Os resultados exibiram a presença de *Salmonella* em 71,4% dos casos no esgoto bruto, com densidade variando de não detectado a 16 UFC/100mL. No esgoto biologicamente tratado detectaram *Salmonella* em todas as oportunidades estudadas (com densidade variando de 2,2 a 9,2 UFC/100mL) e ausência nas amostras do esgoto terciário e dos tanques de estocagem.

Em Marrakesh (Marrocos) MELLOUL & HASSANI (1999) realizaram estudo epidemiológico prospectivo, objetivando determinar a prevalência de *Salmonella* em crianças de 3 a 5 anos residentes em El Azzouzia, área de irrigação com esgoto bruto, e em Sidi Moussa como área controle onde não havia a prática de reúso de águas servidas. O estudo foi conduzido no período de março a agosto de 1997, contando com uma amostra de 740 crianças das quais 390 oriundas de El Azzouzia e 350 de Sidi Moussa. A prevalência de infecções por *Salmonella* foi de 32,56% (127/390) entre crianças de El Azzouzia contra 1,14% em Sidi Moussa, exibindo taxa significativamente mais elevada em relação ao grupo controle. Os sorogrupos mais frequentemente encontrados foram B (9,8%), C (15,6%), D (3,33%) e A (1,79%) isolados das crianças expostas às águas residuárias.

Nesse grupo a ocorrência de *Salmonella* foi mais alta no sexo masculino (37,61%), provavelmente por ajudarem seu pais nos campos de cultivo. Crianças com idades entre 3 e 10 anos apresentaram taxas de 40,32% contra 19,72% na faixa etária de 11 a 15 anos. A ocupação dos pais mostrou-se fator de influência na prevalência de *Salmonella*. Em filhos de agricultores a ocorrência foi de 39,33% significativamente maior, que a taxa de 24,58% observada em crianças cujos pais não eram agricultores. Segundo os autores, esse estudo evidenciou que a prevalência de infecções por *Salmonella* foi significativamente maior em crianças residentes na área de reúso de esgotos na agricultura, problema esse que poderia ser superado com tratamento desses esgotos com satisfatória remoção de patógenos.

A presença de *Salmonella* foi detectada em esgoto sanitário tratado utilizado para irrigação agrícola e águas superficiais por DEVAEUX e col. (2001). As espécies encontradas foram *S. typhimurium* (5 amostras), *S. derby* (4 amostras), *S. hadar* (3 amostras), *S. arizona* (2 amostras) e em apenas uma oportunidade as espécies *S. agona*, *S. bovis*, *S. infantis*, *S. kentucky*, *S. litchfield* e *S. reading*.

KEAWVICHIT e col. (2001) detectaram *Salmonella enteritidis*, em pequenos números, em esgotos sanitários tratados por sistemas de lagoas aeradas, essas águas destinavam-se à irrigação de *Brassica oleracea* var *acephala* – vegetal comestível. Mesmo com a presença de *Salmonella enteritidis*, julgaram essas águas seguras na irrigação dessas cultura, pois apresentavam pequenas quantidades de *E. coli* e ausência de parasitas.

A ocorrência de *Salmonella* em águas residuárias sem tratamento no Vale do México foi relatada por JIMENÉZ e col. (2001) em investigação sobre remoção dessas bactérias após tratamento primário avançado

(gradeamento e coagulação/floculação) e filtração em areia e cloração. As concentrações de *Salmonella* variaram de $1,1 \times 10^8$ a $7,5 \times 10^8$ NMP/100mL. Concluíram que a remoção alcançou de 1 a 2 logs após tratamento primário e filtração e a dose de 10 mg/L de cloro por 30 minutos de contato foi suficiente para remoção de *Salmonella* no efluente tratado.

No Valle del Cauca, Colômbia, MADERA e col. (2002) estudaram a presença de *Salmonella* no esgoto sanitário tratado por lagoas de estabilização em série, consistindo de lagoa anaeróbia, lagoa facultativa e lagoa de maturação, apresentando 12 dias de tempo de retenção hidráulico. O efluente da lagoa facultativa era utilizado na irrigação de campos de cana-de-açúcar devido à proximidade entre essas duas áreas. Observaram a presença de *Salmonella* no efluente da lagoa facultativa e não detectaram a presença de *Shigella*. Os autores recomendaram que, dada a presença de *Salmonella* no efluente da lagoa facultativa, os agricultores não tivessem contato direto com essas águas como medida de proteção à saúde.

FASCILOLO e col. (2002) na cidade de Junín, Mendoza (Argentina), analisaram esgoto doméstico tratado por valo de oxidação, no período de 1998 a 1999, utilizado na irrigação de alho e cebola. As análises demonstraram a presença de *Salmonella* em todas as oportunidades estudadas. Os autores recomendaram análises quantitativas desses organismos nessas águas e determinação dos sorotipos das cepas presentes.

Em Goiás, MARQUES e col. (2003) investigaram a ocorrência de *Salmonella* em 103 amostras (21 em Aparecida de Goiânia e 82 em Goiânia) de águas de irrigação de hortaliças. A água de irrigação empregada era superficial com forte aporte de esgotos brutos das cidades de Aparecida de Goiânia e Goiânia. Foram detectadas 11,7% (12) amostras

positivas para *Salmonella* e 93,2% (96) apresentaram coliformes termotolerantes. A presença de *Salmonella* associou-se a contagens de termotolerantes na faixa de 540 a 1600 NMP/100mL. Os sorotipos encontrados de *Salmonella* foram: *saintpaul*, *panama*, *heidelberg*. Mesmo não sendo praticado o uso direto de esgoto tratado e sim misturado a águas superficiais, esse trabalho evidenciou a importância do monitoramento de águas fortemente poluídas, especialmente na irrigação de alimentos consumidos crus e também abre espaço para reflexões sobre a definição de reúso de águas.

2.8 Colifagos em esgotos sanitários

Mais de 140 vírus patogênicos podem ser transmitidos ao homem pela água, denominados vírus entéricos ou enterovírus, cuja eliminação ocorre por meio das fezes de pessoas infectadas. Os mais comuns são vírus responsáveis por gastroenterites e vírus da hepatite A. A concentração média viral que se pode encontrar em águas residuárias varia de 10^2 a 10^3 UFP/L e em águas residuárias tratadas de 10^1 a 10^2 UFP/L, dependendo do tipo de tratamento que se aplique. Segundo relato do IAWPRC *Study Group* (1991) a remoção desses organismos pode variar muito sendo que as taxas esperadas são de 10% para sedimentação primária, 95% para tratamento biológico secundário e 99,9% para tratamento terciário (excluiu-se desinfecção). No entanto, segundo HACHICH e SATO (2001) a concentração de enterovírus nas águas residuárias pode atingir 10.000 a 100.000 UFP/L, número que pode ser reduzido de 10 a 100 vezes quando essas águas são submetidas a tratamento.

Segundo FANE e col. (2002), 14% de casos de distúrbios entéricos são causados por enterovírus e mais de 55% dos casos onde não se identificou o agente etiológico, o mais provável agente causador são vírus entéricos. Os

autores enfatizaram que esses agentes são, geralmente, mais infectantes que bactérias. Alguns vírus (rotavírus, vírus Norwalk) não geram proteção imunitária a longo prazo, podendo resultar em várias reincidências da doença.

A dose infectante desses microrganismos normalmente é baixa. Alguns vírus são mais resistentes a processos de desinfecção que organismos coliformes. GERBA e col. (1996) relataram resistência de rotavírus a cloroaminas e irradiação ultra-violeta, ainda pontuaram que rotavírus e reovírus são os enterovírus mais resistentes à ação da luz ultravioleta.

Tendo em vista o exposto, os indicadores tradicionais de contaminação fecal podem não ser suficientes para a avaliação da presença ou ausência de vírus entéricos em águas de reúso. A identificação e quantificação de vírus em águas servidas, assim como em outros tipos de água, é difícil devido a sua complexidade, baixa concentração e alto custo. Colifagos e outros bacteriófagos, como os F⁺ específicos, estão se tornando indicadores comuns para avaliação de níveis de poluição e riscos associados a esta (CAI e col. 1988 *apud* ORON e col. 2001; PALMATEER e col. 1991; NASSER e col. 1993; IAWPRC *Study Group* 1991; CAMPOS e col. 2002.) TREE e col. (1997) recomendaram a utilização de inativação de vírus em avaliação de eficiência de processos de desinfecção, pela importância desses organismos em saúde pública e por haver evidências de que apresentam maior resistência à desinfecção que certas bactérias.

Como já dito anteriormente, os colifagos relacionam-se diretamente ao seu hospedeiro bacteriano específico *E. coli*. Quando as condições ambientais são desfavoráveis, coliformes fecais podem desaparecer rapidamente. Neste caso a utilização de microrganismos indicadores mais resistentes, no caso os colifagos, podem refletir melhor a qualidade sanitária de águas de reúso. BORREGO e col. (1987), a respeito da relação de colifagos com

microrganismos patogênicos, em amostras de águas naturais, observaram correlação entre colifagos com *Salmonella* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os argumentos que validam a proposta para a utilização de bacteriófagos como indicadores são:

- a) encontram-se em abundância em águas servidas e contaminadas;
- b) as populações de colifagos são maiores do que de enterovírus em águas;
- c) incapacidade de multiplicação fora do hospedeiro bacteriano;
- d) isolamento por técnicas simples e rápidas;
- e) resistência de alguns colifagos, assim como enterovírus, a processos de desinfecção.

Na literatura consultada não se observou nenhuma recomendação referente a limites de vírus em águas de reúso para irrigação agrícola, a exceção do caso reportado por HESPANHOL e PROST 1994; ASANO e LEVINE 1998 *apud* CAMPOS e col. (2002) que citaram que o estado americano do Arizona fixa limites de vírus entéricos de 125 UFP/40L em áreas de irrigação restrita e 1 vírus entérico/L em áreas de irrigação irrestrita.

Alguns autores têm pesquisado a importância e a relevância de colifagos como indicadores da qualidade sanitária de águas servidas, tratadas ou não, destinadas à irrigação agrícola. Há também pesquisas referentes à remoção desses organismos em plantas de tratamento de águas residuárias.

EMPARANZA-KNÖRR e TORRELLA (1995), no sudeste espanhol, estudaram a capacidade de depuração de sistema de lagoas de estabilização no tratamento de esgotos domésticos da cidade de Guardamar. O sistema de tratamento consistia de 3 lagoas anaeróbias em paralelo (A, B e C) seguidas de 2 lagoas facultativas em paralelo, os autores informaram que o sistema de

tratamento encontrava-se sobrecarregado. Como indicador da ocorrência de vírus entéricos, quantificaram colifagos no esgoto bruto e tratado. Observaram contagens de 10^5 UFP/ml no esgoto bruto e de 10^3 a 10^4 UFP/mL no efluente tratado, com redução média de 89,7%. Explanaram que a elevada concentração de colifagos pode representar risco de contaminação viral com o uso irrestrito dessas águas.

Em Sapé (Paraíba), CEBALLOS e col.(1995), utilizaram colifagos como indicadores de vírus entéricos em esgotos domésticos tratados por uma única célula de lagoa facultativa com 61 dias de retenção hidráulica e vazão de 11 L/s, no período de outubro de 1991 a março de 1992. Encontraram eficiência de remoção desses organismos da ordem de 99,3%, média de $1,9 \times 10^6$ UFP/100mL no esgoto bruto e de $1,3 \times 10^4$ UFP/100mL no esgoto tratado, comparável ao ocorrido com bactérias indicadoras de contaminação fecal (99,6%). Os autores verificaram ainda, que, a constante de primeira ordem de remoção (K_1) foi de 2,38/dia para colifagos e para coliformes fecais de 4,27/dia de decaimento, mostrando que a remoção de colifagos foi mais eficiente do que o esperado, entretanto, menos eficiente que a remoção de coliformes fecais.

BOTERO e col. (1997) considerando que os colifagos podem ser bons indicadores da presença de vírus em águas, pesquisaram sua remoção em sistema piloto de tratamento de esgoto por lagoas de estabilização. O sistema de tratamento consistia de 3 sub-sistemas A, B e C e cada um deles contava com uma lagoa facultativa e 2 lagoas de maturação, com tempos de retenção hidráulico de 19 dias cada. O esgoto bruto apresentava média de colifagos de 70×10^4 NMP/100mL. No sub-sistema A a média de colifagos foi de $1,6 \times 10^5$ NMP/100mL na lagoa facultativa e de $7,6 \times 10^4$ e $4,7 \times 10^4$ na primeira e segunda lagoa de maturação, respectivamente. A respeito do sub-sistema B, as médias foram de $1,5 \times 10^5$ NMP/100mL na lagoa facultativa e de $3,4 \times 10^4$ e $1,6 \times 10^4$ nas primeira e segunda lagoas de maturação. A média de colifagos no sub-sistema

C foi de $1,3 \times 10^5$ NMP/100mL na lagoa facultativa e nas lagoas de maturação de $7,6 \times 10^4$ e $3,1 \times 10^4$ NMP/100mL. Segundo os autores, o sistema de tratamento mostrou eficiência de remoção desses organismos da ordem de 93,3% no sistema A, 97% no sistema B e de 95,5% no sistema C, e ainda que a inativação de colifagos foi muito maior nas lagoas de maturação nos 3 sistemas. Os autores, entretanto, não estudaram a correlação entre colifagos e coliformes fecais em seus achados.

Em 1997, na cidade de Dorchester (Inglaterra), TREE e col., considerando com a relevância da presença de vírus em águas residuárias, utilizaram bacteriófago F^+ específico como indicador viral. Compararam taxas de inativação de poliovírus, *E. coli* e *Enterococcus faecalis* em relação à cloração e irradiação ultra violeta. Amostras de esgoto tratado por processo primário e secundário (filtro biológico) foram esterilizadas por irradiação de ^{60}Co e nas amostras estéreis aplicaram densidade conhecida de *E.coli* (10^8 UFC/100mL), *E. faecalis* (10^8 UFC/100mL), bacteriófago F^+ específico (10^7 UFP/100mL) e poliovírus (10^7 UFP/100mL). O efluente primário foi submetido à cloração com doses de 8, 16 e 30 mg/L a um tempo de contato de 30 minutos, enquanto o efluente secundário foi submetido à irradiação ultra violeta com doses aplicadas de 10, 20 e 30 mW seg/cm². Os resultados revelaram que para os dois processos de desinfecção o bacteriófago F^+ específico foi mais resistente que os outros organismos estudados. As porcentagens de sobrevivência à cloração foram de 62%, 32% e 10% para as doses de 8, 16 e 30 mg/L para bacteriófago F^+ específico. Para poliovírus de 26% (8 mg/L), 2% (16 mg/L) e 0,1% (30mg/L) e para *E. coli* de >0,01% nas 3 condições testadas. No ensaio com irradiação ultra violeta, bacteriófago F^+ específico mostrou sobrevivência de 19%, 5% e 1%, respectivamente, nas dosagens de 10, 20 e 30 mW seg/cm², respectivamente. Para poliovírus de 2% (10 mW seg/cm²); 0,1% (20 mW seg/cm²); e >0,01% (30 mW seg/cm²) e para *E.coli* de >0,01% nas condições estudadas. Os autores, entretanto, recomendaram cautela no uso

das informações contidas nessa pesquisa, pois, esse ensaio foi realizado com amostra artificialmente contaminada e, em ambiente natural, as condições são distintas e inclusive com a presença de outros microrganismos.

GANTZER e col. (2001) em Israel, verificaram a adsorção e sobrevivência de coliformes fecais, colifagos somáticos e fagos RNA F⁻ específicos em solos irrigados com águas residuárias tratadas com as seguintes características: $5,1 \times 10^5$ UFC/100mL de coliformes fecais, $1,3 \times 10^5$ UFP/100mL de colifagos somáticos e de fagos RNA F-específicos de $1,6 \times 10^4$ UFC/100mL. Os resultados revelaram que colifagos somáticos mostraram-se mais resistentes e persistentes no solo, seguidos por fagos RNA F-específicos e coliformes fecais. Para os autores a pesquisa realizada mostrou evidências que colifagos somáticos podem ser considerados melhores indicadores de contaminação fecal. No entanto, enfatizaram, que mais investigações devem ser consideradas para confirmação de suas hipóteses.

PETTERSON e ASHBOLT (2001) investigaram a presença de subpopulação viral persistente na avaliação de contrair-se doença pelo consumo de alface e cenouras irrigadas com efluente tratado em nível secundário. Os resultados encontrados indicaram vírus presentes nos vegetais, o que poderia resultar em alto risco aos seus consumidores.

Em 2002, CAMPOS e col., considerando a importância de estudos relacionados à presença de vírus em águas servidas, compararam a remoção de bacteriófagos com outros indicadores de contaminação fecal em sistemas de lagoas de estabilização em Choconté (Colômbia), o período de estudo deu-se nos meses de setembro e outubro de 1999 e maio de 2000. O sistema de tratamento contava com 2 lagoas facultativas em série, a primeira com tempo de retenção de 18 dias e a segunda lagoa com tempo de retenção de 35 dias. Os organismos analisados foram coliformes fecais, *E. coli*, *Streptococcus*

faecalis, *Clostridium perfringens*, bacteriófago F-específico, colifagos somáticos e bacteriófago de *Bacteroides fragilis*. Obtiveram maior remoção de coliformes fecais (48%) no primeiro período de estudo contra 64% no segundo período. Para *E. coli* e *S. faecalis* as eficiências de remoção foram de 64% e 43% no primeiro período da pesquisa e de 61% e 43% no segundo período, respectivamente. *C. perfringens* só foi analisado na segunda etapa e apresentou taxa de remoção de 57%. Em relação aos vírus observaram altas eficiências no segundo período do experimento a saber: F-específico as taxas foram de 42% e 73%, colifagos somáticos de 25% e 79% e fago de *B. fragilis* de 28% e 50%. Os autores levantaram a hipótese de que as diferenças de remoção entre os períodos estudados podem estar associadas a mudanças de temperatura e turbidez relatando que tal associação não ocorreu no caso de bacteriófagos analisados. Os autores assinalaram a necessidade de investigações sobre o mecanismo de remoção de vírus em sistemas de tratamento de águas residuárias e consideraram bacteriófagos como boa alternativa de indicadores de contaminação fecal.

Todos os trabalhos aqui revisados mostram a necessidade de mais estudos em relação ao uso de bacteriófagos como indicadores de contaminação fecal. Ainda não há consenso em relação a esse ponto de vista a respeito do uso de bacteriófagos como indicadores da presença de enterovírus em águas de reúso.

3 JUSTIFICATIVA

A demanda crescente de água em razão do desenvolvimento econômico, satisfazendo as necessidades industriais e agrícolas, traz impactos ao meio ambiente e podem causar problemas de fornecimento e abastecimento de água para a população. Nesse sentido, o reúso de águas residuárias tratadas na agricultura torna-se alternativa interessante na busca de melhor aproveitamento de recursos hídricos.

Considerando-se a escassez de informações a respeito dos aspectos sanitários que envolvem a utilização de esgotos sanitários tratados para a irrigação de culturas agrícolas e a importância da investigação da qualidade sanitária dessas águas, justifica-se a presente pesquisa, como forma de colaborar com entidades de saúde pública e de meio ambiente e dar subsídios para tornar o uso desse recurso seguro para a população consumidora de culturas agrícolas irrigadas com águas servidas e para os trabalhadores rurais envolvidos com esse tipo de cultura.

4 HIPÓTESE

Há viabilidade do uso de esgotos sanitários tratados por lagoas de estabilização na irrigação de culturas agrícolas, do ponto de vista da qualidade sanitária dessas águas.

5 OBJETIVOS

Tendo-se em vista a relevância de estudos relativos à qualidade sanitária de águas servidas destinadas a irrigação de áreas agrícolas, foram delineados, para essa pesquisa, os seguintes objetivos:

5.1 Objetivos Gerais

Estudar a viabilidade da utilização de esgotos sanitários tratados por lagoas de estabilização para irrigação de áreas agrícolas, considerando os aspectos microbiológicos e parasitológicos.

5.2 Objetivos específicos

- ♦ Verificar se a qualidade sanitária de efluentes provenientes de lagoas de estabilização localizadas nas cidades de Lins, operadas pela SABESP, atende às diretrizes sanitárias da Organização Mundial da Saúde através da série de informes técnicos 778 de 1989 (densidade de coliformes fecais e ovos viáveis de helmintos).
- ♦ Caracterizar as cepas de *E. coli* EHEC isoladas através de sorologia por soros polivalentes para as cepas potencialmente patogênicas e soro específico para *E. coli* O157.
- ♦ Caracterizar genotipicamente cepas potencialmente patogênicas EHEC de *E. coli* encontradas através da técnica de amplificação em cadeia pela polimerase (PCR), utilizando iniciadores específicos.
- ♦ Verificar a viabilidade de ovos de helmintos encontrados nos esgotos após os sistemas de desinfecção.
- ♦ Verificar a presença de *Salmonella* nos esgotos após tratamento por lagoas de estabilização e unidades de desinfecção.
- ♦ Quantificar colifagos nos esgotos após tratamento por lagoas de estabilização e unidades de desinfecção e estabelecer correlação com a densidade de coliformes fecais.

- ♦ Avaliar a eficiência dos diferentes sistemas de desinfecção de esgotos sanitários tratados, aplicados para a remoção de microrganismos indicadores de contaminação fecal.

6. METODOLOGIA

6.1 Tipo de pesquisa

Considera-se o presente trabalho como um estudo analítico, já que tem por objetivos investigar e testar pela experimentação, rejeitando ou não hipóteses e resultando em uma contribuição original.

Os passos metodológicos efetuados para a realização desse trabalho de pesquisa foram:

- ◆ Levantamento bibliográfico e leitura crítica/analítica da produção científica consultada.
- ◆ Caracterização do sistema de lagoas de estabilização para tratamento de esgotos sanitários produzidos pelo município de Lins (SP), sendo os esgotos tratados e o efluente desinfetado com o emprego de cloro e de ozônio como objetos dessa investigação.
- ◆ Análises laboratoriais obedecendo a técnicas normatizadas nacional e internacionalmente, pela Cia de Tecnologia e Saneamento de São Paulo (CETESB) e *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (20th ed., 2000), respectivamente. Artigos de periódicos foram utilizados como base para a realização de técnicas de ensaios moleculares.
- ◆ Tabulação e apresentação dos dados obtidos durante o processo de pesquisa.
- ◆ Interpretação e discussão dos resultados obtidos, tomando-se como base a literatura pertinente, tanto nacional como internacional.
- ◆ Redação da tese de doutorado seguindo os padrões adotados pela Faculdade de Saúde Pública/USP – Biblioteca/CIR, editados em “Guia de apresentação de teses”, São Paulo, 1998.
- ◆ Conclusões, refletindo a contribuição da pesquisa realizada e apresentando recomendações e sugestões para futuros trabalhos de pesquisa na área de concentração: saúde ambiental.

6.2 Caracterização da área de estudo

Para a realização do presente estudo, foi selecionado o sistema de tratamento de esgotos sanitários constituído por lagoas de estabilização operado pela SABESP na cidade de Lins. A cidade de Lins, situada a 455 km da cidade de São Paulo, conforme apresentado na figura 3, apresenta uma área de 571 km² e conta com uma população de 65.952 habitantes (IBGE,2000). Segundo a Fundação SEADE (2000) o município de Lins conta com um percentual de atendimento de abastecimento de água de 97,86%; esgotamento sanitário de 97,17% e 99,04% de cobertura de coleta de lixo. O sistema de tratamento de esgotos sanitários oriundos da cidade de Lins é constituído por 3 conjuntos de lagoas em série: lagoa anaeróbia seguida de lagoa facultativa, sendo o tempo de retenção total do sistema de 15,5 dias (5 dias na lagoa anaeróbia e 10,5 dias na lagoa facultativa) e vazão total de 275 L/s, conforme figura 4. As dimensões das lagoas são de 4,1 m de altura e volume de 23.227,03 m³ para a lagoa anaeróbia e 1,9 m e volume de 55.522,87 m³ para a lagoa facultativa. Os valores médios das características físico-químicas do esgoto bruto e do esgoto tratado estão relacionados no quadro 10. Após o tratamento do esgoto sanitário pelo sistema de lagoas de estabilização, realizaram-se no esgoto bruto e tratado os estudos microbiológicos para a avaliação de sua qualidade sanitária e seu potencial uso na irrigação de culturas agrícolas.

Figura 3: Localização do município de Lins (SP)

Quadro 10: Valores médios das características físico-químicas do esgoto bruto e do esgoto tratado do município de Lins (SP).

Esgoto	DQO mg/L	DBO mg/L	Nitrogênio amoniacoal mg/L	Fósforo total mg/L	Sólidos. Suspensos. mg/L
Bruto	560	300	18	8,5	220
Tratado	290	160	13	7,0	190

Figura 4: Esquema do processo de tratamento de esgotos utilizado na cidade de Lins (SP) mediante sistema de lagoas de estabilização.

Em Lins o sistema de tratamento dos esgotos sanitários mediante lagoas de estabilização contou com instalação piloto para desinfecção de seus esgotos tratados, empregando-se 2 tipos de desinfecção: cloração e ozonização. O diagrama do sistema de tratamento de esgotos sanitários de Lins está ilustrado na figura 5. Tal sistema foi implantado para o desenvolvimento do projeto de pesquisa – PROSAB –2000 – Tema 2, cujo título é “Desinfecção de esgotos tratados em lagoas de estabilização e reúso em fertirrigação, piscicultura e hidroponia” tendo como coordenador o Prof.Dr. Roque Passos Pivelli da Escola Politécnica da USP.

O processo de desinfecção empregando hipoclorito de sódio efetuou-se mediante utilização de tanque de contato, o qual possuía 4 m³ de volume e 1 m de profundidade úteis. A solução de hipoclorito de sódio foi introduzida na tubulação cerca de 5 m antes da entrada do tanque, por meio de dosador automático. A concentração do desinfectante e tempo de contato aplicados não foram constantes ao longo do período de estudo por problemas de operacionalidade, sendo que as doses e tempos de contato empregados estão especificados nas tabelas de resultados (anexo 1).

Em relação ao processo de ozonização, utilizou-se gerador produtor de ozônio a partir do ar, sendo o oxigênio (O₂) purificado anteriormente. O gerador possuía capacidade de descarga de 110 mg O₃/ minuto. A introdução do ozônio na tubulação do esgoto a ser desinfetado deu-se através de Venturi. A coluna de contato entre o desinfectante e o esgoto tratado apresentava 300 mm de diâmetro e 3,0 m de altura e volume útil de 171 L. A concentração do desinfectante e tempo de contato aplicados não foram constantes ao longo do período de estudo por problemas de operacionalidade, sendo que as doses e tempos de contato empregados estão especificados nas tabelas de resultados (anexo 1).

Figura 5: Sistema de tratamento de esgotos sanitários utilizado no município de Lins (SP) e unidades de desinfecção.

6.3 Amostra e amostragem

A tomada de amostras dos esgotos sanitários tratados pelo sistema de lagoas de estabilização de Lins e desinfectados foi efetuada por equipe definida pelo coordenador do projeto PROSAB.

Foram realizadas 25 campanhas de amostragem de esgoto sanitário bruto e tratado por lagoas de estabilização, durante um período de 12 meses, obedecendo a uma frequência quinzenal. Em cada campanha foram coletadas amostras dos seguintes pontos: 26 amostras da entrada e saída do processo (lagoa facultativa); 17 amostras dos efluentes desinfectados por ozonização com distintas dosagens e tempos de contato e 27 amostras dos efluentes desinfectados pelo processo de desinfecção por hipoclorito de sódio com distintas dosagens e tempos de contato.

A coleta das amostras foi realizada em frascos de plástico não tóxico estéreis, segundo Guia de Orientação e Preservação de Amostras de Água (CETESB, 1986) e *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (20th ed., 2000).

Após a coleta, as amostras foram conservadas sob refrigeração (4-10°C) e processadas no Laboratório de Bacteriologia e Parasitologia do Departamento

de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública–USP, o mais rápido possível, dentro de um período máximo de 24 horas.

6.4 Determinação de coliformes totais e *Escherichia coli*

A enumeração de *E. coli* foi efetuada através de ensaio cromogênico empregando o kit Colilert (Idexx).

Para a execução do ensaio foi seguido o procedimento abaixo discriminado:

- ◆ Adicionou-se o substrato Colilert (meio de cultura já preparado e fornecido pela Idexx) em 100 mL de amostra.
- ◆ Após agitação a amostra foi transferida para a cartela *Quanti-Tray* para contagem de até 2000 NMP/100mL.
- ◆ Selou-se a cartela *Quanti-Tray* na prancha de selagem e a mesma foi incubada a 35°C por 24 horas.
- ◆ Após 24 horas de incubação, a amostra que apresentou a coloração amarela, devido a quebra de ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo) pela ação da enzima β -galactosidase, foi considerada positiva para a presença de coliformes totais. Consideraram-se positivas para *E. coli* aquelas que, além de amarelas foram fluorescentes quando observadas na luz ultravioleta(UV), demonstrando a metabolização do MUG (4-metilumbelifenil- β -D-glicuronídeo) pela ação da enzima β -glucoronidase.
- ◆ Os resultados foram expressos em NMP/100 mL, consultando-se a tabela de NMP fornecida pelo fabricante (anexo 8), em que são dados os limites de confiança de 95% para cada valor de NMP determinado.

6.4.1 Isolamento de *Escherichia coli* potencialmente patogênicas

A pesquisa de cepas de *E. coli* potencialmente patogênicas foi qualitativa, inoculando-se 100 mL da amostra em erlenmeyer contendo meio lactosado, em duplicata, e incubando-se a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 – 48 horas. Uma amostra da cultura bacteriana obtida em caldo lactosado foi transferida para o meio EC e incubadas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 horas, a temperatura utilizada para incubação se deve ao fato que *E. coli* O157 não crescer bem a temperaturas entre 44 a $44,5^\circ\text{C}$ (NATARO e KAPER 1998). O crescimento bacteriano obtido foi então transferido para placas de Petri contendo meio MacConkey e incubadas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 18 - 20 horas. Após o período de incubação selecionou-se 10 colônias típicas e foram então submetidas a triagem bioquímica em meio IAL (Instituto Adolfo Lutz) e incubadas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 18 a 20 horas. As colônias com características compatíveis a *E. coli* foram armazenadas em ágar conservação e incubadas a 35°C por 18 – 20 horas, para posteriormente, serem submetidas ao teste de soroaglutinação em lâmina. A figura 6, mostra as características do gênero *E. coli* em meio de Rugai-Lisina (IAL – Instituto Adolfo Lutz).

Para a pesquisa de *E. coli* O157 foi transferido o crescimento bacteriano obtido em meio EC para placas de Petri contendo meio MacConkey sorbitol, já que *E. coli* O157 não é capaz de fermentar o sorbitol (sorbitol negativo), assim selecionou-se colônias transparentes as quais foram submetidas a triagem bioquímica em meio Rugai-Lisina (IAL-Instituto Adolfo Lutz) e incubadas a 35°C por 18 – 20 horas. As cepas com características compatíveis de pertencerem a *E. coli* foram armazenadas em ágar conservação. A figura 7 ilustra colônias típicas de *E. coli* O157 (coleção INCQS 000171 correspondente a cepa ATCC nº 43895) no meio MacConkey sorbitol.

Figura 6: Características de cepas de *E. coli* em meios de triagem IAL (Rugai-Lisina).

Figura 7: Colônias típicas de *E. coli* O157 (coleção INCQS 000171 correspondente a cepa ATCC nº 43895) no meio MacConkey sorbitol

6.4.2 Sorotipagem de *E. coli*

A técnica utilizada para a determinação de *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), enteroinvasiva (EIEC) e O157 (EHEC) foi a soroaglutinação em lâmina.

Para a determinação dos antígenos somáticos (O) foram utilizados soros hiperimunes polivalentes e monovalentes, obtidos da PROBAC do Brasil Prod. Bacteriológicos Ltda., dirigidos contra os antígenos O26, O55, O111, O119 (Poli A); O114, O125, O142, O158 (Poli B); O86, O126, O127 e O128 (Poli C).

As culturas de *E. coli* foram crescidas em agar conservação (Lúria) inclinado durante 24 horas a 35° C e ressuspensas em solução fisiológica. Com auxílio de uma pipeta de 0,1 mL, foram transferidas 3 gotas pequenas da suspensão espessa, para uma placa de aglutinação e foi adicionada a cada uma, respectivamente, uma gota dos soros polivalentes A, B e C para EPEC; A e B para EIEC e O157. Consideraram-se positivas as culturas que apresentaram soroaglutinação dentro de 2 minutos de homogeneização.

Como controle negativo utilizou-se solução fisiológica e como controle positivo cepa de *E. coli* O157 (coleção INCQS 000171 correspondente a cepa ATCC nº 43895).

6.4.3 Genotipagem de *E. coli* O157

A genotipagem das cepas de *E. coli* O157 positivas em reação sorológica com antisoro somático para O157, foi realizada pelo método de amplificação de cadeia pela polimerase segundo MAURER e col. (1999) modificado, para triagem. O perfil molecular das cepas foi determinado pelo método denominado sítio de restrição específico (*restriction-site-specific*) para

amplificação de cadeia polimerase (PCR) – RSS-PCR, desenvolvido para detecção de *E.coli* O157 por KIMURA e col. (2000).

Extração de DNA (CHAPMAN e col., 2001)

As cepas com sorologia positiva específica para O157 foram inoculadas em 10 mL de caldo Lúria e incubadas por 18 a 24 horas a 35°C. A seguir, o crescimento bacteriano obtido foi transferido para tubo de Falcon, com capacidade de 50 mL, e submetido a centrifugação de 5.000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* resultante foi ressuspenso com 1 mL de água ultra pura (Mili Q) estéril, homogeneizado e transferido para microtubo com tampa, com capacidade de 1,5 mL (tipo "Eppendorf"). Efetuou-se nova centrifugação a 12.000 rpm por 3 minutos a temperatura de 24 °C. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso com 200 µL de água ultra pura (Mili Q) estéril e submetido a uma temperatura de 95 °C por 10 minutos e imediatamente a uma temperatura de -20 °C por 30 minutos. Após o processo de choque térmico as amostras foram submetidas a 65 °C por 1 minuto, e para alcançar temperatura ambiente efetuou-se nova centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 24 °C. O sobrenadante obtido contendo o DNA foi transferido a um novo microtubo. Quando a amplificação em cadeia pela polimerase (PCR) não foi realizada logo após o término da extração de DNA, as amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento de uso. Como controle positivo utilizou-se cepa de *E. coli* O157 correspondente a cepa correspondente a ATCC nº 43895.

Ensaio de PCR pelo método de MAURER e col. (1999) (modificado).

Método desenvolvido para detectar *E. coli* O157 por meio da presença do fragmento de DNA com peso molecular de 420 bp do *operon* bfp, o qual foi observada pelo autores em todas as cepas de *E. coli* O157 analisadas, não ocorrendo em outros sorotipos de *E. coli*.

➤ **Primers**

Os primers foram desenvolvidos a partir do plasmídeo pDS306 – específico para O157.

Primers:

O157PF8 – CGT GAT GAT GTT GAG TTG

O157PR8 – AGA TTG GTT GGC ATT ACT G

➤ **PCR**

O ensaio de PCR foi conduzido com volume final de 25µL contendo 2,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µL de tampão de amplificação 10X (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3; KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, gelatina 0,01% peso/volume), 0,2 µL de DNTp (2,5 mM) das bases dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 1µL de cada *primer* reverso e direto (20µM); 5U de *taq*; 5 µL de DNA bacteriano e água MiliQ para ajuste do volume final.

Esse sistema de reação foi colocado em termociclador Eppendorff-Mastecycler Gradiente nas seguintes condições:

- ◆ Ciclo inicial a 95 °C por 5 minutos.
- ◆ 35 ciclos consistindo de :
 - denaturação a 94°C 1 minuto.
 - anelamento com *primer* a 55°C por 1 minuto.
 - extensão a 72 °C por 1 minuto
- ◆ Um ciclo final a 72°C por 7 minutos e uma temperatura de manutenção final a 4 °C.

Todo o processo foi efetuado em duplicata.

➤ Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese horizontal com 1,8% de agarose em gel e corado com brometo etídeo, em intensidade de corrente de 100V por 60 minutos e visualizado em luz ultravioleta em transiluminador UVP e a aquisição da imagem foi feita em *software* LabWorks, versão 4.0,UVP.

Adicionou-se em tubo tipo Eppendorff 8 μ L do produto da PCR, ao qual adicionou-se azul de bromofenol. Em cada gel também foi adicionado marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder, 1 μ g/ μ L, Invitrogen,USA) corado com 5 μ L de solução de azul de bromofenol. No mesmo gel ainda efetuou-se prova em branco, ou seja, ausência de DNA bacteriano.

As amostras foram aplicadas nas posições correspondentes aos poços do gel de agarose e anotadas. Imediatamente colocou-se tampão TAE 1X na cuba de eletroforese e realizou-se a corrida a 100 V por 60 minutos à temperatura ambiente.

Ensaio de RSS-PCR pelo método de KIMURA e col. (2000) (modificado).

Para obtenção do perfil molecular das cepas com sorologia positiva na reação específica com anti-soro O157.

➤ *Primers*

Os *primers* utilizados foram baseados em sequência de enzimas de restrição *BbvI* e *TaqII* encontrados no gene *ChuA* responsável pelo transporte de ferro sendo específico para *E. coli*.

Primers:

EC – 1 5' – GGC AGC CAG CAT TTT TTA

EC – 2 5' – CAG CCA ACA GAG AAG CCA

➤ PCR

O ensaio de PCR foi conduzido com volume final de 25µL contendo 2,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µL de tampão de amplificação 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8,3; KCl 500mM; MgCl₂ 15 mM; gelatina 0,01% peso volume), 0,2 µL de DnTp (2,5 mM) de cada base dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 1µL de cada *primer reverso e direto* (20µM); 5U de *taq*; 5 µL de DNA bacteriano e água MiliQ para ajuste do volume final.

Esse sistema de reação foi colocado em termociclador Eppendorff-Mastercycler Gradiente nas seguintes condições:

- ◆ Ciclo inicial a 95 °C por 5 minutos.
- ◆ 35 ciclos consistindo de :
 - denaturação a 94 °C 1 minuto.
 - anelamento com *primer* a 42 °C por 2 minutos.
 - extensão a 72 °C por 5 minutos
- ◆ Extensão final a 72 °C por 10 minutos, e manutenção final a 4 °C.

Todo o processo foi efetuado em duplicata.

➤ Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese horizontal com 1,5% de agarose em gel e corado com brometo etídeo, a 100V por 180 minutos e visualizado em luz ultravioleta em transiluminador UVP e a aquisição da imagem foi feita em *software* LabWorks, versão 4.0, UVP.

Adicionou-se em tubo tipo Eppendorff 8 μ L do produto da PCR, ao qual adicionou-se azul de bromofenol. Em cada gel também foi adicionado marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder, 1 μ g/ μ L, Invitrogen,USA) corado com 5 μ L de solução de azul de bromofenol. No mesmo gel ainda efetuou-se prova em branco, ou seja, ausência de DNA bacteriano.

As amostras foram aplicadas nas posições correspondentes aos poços do gel de agarose e anotadas. Imediatamente colocou-se tampão TAE 1X na cuba de eletroforese e realizou-se a corrida a 100 V por 180 minutos à temperatura ambiente.

➤ Análise dos perfis genômicos (*fingerprinting*)

O polimorfismo de bandas obtido foi analisado com o auxílio de *software* específico para comparação do padrão de bandas (GelWorks 1D Advanced – UVP, versão 4.01), e os perfis das cepas foram agrupados usando coeficiente de Pearson e demonstrados, graficamente, na forma de dendograma.

6.5 Isolamento de *Salmonella*

O isolamento de *Salmonella* foi efetuado segundo Norma CETESB L5.218 – *Salmonella*- Isolamento e Identificação (1993) e *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (20th ed., 2000).

No início da pesquisa, o método utilizado foi o da inoculação direta por falta do sistema de filtração, descrito na mesma norma técnica CETESB acima citada. Esse método se dá pela inoculação de 100 mL de amostra em erlenmeyer de 250mL de capacidade contendo 100 mL de meio selenito novobiocina, em triplicata. Após a inoculação, os erlenmeyers contendo o meio de enriquecimento e amostra foram incubados a 42,5°C por um período de 18 – 24 horas, 48 horas e 5 dias. Após o período de incubação realizou-se o isolamento em meio seletivo e diferencial XLD (ágar xilose lisina desoxicolato) e BG (ágar verde brilhante). As placas de Petri com os meios XLD e BG foram incubadas a 35±0,5°C por 18 a 24 horas. Passado o período de incubação efetuou-se leitura para colônias típicas de *Salmonella* (colônias de coloração rosa no meio BG e vermelhas com centro escuro ou vermelhas no meio XLD). As colônias típicas (um máximo de 10 colônias) foram transferidas para o meio de triagem IAL (rugai lisina motilidade – Instituto Adolfo Lutz). Após a transferência, os tubos de IAL contendo as colônias típicas foram incubados a 35 ± 0,5°C por 24 ± 2 horas.

Quando se concretizou o empréstimo do sistema de filtração da CETESB, iniciou-se a detecção da presença de *Salmonella* pelos dois métodos para verificação de conformidade entre os dois procedimentos analíticos.

Filtrou-se volumes de 1 litro de amostra em membrana filtrante de acetato de celulose ou éster de celulose de porosidade de 0,45µm, utilizando-se porta-filtro de 142 mm de diâmetro.

Após a filtração, a membrana foi transferida para *erlenmeyer* contendo 100 mL do meio de enriquecimento caldo selenito novobiocina. e incubada a 42,5 °C por um período de 18 – 24 horas, 48 horas e 5 dias.

Passado o período de incubação em meio de enriquecimento caldo selenito com novobiocina realizou-se o isolamento em meio seletivo e diferencial XLD (ágar xilose lisina desoxicolato) e BG (ágar verde brilhante).

As placas com os meios XLD e BG foram incubadas por um período de 24 horas, 48 horas e 5 dias a temperatura de 35°C. Após esse período efetuou-se leitura para colônias típicas de *Salmonella* (colônias de coloração rosa no meio BG e vermelhas com centro escuro ou vermelhas no meio XLD).

De cada placa foram selecionadas um máximo de 10 colônias típicas de *Salmonella* de cada placa, as quais foram transferidas para o meio de triagem IAL. Após a transferência, os tubos de IAL contendo as colônias típicas foram incubados a 35 ± 0,5°C por 24 ± 2 horas.

As características de *Salmonella* em meio IAL são (PESSOA e SILVA,1972).

Prova	Reação
L-lisina descarboxilase	+ (4) (7)
Motilidade	+ (2)
Produção de gás	+ (3)
Fermentação da glicose	+
Fermentação da sacarose	-
Produção de H ₂ S	+ (4) (5)
Hidrólise da uréia	-
Produção de indol	- (7)
Desaminação do L-triptofano	-

Reação positiva : + / Reação negativa: -
(2) *Salmonella gallinarum* e *Salmonella pullorum* : imóvel (3) *Salmonella typhi* : gás negativo
(4) *Salmonella paratyphi* A : lisina negativa e H₂S negativo (5) *Salmonella choleraesuis*: H₂S negativo
(7) *Salmonella typhimurium*: algumas culturas podem apresentar indol negativo e/ou lisina negativa.

A figura 8 ilustra as características de gerais do gênero *Salmonella* em tubos de IAL

Figura 8 : Características do gênero *Salmonella* em meios de triagem IAL (Rugai-Lisina).

6.5.1 Sorotipagem de *Salmonella*

A técnica utilizada para a confirmação do gênero *Salmonella* foi a de soroaglutinação em lâmina utilizando soros anti-*Salmonella* polivalente somático e anti-*Salmonella* polivalente flagelar, da marca DIFCO.

As culturas de *Salmonella* foram crescidas em ágar conservação (Lúria) inclinado durante 24 horas a 35°C e ressuspensas em 0,3 mL de solução fisiológica. Com auxílio de uma pipeta de 0,1 mL foram transferidas 3 gotas pequenas de suspensão bacteriana espessa para uma placa de aglutinação e foi adicionada a cada uma delas uma gota do soro anti-*Salmonella*. Consideraram-se positivas as culturas que apresentaram soroaglutinação dentro de 2 minutos de homogeneização. Como controle negativo, foi utilizada solução fisiológica.

6.5.2 Genotipagem de *Salmonella*

A confirmação das cepas de *Salmonella* positivas em reação sorológica com antisoros somático e flagelar realizou-se pelo método de SOUMET e col. (1999) modificado, sendo o peso molecular para *Salmonella* sp de 429bp, *Salmonella* Enteriditis de 250 bp e *Salmonella* Typhimurium de 620 bp. Os controles positivos foram cepas de *Salmonella* sp e *Salmonella* Typhimurium. (gentilmente cedida pela Dra Lúcia Baldassi, Instituto Biológico)

As cepas positivas para sorologia específica para *Salmonella* foram inoculadas em 10 mL de caldo Lúria, os quais foram incubados por 18 - 24 horas a 35°C. Após o período de incubação, foi extraído DNA das cepas segundo CHAPMAN e col. (2001) descrito anteriormente no item 6.4.3.

Os *primers* utilizados na identificação estão relacionados abaixo:

Primers:

ST11 – 5' – GCC AAC CAT TGC TAA ATT GGC GCA
ST15 - 5' – GGT AGA AAT TCC CAG GGG GTA CTG G
S1 - 5' - GCC GTA CAC GAG CTT ATA GA
S4 - 5' - ACC TAC AGG GGC ACA ATA AC
Fli15 - 5' – CGG TGT TGC CCA GGT TGG TAA T
Typ04- 5' – ACT GGT AAA GAT GGC T

Os *primers* ST11 e ST15 identificam bactérias do gênero *Salmonella*, enquanto os primers S1 e S4 identificam *Salmonella* Enteritidis e Fli15 e Typ04 *Salmonella* Typhimurium.

O ensaio de PCR foi conduzido com volume final de 25µL contendo 1,5 µL de MgCl₂ (25mM); 2,5 µL de tampão de amplificação 10X (Tris-HCl 100mM, pH 8,3; KCl 500mM; 0,2 µL cada deoxinucleotídeo 2,5 mM (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 1,5µL de cada *primer* revreso e direto (20µL); 5U de *taq* ; 5 µL de DNA bacteriano e água MiliQ para ajuste do volume final.

Esse sistema de reação foi colocado em termociclador Eppendorf-Mastercycler gradiente nas seguintes condições:

Ciclo inicial a 94 °C por 5 minutos.

♦ 30 ciclos consistindo de :

- denaturação a 94°C por 1 minuto.
- anelamento a 55 °C por 3 minutos
- extensão a 72 °C por 1 minuto.

♦ Um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos e uma temperatura de manutenção a 4 °C.

Todo o processo foi efetuado em duplicata.

➤ Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese horizontal com 1,8% de agarose em gel e corado com brometo etídeo, a 100V por 180 minutos

e visualizado em luz ultravioleta em transiluminador UVP e a aquisição da imagem foi feita em *software* LabWorks, versão 4.0, UVP.

Adicionou-se em tubo tipo Eppendorff 8 μL do produto da PCR, ao qual adicionou-se azul de bromofenol. Em cada gel também foi adicionado marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Invitrogen, USA) corado com 5 μL de solução de azul de bromofenol. No mesmo gel ainda efetuou-se prova em branco, ou seja, ausência de DNA bacteriano.

As amostras foram aplicadas nas posições correspondentes aos poços do gel de agarose e anotadas. Imediatamente colocou-se tampão TAE 1X na cuba de eletroforese e realizou-se a corrida a 100 V por 180 minutos à temperatura ambiente.

Todo o processo foi efetuado em duplicata.

6.6 Quantificação de Colifagos

A determinação de colifagos foi realizada conforme Norma CETESB L5.225- Determinação de colifagos em amostras de água (1990) e *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (20th ed., 2000).

A cultura bacteriana hospedeira empregada foi a *Escherichia coli* C (ATCC 13706).

Para a realização do teste volumes de 5 mL de amostra foram inoculados a 4 tubos de ensaio contendo meio de cultura ágar de soja e tripton modificado, e adicionado 1 mL da cultura da bactéria hospedeira em cada um dos tubos contendo o meio de cultura e a amostra. Após homogeneização o

conteúdo de cada tubo foi vertido em placas de Petri contendo ágar de soja e triptona.

As placas de Petri foram incubadas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por um período de 4 a 6 horas, a seguir realizou-se a contagem de todas as placas de lise formadas no ágar. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Placas(UFP)/100 mL.

6.7 Determinação de ovos de helmintos

O ensaio para determinação de helmintos foi efetuado segundo Norma CETESB L5.550 – Helmintos e Protozoários Patogênicos – Contagem de ovos e cistos em amostras ambientais (1989).

Volumes de 1000 mL de amostra foram filtradas através de gaze cirúrgica sendo este recolhido recolhido em copo de béquer de 1000 mL.

Técnica de centrífugo-flutuação (para detecção de ovos leves de helmintos)

Após a preparação da amostra, volumes de 500 mL da amostra foram centrifugados a 2500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante resultante foi desprezado e o sedimentado obtido foi ressuspenso em 50 mL de água de diluição para ressuspender o sedimento obtido. A operação de centrifugação foi repetida quantas vezes fossem necessárias para se obter um sobrenadante claro.

Ao sedimento total foram adicionados 50 mL de solução de sulfato de zinco a 33% até completar o volume do tubo, e então efetuou-se centrifugação

a 2500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação a amostra foi preparada para exame microscópico.

Técnica de sedimentação (para detecção de ovos pesados de helmintos)

Volume de 500 mL da amostra foram distribuídos em tubo cônico e deixado em repouso para sedimentação por 24 horas. Passadas as 24 horas a amostra foi preparada para exame microscópico.

Exame microscópico

Para as amostras preparadas pela técnica de centrífugo-flutuação, efetuou-se a retirada da película superficial do sobrenadante, a qual foi depositada em lâminas de vidro para observação de todo o sedimento. Adicionou-se ao material da lâmina de vidro 1 gota de solução de lugol e coberta por uma lamínula.

Para as amostras preparadas pela técnica de sedimentação, o material depositado foi aspirado através de uma pipeta Pasteur e colocado em lâminas de vidro. Em metade delas adicionou-se 1 gota de lugol e as demais lâminas foram examinadas sem corante. Cada lâmina foi coberta com lamínula.

Viabilidade dos ovos de helmintos (YANKO 1988)

Para o exame de viabilidade de ovos de helmintos os "*pellets*" foram ressuspensos em uma solução de 0,1% de ácido sulfúrico em tubos com tampa e incubados a 26°C por 3 – 4 semanas. A cada semana realizou-se a observação em lâmina de Sedgewick Rafter ao microscópio para verificação da presença de ovos embrionários .

Como controle de ovo viável foram utilizados ovos de *Ascaris lumbricoides* encontrados em lodo de esgoto bruto.

Os resultados foram expressos em ovos/L.

6.8 Determinação de pH, turbidez e temperatura

A determinação desses parâmetros realizou-se por fitas de medição de pH e termômetro para medição da temperatura, sendo a medição realizada no momento da amostragem. A determinação da turbidez foi realizada em turbidímetro no laboratório da Faculdade de Saúde Pública.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho de pesquisa, foram coletadas amostras de esgoto doméstico tratado por sistema de lagoas de estabilização (lagoa anaeróbia seguida de lagoa facultativa) e do esgoto tratado submetido ao processo de desinfecção com a utilização de cloro (hipoclorito de sódio) e ozônio, em diferentes dosagens e tempos de contato, do município de Lins (SP)

Os resultados obtidos de cada amostra analisada constam dos anexos.

Como a legislação brasileira não estabelece padrões de qualidade microbiológicos em relação às águas de reúso para aplicação na agricultura, foram utilizados como base os valores propostos pela Organização Mundial de Saúde – OMS (1989), os quais serviram como referência para a análise dos resultados encontrados nesta pesquisa.

7.1 Resultados microbiológicos e parasitológicos das amostras do esgoto tratado

7.1.1 Coliformes totais, *E. coli* e ovos de helmintos

A densidade de coliformes totais no esgoto tratado situou-se entre $2,0 \times 10^7$ NMP/100mL a $7,7 \times 10^{12}$ NMP/100mL, apresentando média geométrica de $1,1 \times 10^7$ NMP/100mL. Observou-se eliminação de coliformes totais de 2 unidades de log em relação à média geométrica de coliformes totais no esgoto bruto ($1,1 \times 10^9$ NMP/100mL).

A concentração de *E. coli* no esgoto tratado variou de $< 1,0$ NMP/100mL a $2,4 \times 10^7$ NMP/100mL, com média geométrica de $3,9 \times 10^5$ NMP/100mL. Verificando-se remoção de *E. coli* na faixa de 2,8 unidades de log em relação à média geométrica de *E. coli* no esgoto bruto ($2,5 \times 10^8$ NMP/100mL) (Anexo 1).

Observou-se redução de 1 a 7 logs em relação aos valores absolutos de densidade de *E.coli* nas amostras analisadas de esgoto bruto e após tratamento, com taxa de remoção de 99,8% em relação às médias geométricas de entrada e saída do sistema de tratamento. Os valores encontrados indicam alta densidade de bactérias indicadoras de contaminação fecal, evidenciando a grande possibilidade da presença de microrganismos patógenos, podendo ser considerado fator de risco à saúde pública, principalmente às pessoas expostas a essas águas.

A figura 9 ilustra as densidades de coliformes totais e *E. coli* encontradas nas amostras de esgoto doméstico tratado.

Figura 9: Densidade de coliformes totais e *E.coli* em amostras de esgoto tratado por lagoas de estabilização, Lins (SP), novembro/2001 a setembro/2002

Mesmo com alta eficiência de remoção de *E. coli*, em apenas duas oportunidades estudadas (6,7%) observou-se valores que atendiam aos recomendados pela OMS (1989) para irrigação irrestrita (categoria A). Há

alguns fatores do sistema de tratamento empregado que podem ter influenciado o não atendimento às recomendações bacteriológicas da OMS (1989), tais como grande quantidade de algas e sólidos nas lagoas anaeróbia e facultativa ou então condições de sobrecarga ou muito próximas ao limite de operação do sistema de tratamento.

Não se observou padrão sazonal nas concentrações de coliformes totais e *E. coli* ao longo do estudo, houve um leve aumento de densidade de coliformes totais nos meses de fevereiro e março, porém não se caracterizando em padrão sazonal.

Vários autores como CASTRO de ESPARZA e MUÑOZ (1990), quando avaliaram qualidade de esgotos domésticos tratados por lagoas de estabilização, encontraram valores de coliformes fecais acima de $10^3/100\text{mL}$. O mesmo foi relatado por OUZZANI e col (1995) que obtiveram concentração de coliformes fecais superiores aos valores sugeridos pela OMS (1989), assim como BASTOS e MARA (1995) que constataram qualidade bacteriológica de esgotos tratados por sistema de lagoas de estabilização levemente inferior à proposta da OMS (1989). Situações semelhantes foram relatadas por BOTERO e col. (1997), DEVAUX e col. (2001), ORON e col. (2001) e MADERA e col. (2002) que também observaram o não atendimento aos padrões bacteriológicos de esgotos tratados estabelecidos pela OMS (1989) para irrigação irrestrita. Em nosso meio, CEBALLOS e col. (1995), no estado da Paraíba, detectaram densidade de coliformes fecais de $4,6 \times 10^5$ NMP/100mL no esgoto tratado por célula única de lagoa facultativa. KÖNIG e col. (1997), no mesmo estado, encontraram concentração de coliformes fecais de $10^5/100\text{mL}$ no efluente resultante de esgoto sanitário submetido a tratamento por lagoas de estabilização. Resultados semelhantes foram verificados por ARAUJO (2003) que encontrou densidade de coliformes fecais de 10^5 a 10^7 NMP/100mL em amostras de esgoto tratado em Feira de Santana (BA).

Por outro lado, KOURAA e col. (2002), no Marrocos, obtiveram qualidade bacteriológica desejável referente aos valores-guia da OMS (1989) à irrigação irrestrita em esgotos sanitários tratados por lagoas de estabilização.

Vários pesquisadores apontaram que uma concentração de coliformes fecais de $10^3/100\text{mL}$ é bastante restritiva. Há casos em que a concentração de coliformes fecais de $10^4/100\text{mL}$ pode ser considerada bastante razoável, como pontuou CASTRO de ERPARZA e MUÑOZ (1990). BLUMENTHAL e col. (1996) apontaram que densidade de $\leq 10^4/100\text{mL}$ de coliformes fecais para irrigação restrita (categoria B) poderia ser considerada adequada. Mais tarde, em 2000, BLUMENTHAL e col., dividiram a categoria B (irrigação restrita) constante nas propostas da OMS (1989), dependendo do tipo de irrigação empregada e indicaram $\leq 10^5/100\text{mL}$ para categoria B1 (quadro 10). No México, o limite para coliformes fecais para irrigação irrestrita é de média diária de $\leq 2000/100\text{mL}$ e média mensal de $\leq 1000/100\text{mL}$ (BLUMENTHAL e col., 2000).

Em relação aos ovos de helmintos, 80,8% (21/26) das amostras analisadas apresentaram ovos de *Ascaris* e em 42,3% (11/26) das amostras detectou-se ovos viáveis de *Ascaris*. A média encontrada de ovos de *Ascaris* foi de 7,34 ovos/L (0 a 26 ovos/L) e de ovos viáveis de *Ascaris* foi de 2,23 ovos/L (0 a 22 ovos/L). Em nenhuma das oportunidades detectou-se a presença de ovos de *Trichuris* e ancilostomídeos, entretanto outros ovos de helmintos foram observados tais como: *Strongyloides* sp (7,7%), *Taenia* sp (34,6%), *Enterobius* sp (19,2%), *Hymenolepis* sp (26,9%), *Fasciola* sp (3,8%), *Schistosoma* sp (3,8%), sendo os mais freqüentes os *Taenia* sp, *Hymenolepis* sp, e *Enterobius* sp, como mostra a tabela 1. Em apenas 38,5% das amostras estudadas não se observou ovos desses organismos. A figura 10 mostra a presença de ovos de helmintos encontrados nas amostras de esgoto doméstico tratado estudadas.

Tabela 1: Frequência da ocorrência , em porcentagem, de ovos de helmintos em amostras de esgoto tratado, Lins (SP), no período de agosto/2001 a novembro/2002.

Ovos de helmintos	Frequência (%)
<i>Ascaris</i>	80,8
Ovos viáveis de <i>Ascaris</i>	42,3
<i>Strongyloides sp</i>	7,7
<i>Taenia sp</i>	34,6
<i>Enterobius sp</i>	19,2
<i>Hymenolepis sp</i>	26,9
<i>Fasciola sp</i>	3,8
<i>Schistosoma sp</i>	3,8

A exemplo do que ocorreu com bactérias indicadoras de contaminação fecal, não se verificou padrão sazonal na distribuição dos ovos de helmintos nas amostras analisadas.

Os resultados obtidos revelaram que a qualidade sanitária do esgoto tratado analisado não alcançou os valores-guia de $<10^3$ coliformes fecais/100mL e <1 ovo de helminto/L propostos pela OMS (1989) para irrigação irrestrita (categoria A) e também para irrigação restrita enquadrada na categoria B, onde se preconiza densidade <1 ovo de helmintos/L.

Figura 10: Ocorrência de ovos de helmintos no esgoto tratado, agosto de 2001 a setembro de 2002, Lins (SP).

Os achados dessa pesquisa quanto a ovos de helmintos são semelhantes aos de SEMENAS e col. (1999), na Argentina, que encontraram ovos de helmintos (*Hymenolepis nana*, *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*) no esgoto sanitário tratado e de FASCILOLO e col. (2002), também na Argentina, que relataram a presença de ovos de helmintos em esgotos tratados por valos de oxidação. No nordeste brasileiro, STOTT e col. (1994) *apud* AMAHMID e col. (2001) encontraram concentração média de ovos de *Ascaris* de 50 ovos/L em esgoto sanitário tratado, nessa pesquisa a média detectada foi de 7,34 ovos de *Ascaris*/L. Outros autores, entretanto, relataram ausência de ovos de helmintos quando analisaram e avaliaram qualidade microbiológica de esgotos tratados destinados à irrigação

agrícola. CEBALLOS e col. (1995) obtiveram eliminação total de ovos de *Ascaris* após tratamento em lagoa facultativa com 61 dias de tempo de retenção hidráulica. Resultados similares foram relatados por OUZZANI e col. (1995), MARECOS de MONTE e col. (1996), AMAHMID e col. (2002) e MADERA e col. (2002). Ainda CUTOLO (2002) relatou a presença de ovos de helmintos em esgotos tratados por sistema de lodos ativados em Barueri, com esgotos provenientes da Região Metropolitana de São Paulo, e destacou que a ocorrência desses organismos constitui o principal problema para reúso dessas águas. Os mesmos resultados foram verificados por ARAUJO (2003) que encontrou ovos de helmintos em amostras de esgoto tratado por diferentes sistemas em Feira de Santana (BA).

A presença de ovos de helmintos representa riscos à saúde de populações expostas a águas residuárias conforme relatado por SHUVAL (1986), BLUMENTHAL e col. (1991-92), CIFUENTES e col. (1991-92, 1993 e 1994), BOUHOUM & AMAHMID (2000) e HABBARI e col. (2000b) relataram em suas pesquisas, que destacou, que dentre outros microrganismos de importância na avaliação de águas de reúso, os ovos de helmintos como os que apresentam maior risco à saúde devido a sua longa persistência no ambiente, baixa dose infectante e aquisição de curta ou nenhuma imunidade.

A importância do controle de ovos de helmintos em esgotos empregados na irrigação agrícola tem sido discutida e estudada por vários autores. BLUMENTHAL e col. (2000), em reavaliação efetuada sobre padrões desses organismos propostos pela OMS (1989), restringiram ainda mais os valores, sugerindo um valor de $\leq 0,1$ ovo/L para a cultivos da categoria A (irrigação irrestrita) e ainda desdobraram a categoria B (irrigação restrita) em 3 condições: B1, B2 e B3, descritas no quadro 8, sendo que para a categoria B3 a recomendação para concentração de ovos de helmintos mais adequada seria a mesma que para a categoria A. Essas proposições feitas pelos pesquisadores

são resultantes de investigações epidemiológicas realizadas em grupos de pessoas expostas a esgotos brutos e tratados utilizados na irrigação de campos de cultivos em comparação aos grupos não expostos a tais condições.

A qualidade sanitária de esgotos domésticos tratados tem sido objeto de estudos como potencial recurso à irrigação de cultivos agrícolas (SHUVAL, 1986; SALGOT e PASCUAL, 1996; WESTCOT, 1997; ASANO e LEVINE, 1998; BLUMENTHAL e col. 2001). Nessa pesquisa revelou-se que o esgoto tratado no sistema de lagoas de estabilização de Lins não apresentou qualidade desejável se destinado à irrigação de cultivos enquadrados na categoria A (irrigação irrestrita) pela OMS (1989). Não se deve, porém, descartar o potencial desses efluentes como recurso de irrigação agrícola, mas repensar seus propósitos e formas de melhorar a sua qualidade sanitária. Uma alternativa seria a avaliação da configuração do sistema de tratamento para se atingir qualidade microbiológica adequada como propôs MARECOS de MONTE e col. (1996), sugerindo em seu trabalho de pesquisa a implementação do sistema de lagoas de estabilização existente com a implantação de uma lagoa de maturação, cuja função seria possibilitar um polimento ao efluente resultante do tratamento por lagoa anaeróbia e facultativa. Segundo VON SPERLING (1996), o principal objetivo das lagoas de maturação é o de remoção de patógenos, constituindo-se em uma alternativa à desinfecção desses efluentes por métodos convencionais. Ainda MARECOS de MONTE e col. (1996) consideraram como alternativa a mistura em águas naturais a esgotos tratados com qualidade não compatível à irrigação irrestrita a fim de melhorar sua qualidade. MOSCOSO (1995) e AYRES (1992) consideraram o emprego de várias células em sistemas de lagoas de estabilização para remoção de 100% de ovos de helmintos e cistos de protozoários.

Outro aspecto a ser considerado é o tipo de irrigação a ser empregada, segundo SHUVAL (1986), LÉON e CAVALLINI (1999) e BLUMENTHAL e col.

(2000) a aplicação de técnicas de irrigação pode ser fator relevante de risco de impactos à saúde, particularmente de agricultores e seus familiares. Relataram que a irrigação por inundação apresenta risco de contaminação de cultivos de pequeno porte e tubérculos devido ao contato direto com a água de irrigação e que agricultores estariam mais expostos à contaminação. Os vegetais submetidos à irrigação por sulcos não estariam em contato direto com a água, fato que não ocorre com os agricultores, portanto não sendo o método mais eficiente em relação à proteção à saúde desses trabalhadores. A irrigação por aspersão, quando manejada inadequadamente, pode vir a contaminar plantas de maior porte (árvores frutíferas) e também podem ser veículo de microrganismos patogênicos, quando presentes, a áreas circunvizinhas. A irrigação localizada (por gotejamento ou microaspersão) é o método que gera menor risco de contaminação tanto dos cultivos como dos agricultores e consumidores.

Há também a alternativa de destinar esses esgotos tratados à irrigação de cultivos pertencentes a outras categorias propostas pela OMS (1989), como B e C. A categoria B engloba culturas de cereais, industriais e forrageiras, prados e árvores, cujo grupo exposto é de trabalhadores e a categoria C que especifica o tipo de irrigação e não assume nenhum grupo como exposto. Essa, talvez, possa ser encarada como alternativa temporária, pois melhor seria a busca da obtenção de um efluente de melhor qualidade microbiológica minimizando, assim, riscos à saúde pública e de impacto ambiental.

Não há dúvidas, portanto, na importância da existência de barreiras sanitárias na proteção à saúde pública de expostos e não expostos quando da prática de reúso de águas servidas, como abordaram vários autores como STRAUSS (1991), SHUVAL (1996), SALGOT e col. (2001).

Solução apontada como estratégica na melhoria da qualidade sanitária de esgotos tratados são os processos de desinfecção com cloro, ozônio e radiação ultra violeta. Na pesquisa em questão os dois sistemas de desinfecção utilizados foram a cloração com hipoclorito de sódio e a ozonização.

7.1.2 Ocorrência de *Salmonella*

A presença do gênero *Salmonella* foi pesquisada em amostras do esgoto doméstico tratado e também em amostras desse esgoto submetido aos processos de desinfecção por hipoclorito de sódio e ozônio. Os resultados das análises constam do anexo 2.

Das 22 amostras de esgoto doméstico tratado analisadas detectou-se a presença de *Salmonella* em 8 amostras (36,4%), como ilustra a figura 11.

Figura 11: Ocorrência do gênero *Salmonella* em amostras de esgoto sanitário tratado por sistemas de lagoas de estabilização, Lins (SP).

As cepas que apresentaram reação sorológica positiva para *Salmonella* foram submetidas à confirmação mediante ensaio de PCR segundo SOUMET e col. (1999) como mostra a figura 12. Não foram detectadas os sorotipos *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Entereditis.

Figura 12: Imagem do gel de agarose obtido da corrida eletroforética do ensaio de PCR em algumas cepas de *Salmonella* oriundas do esgoto tratado, Lins (SP).

Os resultados obtidos, nessa pesquisa, não demonstraram padrão sazonal dessas bactérias como ilustra a tabela 2, apenas um aumento em sua frequência foi observado nos meses de verão.

Tabela 2: Ocorrência do gênero *Salmonella*, segundo as estações do ano, em amostras do esgoto tratado, Lins (SP), novembro/2001 a setembro/2002.

Estações do ano	Nº de amostras	Frequência de <i>Salmonella</i>
		(%)
Primavera	3	33,3
Verão	7	42,8
Outono	6	33,3
Inverno	6	33,3
Total	22	

Os resultados obtidos mostraram-se convergentes aos relatos de EMPARAZA-KNÖRR e TORRELLA (1995) que encontraram *Salmonella* em esgotos tratados por lagoas de estabilização utilizados na irrigação agrícola. ARRIDGE e col. (1995) em estudo realizado em Campina Grande (PB), detectaram *Salmonella* em esgoto doméstico tratado em sistemas de lagoas de estabilização constituído por 17 lagoas (anaeróbias e facultativas). Outros autores como SHEIKH e col. (1999), DEVAEUX e col. (2001), FASCILOLO e col. (2002) e MADERA e col. (2002) observaram a ocorrência dessas enterobactérias em esgotos tratados. Por outro lado, ARRIDGE e col. (1995) pesquisaram a presença de *Salmonella* em outro sistema de tratamento, também em Campina Grande (PB), constituído de lagoas anaeróbias, facultativas e de maturação, e não detectaram a ocorrência desse patógeno.

Sugerindo a importância de lagoas de maturação na remoção de organismos patogênicos como apontou VON SPERLING (1996).

Em decorrência dos resultados obtidos, evidencia-se a importância da verificação da presença desses patógenos em águas servidas destinadas à irrigação agrícola como abordou MARECOS de MONTE e col. (1986) e SHUVAL (1993), principalmente quando águas entram em contato direto com agricultores. Há também relatos de detecção dessas bactérias em hortaliças consumidas cruas (SHUVAL 1993 ; EMPARANZA-KNÖRR & TORRELLA 1995; MARQUES e col. 2003).

7.1.3 Presença de colifagos

Pesquisou-se a ocorrência de colifagos em amostras do esgoto tratado por sistema de lagoas de estabilização e amostras desse esgoto submetido a desinfecção com hipoclorito de sódio e ozônio. Os resultados das análises de determinação de colifagos constam do anexo 3.

Os resultados obtidos mostraram que a média geométrica de colifagos no esgoto tratado foi de $9,5 \times 10^2$ UFP/100 mL, exibindo densidades variando de $6,0 \times 10^2$ a $8,5 \times 10^4$ UFP/100mL, como ilustra a figura 13. A taxa de remoção de colifagos no sistema de tratamento foi de 99,6%, em relação às médias geométricas da densidade desses organismos considerando-se a entrada e a saída do sistema.

Figura 13: Densidade de colifagos em amostras do esgoto tratado por lagoas de estabilização, Lins (SP), período de novembro/2001 a setembro/2002.

Nessa pesquisa não se constatou elevada quantidade de colifagos no esgoto tratado, entretanto não se pode assegurar ausência de risco por contaminação vírica diante da exposição de populações a essas águas.

As densidades de colifagos encontradas no presente trabalho apresentam-se próximas à relatada por CEBALLOS e col. (1995) que dectaram concentração de colifagos da ordem de $10^4/100\text{mL}$ em amostras de esgoto doméstico tratado por única célula de lagoa facultativa. Resultados similares foram também obtidos por BOTERO e col. (1997) que constatarem densidade em torno de $10^4\text{UFP}/100\text{mL}$, após passagem por lagoa facultativa e de maturação, em 3 diferentes sistemas de tratamento avaliados.

Já EMPARANZA-KNÖRR e TORRELLA (1995) observaram concentrações bastante elevadas desses microrganismos em esgotos domésticos tratados por lagoas de estabilização (10^3 a 10^4 UFP/mL), o que demonstrou elevada densidade desses organismos nas amostras do esgoto avaliadas. Se é verdadeira a premissa entre a semelhança de sobrevivência

entre colifagos e enterovírus, esses resultados sugerem que também os enterovírus estariam presentes em grandes quantidades nessas águas, podendo resultar em risco à saúde pública, devido a esses microrganismos.

Em relação à taxa de remoção observada nessa pesquisa, os valores obtidos foram próximos ao observado por BOTERO e col. (1997), que verificaram redução desses organismos de 93,3 a 97% em 3 distintos sistemas de tratamento de esgotos estudados. CAMPOS e col. (2002) obtiveram baixa porcentagem de remoção desses microrganismos em dois distintos sistemas de tratamento investigados, as remoções foram de 25 e 79%.

7.2 Resultados dos parâmetros microbiológicos e parasitológicos em amostras do esgoto tratado submetido à desinfecção com hipoclorito de sódio

7.2.1 Coliformes totais, *E. coli* e ovos de helmintos

Os resultados encontrados após desinfecção do esgoto tratado com hipoclorito de sódio variaram de acordo com a dosagem aplicada e o tempo de contato, como mostram as figuras 14 e 15.

A única dosagem aplicada de 1,6 mg/L de hipoclorito de sódio por 30 minutos não apresentou redução de coliformes totais e *E.coli*. Quando se aplicou 1,8 mg/L de hipoclorito de sódio com 3 tempos de contato distintos: 5, 10 e 15 minutos; observou-se que para o tempo de contato de 5 minutos houve redução na densidade de coliformes totais de 0,70 log e de *E. coli* praticamente de 0,66 log de remoção, para os tempos de 10 e 15 minutos a redução observada foi de 0,93 e 0,70 para coliformes totais e para *E.coli* 1,66 e 1,34 logs, respectivamente. Para a aplicação de 2,1 mg/L por 12,5 minutos de contato, a densidade de coliformes totais diminui em 2,54 logs. Para *E. coli* não

foi possível avaliar essa condição uma vez que a concentração desse microrganismo no esgoto tratado foi $<1,0$ NMP/100mL.

A dosagem de 3,0 mg/L de hipoclorito de sódio foi aplicada em 2 oportunidades, sendo a primeira com diferentes tempos de contato e a segunda apenas com 30 minutos de contato. Na primeira ocasião constatou-se remoção próxima de 1 log de coliformes totais e para *E. coli* variou de 1,23 a 1,74 logs, dependendo do tempo de contato, que variou de 5 a 50 minutos com intervalos de 5 minutos. Na segunda oportunidade analisada não houve decréscimo na densidade de coliformes totais, pelo contrário, verificou-se aumento de aproximadamente 1 log. Para *E. coli* não se detectou remoção representativa.

Na faixa de 5,0 a 5,9 mg/L, verificou-se variações na redução de coliformes totais e *E.coli* em função do tempo de contato aplicado. A remoção de coliformes totais variou de 0,7 a 2,83 logs e para *E.coli* de 0 a 3,2 logs, sendo que o decaimento mais acentuado de *E. coli* deu-se após 40 minutos de contato, alcançando qualidade levemente inferior aos valores-guia recomendados pela OMS (1989). Condição distinta foi a remoção de 4 logs na densidade de *E. coli* com a aplicação de 5,6 mg/L de hipoclorito de sódio a um tempo de 20 minutos de contato atingindo valor inferior a 10^3 coliformes fecais/100mL, condição compatível à irrigação irrestrita.

Figura 14: Remoção (log) de coliformes totais e *E.coli* após desinfecção do esgoto tratado com hipoclorito de sódio, doses de 1,6 a 9,7 mg/L, frente a diferentes tempos de contato.

Figura 15: Remoção (log) de coliformes totais e *E.coli* após desinfecção do esgoto tratado com hipoclorito de sódio, doses de 10 a 26,6 mg/L, frente a diferentes tempos de contato.

Na dosagem de 7,0 mg/L houve remoção de 1,23 a 1,87 logs para coliformes totais e de 0,53 a 2,75 logs para *E.coli*. Para 5 minutos de contato o decaimento de coliformes totais foi de 1,23 e para *E. coli* foi de 0,53 log. Reduziu-se, para contato de 10 minutos, 1,50 logs de coliformes totais e 0,53 log na concentração de *E. coli*. Para os tempos de contato de 15 e 20 minutos a remoção de coliformes totais foi de 1,44 e 1,87 logs e *E. coli* de 2,33 e 2,75 logs

respectivamente. A aplicação de 7,6 mg/L foi bastante eficiente na redução de *E. coli*, apresentando valores abaixo de 10^3 coliformes fecais/100mL.

Dosagens de 8,0 a 8,6 mg/L foram aplicadas em 4 ocasiões com diferentes tempos de contato. A aplicação de 8,0 mg/L deu-se em 2 oportunidades. A primeira com tempo de contato de 5 a 40 minutos com intervalos de 5 minutos, e os resultados obtidos foram reduções de 0,45 a 1,69 logs para *E.coli* sendo o decaimento mais elevado após 35 minutos de contato. Na segunda oportunidade os tempos de contato foram de 10, 20 e 30 minutos, a remoção de 6 logs na densidade de coliformes totais ocorreu após 30 minutos de contato e de *E. coli* a redução foi bastante significativa com valores inferiores a 10^3 coliformes fecais/100mL, o mesmo ocorrendo para as concentrações de 8,1 a 8,6 mg/L, exceto em duas situações, os valores de *E. coli* detectados foram inferiores a 10^3 coliformes fecais/100mL.

Duas situações bastante eficientes em relação à remoção de coliformes fecais e *E. coli* foram verificadas quando da aplicação de concentrações de 9,5 a 9,7 mg/L de hipoclorito de sódio, onde os efluentes apresentaram densidades de *E.coli* muito inferiores aos valores guia propostos pela OMS (1989) para todos os tempos de contato ensaiados (5, 10, 20, 30 e 40 minutos). Apenas na segunda situação com a aplicação de 9,7 mg/L não se atingiu valores menores que 10^3 de coliformes fecais/100mL em nenhum tempo de contato praticado.

Para concentrações de 10,0 a 10,5 mg/L de hipoclorito de sódio, observou-se variações muito grandes comparando-se os 3 momentos ensaiados. No primeiro momento, com tempo de contato variando de 5 a 50 minutos com intervalos de 5 minutos, houve remoção total de *E. coli* após 25 minutos de contato. No segundo momento a concentração de *E. coli* decaiu de 1 a 2 logs e em alguns episódios houve elevação de 1 log em sua concentração, e no terceiro momento houve remoção total de *E. coli* após 10

minutos de contato. Esse mesmo achado repetiu-se na dosagem de 11,2 a 11,6 mg/L, onde no primeiro momento com tempos de contato de 13, 26, 39 e 52 minutos houve redução total tanto de coliformes totais como de *E. coli*, já no segundo momento com tempos de contato de de 5 a 40 minutos, com 5 minutos de intervalo, não houve remoção representativa de coliformes totais e de *E. coli*.

O fato de que em alguns episódios ocorreu aumento ao invés de diminuição na densidade de bactérias indicadoras de contaminação fecal pode ser atribuída às variações de sólidos no efluente final devido a grandes quantidades de algas, o que pode ter influenciado negativamente sobre a eficiência de remoção dessas bactérias.

As dosagens de 15,0 a 15,4 mg/L mostraram-se bastante eficientes na remoção de coliformes totais e *E. coli* alcançando-se valores desejáveis para irrigação de cultivos pertencentes à categoria A (irrigação irrestrita) pela OMS (1989), apenas duas situações não apresentaram os valores requeridos.

Na única ocasião em que a concentração de 26,6 mg/L foi aplicada por 20 minutos não se observou queda significativa para coliformes totais e *E. coli*, portanto tal efluente não apresentou qualidade bacteriológica adequada à irrigação irrestrita. Devido ao fato que essa condição de desinfecção não se repetiu em outras ocasiões, não foram obtidos dados suficientes para a avaliação da eficiência dessa condição específica – 26,6 mg/L de hipoclorito de sódio por 20 minutos – na eliminação de bactérias indicadoras de contaminação fecal.

Os dados apresentados relativos à desinfecção com hipoclorito de sódio mostraram variações mesmo quando dosagens iguais ou próximas foram aplicadas. Notou-se, porém, melhor desempenho para as concentrações de 8,6

mg/L a 15 mg/L de hipoclorito de sódio com tempos de contato superiores a 15 minutos para atender aos valores guia da OMS (1989) para irrigação irrestrita.

A literatura consultada mostrou dados diferentes dos encontrados nesse trabalho de pesquisa. JIMENÉZ e col. (2001) observaram que uma aplicação de 12 mg cloro/L por 3 horas de tempo de contato foi suficiente para alcançar qualidade desejável e DANIEL e CAMPOS (1993) evidenciaram a necessidade de dosagens superiores a 10 mg cloro/L em esgotos para obtenção de concentrações de coliformes inferiores a 100/100mL.

A verificação da concentração de cloro residual nas amostras tratadas com hipoclorito de sódio pode se constituir em informação importante na avaliação do processo de desinfecção, pois em situações onde há alta concentração de sólidos, o cloro pode perder sua ação desinfetante e formar organoclorados. Outro aspecto a se considerar seria a de avaliar o ponto de dosagem do desinfetante; pode haver casos em que este local de dosagem não é o mais adequado não conferindo mistura completa.

Em relação à redução de ovos de helmintos no esgoto tratado submetido ao processo de desinfecção com hipoclorito de sódio, os resultados mostraram que não houve remoção nas situações estudadas, a figura 16 ilustra a presença de ovos de helmintos no esgoto tratado e no anexo 5 estão ilustrados os resultados obtidos nas análises de ovos de helmintos nas amostras do esgoto sanitário tratado e desinfetado com hipoclorito de sódio.

Data da coleta	Ovos de <i>Ascaris</i>	Ovos viáveis de <i>Ascaris</i>	Outros ovos
27-ago-01			
02-out-01			
06-nov-01			
03-dez-01			
17-dez-01			
07-jan-01			
21-jan-02			
05-fev-02			
18-fev-02			
06-mar-02			
18-mar-02			
02-abr-02			
17-abr-02			
08-mai-02			
20-mai-02			
03-jun-02			
25-jun-02			
11-jul-02			
24-jul-02			
08-ago-02			
19-ago-02			
11-set-02			

Figura 16: Ocorrência de ovos de helmintos no esgoto doméstico tratado e submetido ao processo de desinfecção com hipoclorito de sódio, agosto de 2001 a setembro de 2002, Lins (SP).

Diferentes doses de hipoclorito de sódio e tempos de contato foram aplicados. Na única aplicação da dose de 1,8 mg/L por 15 minutos detectou-se concentração de ovos de *Ascaris* mais elevada do que a encontrada no esgoto sem desinfecção e ovos viáveis de *Ascaris* estavam presentes assim como ovos de *Taenia sp.* Quando se dosou hipoclorito de sódio na faixa de 2,0 mg/L (2 ocasiões) por 30 minutos verificou-se ocorrência de ovos de *Ascaris* mas nenhum apresentava-se viável.

Nas aplicações de 5,0 e 5,6 mg/L, ovos de *Ascaris* foram detectados mas não foram considerados viáveis, para a dosagem de 5,9 mg/L não se constatou

ovos de helmintos, mas estes já não apareciam no efluente antes do tratamento com hipoclorito de sódio. Na única aplicação efetuada de 6,4 mg/L, não se detectou ovos de *Ascaris* viáveis ou não, porém encontraram-se ovos de *Hymenolepis nana* e *Taenia sp.* Nas dosagens de 7,0 e 7,6 mg/L, na primeira situação constatarem-se ovos de *Ascaris* em todos os tempos de contato ensaiados (5, 10 e 20 minutos) e ainda se constatou a presença de ovos de *Taenia sp.* Na segunda condição, 7,6 mg/L, não se verificou a presença de ovos de *Ascaris* e de nenhum outro gênero, assim como ocorreu também antes do processo de desinfecção.

As aplicações de 8,0 mg/L de hipoclorito de sódio foram ensaiadas em 3 oportunidades. Na primeira delas o tempo de contato foi de 40 minutos e constatou-se a presença de ovos viáveis de *Ascaris* e ovos de *Enterobius sp.* A segunda ocasião, com tempo de contato de 30 minutos, não se verificou a presença de ovos de *Ascaris* mas ovos de *Hymenolepis sp* foram detectados, e na terceira oportunidade, também com 30 minutos de tempo de contato, não foram observados ovos de helmintos, repetindo-se o resultado obtido antes da desinfecção. Para 8,6 mg/L houve ausência de ovos de *Ascaris*, verificou-se mesmo resultado no efluente final sem desinfecção, porém ovos de *Hymenolepis sp* foi detectado.

Na faixa de dosagem de 9,5 e 9,7 mg/L, por 30 minutos de contato, observou-se que na dosagem de 9,5 mg/L não havia ovos de helmintos assim como no efluente final sem desinfecção. Nas dosagens de 9,7mg/L, na primeira ocasião verificou-se ausência de ovos de *Ascaris* e presença de *Taenia sp* e *Hymenolepis sp.* Na segunda ocasião apenas se constatou a ocorrência de ovos de *Hymenolepis sp.*

Para as doses de 11,2 e 11,6 mg/L os tempos de contato foram de 26 e 40 minutos, respectivamente. Em contraste com o resultado encontrado no

efluente final sem tratamento por hipoclorito de sódio, na dosagem de 11,2 mg/L encontraram-se ovos viáveis de *Ascaris* e *Taenia sp.* O mesmo ocorreu para a dose de 11,6 mg/L onde se detectou ovos viáveis de *Ascaris* e ovos de *Enterobius sp.*

As dosagens de 15 a 15,4 mg/L de hipoclorito de sódio foram ensaiadas em 4 episódios, com tempos de contato de 30, 35 e 40 minutos. Em três deles houve a presença de ovos viáveis de *Ascaris* e ovos de *Taenia sp* e *Hymenolepis sp.*

Na única aplicação de 26,6 mg/L por 20 minutos de contato, verificou-se a ocorrência de ovos viáveis de *Ascaris* e ovos de *Taenia sp.*

Em nenhuma das amostras analisadas foram detectados ovos de helmintos dos gêneros *Trichiura* e de ancilostomídeos, também estabelecidos como indicadores pela OMS (1989).

Não foram encontrados trabalhos, na literatura consultada, contendo avaliações a respeito da desinfecção com cloro ou seus derivados na remoção de ovos de helmintos. Há, portanto, consenso que a eliminação ou remoção desses organismos dá-se pela sedimentação de seus ovos em sistemas de lagoas de estabilização (SHUVAL 1986; ROLIM 2000 *apud* CAMPOS e col. 2002). Por esse motivo, o tempo de retenção hidráulico é fator importante, SHUVAL (1986) relatou que em sistemas de lagoas de estabilização constituído por 4 a 5 células em países quentes, caso do Brasil, com tempos de retenção hidráulica de 20 a 25 dias é capaz de remover 100% de ovos de helmintos. A OMS (1989) não recomenda tempos de retenção hidráulica nos sistemas de tratamento de esgotos domésticos destinados à irrigação irrestrita, sugere configuração adequada do sistema para remover coliformes fecais ao patamar desejável ($\leq 10^3/100\text{mL}$). Para as categorias B e C, propõe tempo de detenção

hidráulica de 8 a 10 dias dos esgotos no sistema de tratamento. O sistema lagoas de estabilização de Lins apresenta 15,5 dias de detenção.

7.2.2 Ocorrência de *Salmonella*

Nos esgotos domésticos tratados e submetidos a desinfecção com hipoclorito de sódio não se observou a presença de *Salmonella* em nenhuma das condições avaliadas, o mesmo foi relatado por JIMENEZ e col. (2001) que indicaram dose de 10 mg/L de cloro por um tempo de contato de 30 minutos suficiente para a remoção dessas bactérias no efluente tratado.

7.2.3 Ocorrência de colifagos

Em referência à utilização de hipoclorito de sódio como agente desinfetante, verificou-se que a concentração de colifagos variou inversamente de acordo com as doses e tempos de contato aplicados; quanto maior a dosagem do desinfetante, menor a concentração de colifagos.

A tabela 3 apresenta as remoções, em porcentagem e log, de colifagos em cada uma das situações estudadas.

Tabela 3: Taxa de remoção de colifagos, em % e log, e concentração de sólidos em amostras do esgoto tratado submetido à desinfecção por hipoclorito de sódio em diferentes doses e tempos de contato aplicados, Lins (SP), novembro de 2001 a setembro de 2002.

Esgoto tratado		Hipoclorito de sódio		Remoção	Remoção	Conc. Sólidos
UFP/100mL	mg/L	Tempo contato min.)	UFP/100mL	(%)	(log)	(mg/L)
5000	1,8	15,0	5000	0,0	0,0	NR
60000	2,1	12,5	5000	91,7	1,0	270
46000	3,0	30,0	24000	47,8	0,3	270
3000	5,0	30,0	4000	-33,3	*	230
15000	5,6	30,0	21000	-40,0	*	260
5000	5,9	30,0	800	84,0	0,8	153
86000	6,4	40,0	6000	93,0	1,2	NR
1500	7,6	30,0	300	80,0	0,7	90
15000	8,0	30,0	100	99,3	2,2	150
600	8,6	30,0	Ausente	100,0	**	140
7000	9,5	30,0	100	98,6	1,8	263
9000	9,7	30,0	400	95,6	1,4	110
6000	9,7	30,0	100	98,3	1,8	78
13000	11,2	26,0	200	98,5	1,8	189
4000	15,0	30,0	100	97,5	1,6	119
25000	15,0	35,0	35000	-40,0	*	250
20000	15,2	40,0	40000	-100,0	*	NR
6000	15,4	40,0	Ausente	100,0	**	193
12700	26,6	20,0	5000	60,6	0,4	230

* Aumento na concentração de colifagos ** remoção total NR Não Realizado

Analisando-se a tabela 3, pode-se observar que as eficiências de remoção variaram bastante em termos de porcentagem, dependendo da dose e tempos de contato empregados não permitindo uma avaliação mais apurada, já que as doses de hipoclorito de sódio assim como o tempo de contato aplicados variaram e apresentaram poucas repetições de cada condição a ser estudada.

A aplicação de 1,8 mg hipoclorito de sódio/L por 15 minutos não se mostrou eficiente na redução de colifagos, a concentração inicial manteve-se a mesma. Quando a dosagem empregada foi de 2,1 mg/L por 12,5 minutos de contato verificou-se redução de 91,7% e em unidade logarítmica foi de 1 log na

dosagem de 3,0 mg/L observou-se remoção de 47,8% e em unidade logarítmica não houve remoção.

A eliminação de colifagos foi de 1 a 2 unidades logarítmicas independentemente das doses e tempos de contato. Houve oportunidades em que ocorreu aumento na concentração de colifagos como quando da aplicação de 5,0 e 5,6 mg hipoclorito de sódio/L e tempo de contato de 30 minutos e nas dosagens de 15 mg/L por 35 minutos e 15,4 mg/L por 40 minutos.

O que poderia explicar tal fenômeno seria a alta concentração de sólidos no efluente resultando em consumo de cloro, tanto total como residual, e influenciando assim o processo de desinfecção. A concentração de sólidos apresentou valores de 230 a 260 mg/L (tabela 3) quando da aplicação de 5,0 e 5,6 mg/L de hipoclorito de sódio, respectivamente. Esses valores de concentração de sólidos em suspensão estão próximos às concentrações esperadas em torno de 200 mg/L (VON SPERLING 1996). Outro fator importante a ser considerado seria a verificação da ocorrência de mistura completa entre efluente e desinfetante.

Na presente pesquisa o processo de cloração não apresentou eficiências elevadas na eliminação desses organismos, exceto em duas ocasiões, aplicação das doses de 8,6 mg/L por 30 minutos e de 15,4 mg/L por 40 minutos, onde houve remoção total de colifagos.

PAIXÃO e col. (2002) demonstraram em seus estudos que a inativação de colifagos foi bastante eficiente mesmo em baixas concentrações de soluções de oxidantes, apresentando maior resistência à desinfecção que *E. coli*. Segundo BRYANT e col. (1992) apud PAIXÃO e col. (2001) tal fato pode estar associado à interferência do cloro com certas enzimas essenciais à sobrevivência das bactérias.

7.3 Resultados dos parâmetros microbiológicos e parasitológicos em amostras do esgoto tratado submetido à desinfecção com ozônio.

7.3.1 Coliformes totais, *E. coli* e ovos de helmintos

O outro processo de desinfecção empregado no esgoto sanitário tratado de Lins foi a ozonização. Os resultados obtidos constam do anexo 6.

A remoção de coliformes totais e *E. coli* obtida foi pouco representativa como mostram os resultados, sendo que em nenhuma das oportunidades estudadas constatou-se conformidade com os valores sugeridos pela OMS (1989). Os dois únicos episódios em que houve conformidade, essas amostras já apresentavam densidade de *E. coli* <1,0/100 mL no esgoto tratado antes do processo de ozonização, como mostra o quadro 11.

Em alguns casos, houve aumento na concentração de coliformes totais e *E. coli*, como em 2 ocasiões com aplicação de ozônio nas dosagens de 5,5 mg O₃/L com tempos de retenção de 9,5 minutos e na dosagem de 9,2 mg O₃/L por 14 minutos. Observou-se que houve momentos em que apenas a concentração de coliformes totais aumentou, quando se aplicou 6,5 mg O₃/L por 10 minutos e 7,0 mg O₃/L por 11 minutos, e em caso houve elevação da densidade de *E. coli* em 1 log, durante a aplicação de 7,3 mg O₃/L por 12,7 minutos

Quadro 11: Remoção (log) de coliformes totais e *E. coli* após aplicação de ozônio no esgoto tratado.

Dosagem (mg O ₃ /L)	Tempo de Contato (minutos)	Remoção	
		Coliformes totais (logs)	<i>E. coli</i> (logs)
1,85	2,85	1,60	0*
3,90	6,10	0,69	0,63
5,40	8,40	1,10	0,59
5,50	9,50	**	**
5,50	9,50	**	**
5,60	8,60	2,00	0*
6,50	10,00	**	0,32
6,60	10,30	0,83	1,11
7,00	11,40	**	**
7,30	11,00	**	0,07
7,30	12,70	**	**
7,40	11,60	0,89	0,54
8,60	13,30	1,75	0,97
8,70	13,60	0,18	0,53
8,70	13,00	1,20	0,10
9,20	14,00	**	**
9,60	15,00	0,06	0,97
13,40	20,90	**	1,55
27,00	34,00	1,00	1,00

* - o efluente tratado após a lagoa facultativa já exibia valores <1
 ** - houve aumento na densidade dos indicadores e não remoção

O ozônio é conhecido por sua alta eficiência como agente desinfetante, TANNER e col. (2003), no Arizona (EUA) realizaram experimento utilizando ozônio como agente desinfetante de esgoto tratado. Observaram queda de 3 logs na densidade de bactérias heterotróficas a um tempo de contato de 5 minutos, decaimento de 2 logs para coliformes totais e termotolerantes a uma exposição de 2 minutos. Os autores concluíram que a utilização de ozônio é alternativa bastante interessante na desinfecção de esgotos tratados. Porém na presente pesquisa não se verificou eficiência satisfatória na remoção de coliformes totais e *E. coli*. Fatores que possam influenciar na eficiência do

processo como variáveis físico-químicas e de operação da coluna de ozonização devem ser pesquisados com a finalidade de se adquirir conhecimentos na aplicação de ozônio para a desinfecção de esgotos.

No que tange a ovos de helmintos, não houve remoção desses organismos após utilização de ozônio como desinfetante, como mostra a figura 17.

Data da coleta	Ovos de <i>Ascaris</i>	Ovos viáveis de <i>Ascaris</i>	Outros ovos
06-nov-01			
14-jan-01			
21-jan-02			
05-fev-02			
18-fev-02			
06-mar-02			
18-mar-02			
17-abr-02			
08-mai-02			
20-mai-02			
03-jun-02			
25-jun-02			
11-jul-02			
24-jul-02			
08-ago-02			
19-ago-02			
11-set-02			

Figura 17: Presença de ovos de helmintos no esgoto doméstico tratado por ozonização, novembro de 2001 a setembro de 2002, Lins (SP).

Como já abordado anteriormente, a remoção desses ovos é devida à sedimentação nas lagoas do sistema de tratamento, associado ao tempo de detenção.

8.3.2 Ocorrência de *Salmonella*

A presença de *Salmonella* não foi detectada em nenhuma das oportunidades estudadas nas amostras tratadas pelo processo de ozonização. Os resultados obtidos estão de acordo com dados da USEPA (1999) onde se registra a alta sensibilidade dessas bactérias à ação desinfectante do ozônio.

7.3.3 Presença de colifagos

O decaimento de colifagos após desinfecção do esgoto tratado com ozônio foi da ordem de uma unidade logarítmica, não apresentando eficiência satisfatória desse indicador de vírus, como ilustra a tabela 4.

Tabela 4: Taxa de remoção de colifagos, em % e log, em amostras do esgoto tratado submetido à desinfecção com ozônio em diferentes doses e tempos de contato aplicados, Lins (SP), novembro de 2001 a setembro de 2002.

Esgoto tratado		Ozônio		Remoção	Remoção
UFP/100mL	mg/L	Tempo contato	UFP/100mL	(%)	(log)
		min.			
6000	5,5	9,5	200	96,7	1,5
85000	1,8	2,8	55000	35,3	0,2
7000	7,3	12,7	900	87,1	0,9
60000	5,6	8,6	2500	95,8	1,4
15000	6,9	10,8	1500	90,0	1,0
5000	3,9	6,1	5500	**	**
3000	7,4	11,6	3000	0,0	0,0
5000	6,6	10,3	100	98,0	1,7
10000	7,3	11,4	Ausente	*	*
15000	5,4	8,4	100	100,0	2,2
9000	8,6	13,3	600	93,3	1,2
6000	9,6	15,0	3600	40,0	0,3
600	8,7	13,6	2500	**	**
1500	8,7	13,0	200	86,7	0,9

* - Remoção total ** - aumento na concentração de colifagos

O aumento na densidade desses microrganismos, após a aplicação do ozônio ocorreu em duas ocasiões, a primeira ocorreu quando empregada dose de 3,9 mg O₃/L por 6,1 minutos de tempo de contato e a segunda com aplicação de 8,7 mg O₃/L por 13,6 minutos de tempo de contato.

LEGNANI e col. (1996) registraram que a remoção de indicadores de vírus em amostras de esgotos desinfectados com ozônio de 36%, considerada abaixo das expectativas. Relataram ainda, que o processo de ozonização foi insuficiente no controle biológico de amostras de esgoto, especialmente no caso de vírus, onde amostras já ozonizadas exibiam concentrações de 1 a 480 UFP/100mL desses indicadores. No entanto, TANNER e col. (2003) verificaram queda de 2,5 logs na concentração de colifagos em esgotos tratados submetidos à desinfecção com ozônio.

7.4 Presença de *E. coli* potencialmente patogênica O157

Foram selecionadas 346 colônias típicas de *E. coli* a partir das amostras estudadas do esgoto bruto e tratado de Lins (SP). As colônias típicas provenientes do esgoto bruto totalizaram 149 a partir do meio MacConkey e 48 do meio MacConkey sorbitol. Confirmaram-se pertencentes à espécie *E. coli* 80 cepas do meio MacConkey e 4 cepas MacConkey sorbitol. Para o esgoto tratado foram selecionadas 104 e 45 colônias típicas do meio MacConkey e do meio MacConkey sorbitol, respectivamente. Confirmaram-se como *E.coli* 46 colônias do meio MacConkey e 18 colônias do meio MacConkey sorbitol. O quadro 12 exhibe os resultados obtidos nos ensaios de sorologia efetuados em cepas de *E. coli* positivas para O157 e que apresentaram reações cruzadas com outros sorotipos.

Quadro 12: Resultados das reações sorológicas cruzadas efetuadas em cepas de *E. coli* O157 isoladas do esgoto bruto e esgoto tratado Lins (SP).

	N° de cepas positivas O157	N° cepas com reação cruzada					
			Soros polivalentes				
			Class A	Class B	Class C	Invasora A	Invasora B
Esgoto Bruto	5	2	-	-	+	-	-
Esgoto tratado	6	1	-	+	-	-	+
		1	-	-	+	-	-

(+) Reação positiva Reação negativa (-)
O157 - Soro específico para *E. coli* O157.
Class A / Class B/ Class C - Enteropatogênica clássica A , B, C
Invasora A / Invasora B - Enteroinvasora A e Enteroinvasora B

Observou-se que dentre as cepas isoladas do esgoto bruto, 5 foram positivas para O157, dentre elas 2 apresentaram resultado sorológico positivo para enteropatogênica clássica (*pool* C). Os isolamentos a partir do esgoto tratado resultaram em 1 cepa positiva para enteropatogênica clássica (*pool* A) e 1 cepa positiva para enteropatogênica clássica (*pool* B e *pool* C) e 1 cepa positiva para enteropatogênica clássica (*pool* B). Ainda a partir de amostras do esgoto tratado, detectou-se 6 cepas positivas para O157, dentre elas verificou-se reação cruzada de 1 mesma cepa com positividade para enteropatogênica clássica (*pool* B) e enteroinvasora (*pool* B) e ainda, 1 cepa apresentou-se positiva à reação sorológica para enteropatogênica clássica (*pool* C).

As 11 cepas (5 cepas isoladas do esgoto bruto e 6 isoladas do esgoto tratado) positivas na reação sorológica específica para O157, embora a reação verificada tenha se apresentado fraca, foram submetidas a ensaio de PCR pelo método desenvolvido por MAURER e col. (1999) para verificação da existência da banda de peso molecular de 420 bp do *operon* bfp, específica para *E. coli* O157. O resultado obtido não revelou a presença dessa banda como mostra a

figura 18, apenas uma cepa apresentou banda com valor um pouco superior a 420 bp, peso molecular de ± 500 bp.

Legenda: M: DNA Marker 1Kb ladder

P: Padrão *E. coli* O157 correspondente a ATCC 43895

1C a 6C Cepas de *E. coli* isoladas a partir de amostras do esgoto tratado

7C a 11C Cepas de *E. coli* isoladas a partir de amostras do esgoto bruto

Figura 18: Imagem do gel de agarose obtido a partir de ensaio de PCR em cepas presuntivas de *E. coli* O157 isoladas de amostras do esgoto bruto e esgoto tratado, Lins (SP).

Mesmo com a obtenção de resultado negativo para confirmação de *E. coli* O157 mediante o método desenvolvido por MAURER e col. (1999), decidiu-se dar continuidade à pesquisa de reconhecimento desses isolamentos. Na sequência foi realizado o perfil molecular de acordo com KIMURA e col. 2000, modificado. A figura 16 ilustra os perfis moleculares obtidos.

Legenda: M: DNA Marker 1Kb ladder
P: Padrão *E. coli* O157 correspondente a ATCC 43895
B: Branco
1C a 6C Cepas de *E. coli* isoladas a partir de amostras do esgoto tratado
7C a 11C Cepas de *E. coli* isoladas a partir de amostras do esgoto bruto

Figura 19: Imagem do gel de agarose contendo perfis moleculares obtidos a partir do ensaio de RSS-PCR para cepas presuntivas de *E. coli* O157 oriundas de amostras esgoto bruto e esgoto tratado, Lins (SP).

As cepas isoladas não apresentaram perfil molecular compatível a *E. coli* O157, demonstrada por KIMURA e col. (2000), confirmando sua ausência nas amostras de esgoto bruto e tratado examinadas, embora tenham apresentado positividade à reação sorológica específica para O157 além de algumas características fenotípicas terem sido constatadas nesses isolamentos, tais como: MUG negativo e fermentação do sorbitol negativo.

O coeficiente de similaridade de Dice entre as cepas analisadas demonstrou que 3 cepas apresentam perfil molecular próximo ao da cepa padrão de *E. coli* O157, como mostra a figura 20. Dessas cepas, 2 foram isoladas do esgoto tratado e 1 do esgoto bruto.

Figura 20: Representação gráfica da matriz de similaridade de Dice de cepas de *E. coli*, oriundas do esgoto bruto e esgoto tratado, submetidas à técnica de RSS-PCR.

FENG (1995), NATARO e KAPER (1998), CHALMERS e col. (2000) e IRINO e col. (2002) constata-se que a frequência de isolamento de *E. coli* O157 é baixa em países do hemisfério sul, como o Brasil, sendo mais frequentes em países do hemisfério norte. No entanto, houve supostos isolamentos desse patógeno emergente em nosso país, a partir de amostras clínicas que

apresentavam características fenotípicas semelhantes ao sorotipo O157 e reação sorológica específica positiva.

IRINO e col. (2002) investigaram 3 cepas de *E. coli* suspeitas de serem sorotipo O157 isoladas na cidade de Campinas (SP). As características fenotípicas dessas cepas sugeriram que eram O157 STEC, porém não foi efetuada caracterização genotípica. Os autores consideraram como sendo a primeiras cepas desse sorotipo no Brasil, mas pontuaram que a frequência dessas bactéria é baixa em nosso país.

Em ensaios posteriores, BLANK e col. (2003) mediante caracterização molecular de cepas de *E. coli* suspeitas de pertencerem ao sorotipo O157 originárias de amostras clínicas provenientes de crianças com diarreia nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Norte, verificaram diferenças genotípicas e constataram que não eram *E. coli* O157.

Os resultados da presente investigação estão de acordo com os achados da literatura consultada, evidenciando que a frequência de isolamento desse sorotipo é baixa em nosso meio. A pesquisa de *E.coli* O157 em amostras ambientais é importante contribuição para obtenção de informações a respeito desse patógeno emergente. Outros estudos tendo como objeto *E. coli* O157 devem ser conduzidos em amostras ambientais para aquisição de informações sobre sua ecologia e circulação no meio ambiente.

7.5 Parâmetros físico-químicos: turbidez, pH e temperatura

O anexo 7 exhibe os valores de pH, temperatura e turbidez do esgoto tratado e submetido aos processos de cloração e ozonização.

Pode-se observar que não houve variações significativas entre as determinações desses parâmetros no esgoto tratado e esgoto desinfetado pelos dois processos estudados, durante o período de estudo.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não há dúvidas de que a escassez de água decorrente de demanda crescente deve ser equacionada e a busca de medidas de preservação de recursos hídricos é emergente. Nesse sentido, a utilização de águas residuárias para a irrigação agrícola visa atender esse modelo de economia e gestão sustentável de recursos hídricos, sendo que o reúso de esgotos sanitários tratados traz benefícios ambientais e econômicos e também reflexões a respeito da saúde de populações expostas a essas águas e consumidores de cultivos irrigados com tais recursos. Segundo HESPANHOL (2003), não há evidências de que a simples presença de organismos patogênicos em esgotos determine a transmissão de doenças, deve-se considerar a existência de barreiras protetoras conferindo diminuição do risco real de se contrai-las. Contudo a regulamentação de padrões relativos à qualidade microbiológica e parasitológica de águas de reúso na agricultura é importante para garantia e proteção da saúde pública, como as diretrizes recomendadas pela OMS (1989). De acordo com SHUVAL (1986) os valores-guia estabelecidos pela OMS (1989) foram fundamentados em termos de contagem de coliformes fecais e ovos de helmintos em países em vias de desenvolvimento, como é o caso do Brasil.

Nessa pesquisa, em decorrência dos resultados obtidos a qualidade microbiológica e parasitológica dos esgotos sanitários tratados pelo sistema de tratamento de esgotos da cidade de Lins (SP) não atendeu às proposições feitas pela OMS (1989) para irrigação irrestrita (categoria A) e restrita (categoria B); e manteve-se inferior aos níveis revistos e propostos por BLUMENTHAL e col. (2000) em relação à presença de ovos de helmintos e densidade de coliformes fecais referente à irrigação irrestrita.

Em vista do exposto, esses efluentes, mesmo tratados com sistemas de lagoas de estabilização não demonstram qualidade sanitária adequada para

utilização na irrigação agrícola nas condições citadas acima, particularmente, em relação à presença de ovos de helmintos, cuja ocorrência é o principal fator limitante do reúso de águas residuárias na agricultura.

Deve-se buscar formas de melhoria da qualidade dos esgotos resultantes desse sistema específico de tratamento por lagoas de estabilização como a implantação de lagoas de maturação, visando à eliminação de patógenos, particularmente de ovos de helmintos.

Em relação aos processos de desinfecção de esgotos tratados com hipoclorito de sódio e ozônio, empregados no presente estudo, não foi verificado melhoria efetiva da qualidade sanitária dessas águas. As poucas repetições de cada dosagem de ambos os desinfetantes e com diferentes tempo de contato entre o efluente e o desinfetante dificultaram uma avaliação aprofundada de sua eficiência na remoção de organismos indicadores de contaminação fecal. Evidenciou-se a necessidade da realização de mais ensaios de desinfecção que considere aspectos sobre o ponto mais adequado de aplicação desses agentes e definição prévia das condições que envolvam a dose e o tempo de contato e do número de repetições das condições definidas. No entanto os dados resultantes dessa investigação permitem delimitar faixas de dosagem e tempo de contato como ponto de partida para o desenvolvimento de novos ensaios de desinfecção nesses esgotos tratados pelo sistema de tratamento utilizado no município de Lins (SP).

Ressalta-se a necessidade da realização de mais pesquisas, de ordem prática, a respeito da qualidade microbiológica e parasitológica de esgotos com potencial de reúso na irrigação agrícola, visando fornecer subsídios às autoridades sanitárias para o desenvolvimento de uma regulamentação brasileira com base nas características ambientais, técnicas, culturais e sócio-

econômicas de nosso país para que se possa assegurar proteção de grupos envolvidos nas atividades de reúso de esgotos tratados na agricultura.

As informações geradas na presente pesquisa não só evidencia a qualidade sanitária dos efluentes resultantes do sistema de tratamento de Lins (SP), como também revela-se uma ferramenta importante na prevenção e promoção à saúde pública de populações envolvidas na prática de reúso de águas residuárias e consumidores de cultivos agrícolas irrigados com essas águas. Aponta também a necessidade de melhoria desses efluentes como medida fundamental à preservação de recursos hídricos, minimizando riscos associados à veiculação hídrica de doenças.

9 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos na presente pesquisa, pode-se concluir que:

- ✓ Os esgotos domésticos tratados pelo sistema de lagoas de estabilização utilizado no município de Lins (SP) apresentaram qualidade bacteriológica insatisfatória para irrigação irrestrita (categoria A) e irrigação restrita (categoria B) conforme valores guia estabelecidos pela OMS (1989). Em apenas 2 ocasiões estudadas (6,7%) de um total de 30 amostras verificou-se compatibilidade com os valores propostos pela OMS (1989).
- ✓ Ovos de *Ascaris* foram detectados em 80,8% (21/26) das amostras de esgoto tratado avaliadas, sendo que em 42,3% tais ovos apresentaram-se viáveis. Tais resultados indicam a não conformidade à qualidade sanitária recomendada pela OMS (1989) à irrigação irrestrita (categoria A) e restrita (categoria B).
- ✓ Não se detectou, em nenhuma das amostras examinadas, a ocorrência de ovos de *Trichuris* e ancilostomídeos, também estabelecidos como indicadores de qualidade sanitária pela OMS (1989).
- ✓ Verificou-se a presença de ovos de helmintos, os quais não são estabelecidos como indicadores de qualidade sanitária em águas de reúso para irrigação pela OMS (1989), tais como: *Taenia sp* (34,6%), *Hymenolepis sp* (26,9%), *Enterobius sp* (19,2%), *Strongyloides sp* (7,7%), *Fasciola sp* (3,8%) e *Schistosoma sp* (3,8%).
- ✓ A eliminação de bactérias indicadoras de contaminação fecal em amostras de esgoto doméstico tratado submetido ao processo de desinfecção com

hipoclorito de sódio, apresentou melhor desempenho nas dosagens nas faixas de 8,6 a 15 mg/L de desinfetante com tempo de contato superior a 15 minutos, alcançando qualidade bacteriológica compatível com os valores guia sugeridos pela OMS (1989) para irrigação agrícola da categoria A.

- ✓ Em relação aos ovos de helmintos não se observou vantagem na utilização do processo de desinfecção com hipoclorito de sódio na remoção desses organismos.
- ✓ A desinfecção do esgoto doméstico tratado utilizando-se ozônio, nas condições específicas em que foi realizada essa pesquisa, não apresentou índices satisfatórios quanto à remoção de bactérias indicadoras de contaminação fecal, sendo que em nenhum episódio estudado o esgoto tratado e desinfetado apresentou qualidade bacteriológica desejável, de acordo com as recomendações da OMS (1989) para irrigação irrestrita e restrita da categoria B.
- ✓ Não se observou vantagem na aplicação de ozônio na remoção de ovos de helmintos em amostras do esgoto tratado avaliadas.
- ✓ Não se verificou padrão sazonal na distribuição de coliformes totais e *E. coli* e ovos de helmintos durante o período de estudo.
- ✓ Nas amostras examinadas, tanto do esgoto bruto como do esgoto tratado, não se constatou a presença do patógeno emergente *E. coli* O157.
- ✓ O gênero *Salmonella* foi detectado em 36,4% (8/22) das amostras do esgoto tratado analisadas, não se verificando padrão sazonal, ao longo da pesquisa, do gênero *Salmonella*.

- ✓ A utilização dos desinfetantes hipoclorito de sódio e ozônio foi eficiente na eliminação do gênero *Salmonella* nas amostras de esgoto doméstico tratado examinadas.
- ✓ Não se constatou elevadas concentrações de colifagos nas amostras de esgoto doméstico após tratamento por lagoas de estabilização, apresentando média geométrica de $9,5 \times 10^2$ UFP/100 mL.
- ✓ A utilização de hipoclorito de sódio não se apresentou vantajosa na eliminação de colifagos nas amostras de esgoto tratado estudadas, demonstrando inativação na concentração desses organismos da ordem de 1 a 2 logs, independentemente das dosagens do desinfetante e tempos de contato empregados.
- ✓ O processo de ozonização do esgoto doméstico tratado, nas condições específicas em que se realizou essa pesquisa, não se mostrou satisfatório na remoção de colifagos, apresentando redução de 1 log na densidade desses organismos nas amostras analisadas.

10. RECOMENDAÇÕES

Levando-se em conta o potencial de utilização de águas servidas na irrigação agrícola, assim como em outras atividades, resultando em preservação ambiental e economia de água e tendo-se consciência de riscos à saúde pública, advindos da prática de reúso na transmissão de doenças de veiculação hídrica, recomenda-se:

- ✓ Estudos periódicos da ocorrência de patógenos emergentes como *Giardia* e *Cryptosporidium* em esgotos sanitários destinados à irrigação agrícola; visando a avaliação mais aprofundada do risco que esses recursos hídricos possam oferecer.
- ✓ Desenvolvimento de pesquisas visando a melhoria do tratamento de esgotos domésticos na estação de tratamento por lagoas de estabilização utilizada na cidade de Lins (SP), em especial se seu uso for concretizado para irrigação de cultivos agrícolas, visando a proteção à saúde pública;
- ✓ Realização de estudos epidemiológicos, de doenças diarreicas e helmintíases, de populações expostas e não expostas aos esgotos domésticos tratados na prática de reúso;
- ✓ Monitoramento da ocorrência de ovos de helmintos em solos de áreas onde há a utilização de águas residuárias na irrigação agrícola.
- ✓ Desenvolvimento de programas de orientação/conscientização junto a populações envolvidas na prática de reúso de águas servidas quanto a medidas de proteção à saúde;

- ✓ Incentivo ao controle periódico da qualidade sanitária de esgotos utilizados como recursos para irrigação agrícola no intuito de minimizar riscos de transmissão de doenças de veiculação hídrica a populações expostas a esses recursos hídricos;
- ✓ Dar continuidade a estudos relativos a ocorrência de *E. coli* O157 em amostras ambientais a fim de se obter informações a respeito desse patógeno emergente em nosso meio.
- ✓ Avaliar se as cepas de *E. coli* soropositivas para O157 isoladas são capazes de produzir Shiga-toxina.

11.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez HR. Estudio de caso en Mexico/ El uso de las aguas residuales del Area Metropolitana de la Ciudad de Mexico, en el riego agrícola del Valle del Mezquital - Memoria del taller regional para las Américas sobre aspectos de salud, agricultura y ambiente vinculados al uso de las aguas residuales In: **REPINDEX / REPIDISCA**, n. 53, Mar, 1995. OMS/OPAS/CEPIS

Amamhid O, Asmama S, Bouhoum K. The effect of wastewater reuse in irrigation on the contamination level of food crops by *Giardia* cysts and *Ascaris* eggs. **Int J of Food Microbiol** 1999; 49(1-2):19-26.

Amahmid O, Asmama S, Bouhoum K. Urban wastewater treatment in stabilization ponds: occurrence and removal of pathogens. **Urban Water** 2002; 4:255-262.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th ed.2000, APHA, AWWA, WEF, Washington.

Angelakis NA, Bontoux L. Wastewater reclamation and reuse in Eureau countries. **Water Policy**2001; 3: 47-59.

Araujo R. A. **Eficiência de algumas estações de tratamento de esgotos de Feira de Santana na remoção de carga orgânica, coliformes, helmintos e protozoários e situações de risco de usuários a jusante do lançamento.** São Paulo;2003. [Tese de doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Arridge H, Oragui JI, Pearson HW, Mara DD, Silva SA. *Vibrio cholerae* O1 and *Salmonellae* removal compared with the die-off of faecal indicator organisms in

waste stabilization ponds in northeast Brazil. **Wat Sci Tech** 1995; 31(12):249-256.

Asano T, Levine A.D. Wastewater reclamation, recycling and reuse: past, present and future. **Wat Sci Tech** 1998; 33(10-11):1-14.

Ayres RM, Stott R, Mara DD, Lee YL. Wastewater reuse in agriculture and the risk of intestinal nematode infection. **Parasitol Today** 1992; 8 (1):32-35.

Ayres RM, Mara DD. Analysis of wastewater for reuse in agriculture. **World Health Organization. Geneva**. 90 pags, 1996.

Bahri A. Agricultural reuse of wastewater and global water management. **Wat Sci Tech** 1999;40(4-5):339-346.

Barbagallo S, Cirelli, GL, Indelicato S. Wastewater reuse in Italy **Wat Sci Tech** 2001;43(10):43-50.

Bastos RKX, Mara DD. The bacterial quality of salad crops drip and furrow irrigated with waste stabilization pond effluent: an evaluation of the WHO guidelines. **Wat Sci Tech** 1995;31(12):425-430.

Blank TE, Lacher DW, Scaletsky ICA, Zhong H, Whittam TS, Donnenberg MS. Enteropathogenic *Escherichia coli* O157 strains from Brazil. **Emerg Infect Dis** 2003; 9(1):113-114.

Blumenthal UJ, Abisudjak B, Cifuentes E, Bennett S, Ruiz-Palacios G. Recent epidemiological studies to test microbiological quality guidelines for wastewater use in agriculture and aquaculture. **Public Health Rev** 1991/92; 19:237-242.

Blumenthal UJ, Mara DD, Ayres RM, Cifuentes E , Peasey A, Stott R, Lee DL, Ruiz-Palacios G. Evaluation of the WHO nematode egg guidelines for restricted and unrestricted irrigation. **Wat Sci Tech** 1996; 33(10-11):277-283.

Blumenthal UJ, Mara DD, Peasey A, Ruiz-Palcios G, Stott R. Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. **Bull World Health Organ** 2000; 78(9):1104-1116.

Blumenthal UJ, Cifuentes E , Bennett S, Quigley M, Ruiz-Palacios G. The risk of enteric infectious associated with wastewater reuse: the effect of season and degree of storage of wastewater. **Trans R Society Trop Med Hyg** 2001; 95: 131-137.

Borrego JJ, Moriñigo MA, Vicente A, Cornay R, Romero P. Coliphage as an indicator of faecal pollution in water: Its relationship with indicator and pathogenic microrganisms. **Wat Res** 1987; 21:1473-1480.

Botero L, Montiel M, Estrada P, Villalobos M, Herrera L. Microrganisms removal in wastewater stabilization ponds in Maracaibo, Venezuela. **Wat Sci Tech** 1997; 35(11-12):205-209.

Bouhoum K , Amahmid O. Health effect of wastewater reuse in agriculture. **Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg** 2000; 105:241-247.

Campos C., **Indicadores de contaminación fecal en la reutilización de agua residual regenerada en suelos**. Barcelona; 1999 [Tese de doutorado, Universidade de Barcelona].

Campos C, Guerrero A ,Cárdenas M. Removal of bacterial and viral indicator organisms in waste stabilization pond system in Chocontá, Cundinamarca (Colômbia). **Wat Sci Tech** 2002; 45(1):61-66.

Campos,LC ,Trabulsi,LR. *Escherichia*. In: Alterthum,F., Coordenador. **Microbiologia**. 3ª ed. São Paulo(SP): Atheneu; 1999. p.215-228.

Carneiro FF, Cifuentes E, Tellez-Rojo MM, Romieu I. The risk of *Ascaris lumbricoides* infection in children as an environmental health indicator to guide preventive in Caparaó and Alto Caparaó, Brazil. **Bull World Health Organ** 2002; 80(1)[on line].Disponível em [URL:http://www.who.org/](http://www.who.org/) [20/11/2002].

Castro de Esparza ML , Muñoz AF. Evaluación de riesgos para la salud por el uso de las aguas residuales en agricultura. CENTRO PANAMERICANO de INGENIERIA SANITARIA y CIENCIAS del AMBIENTE (CEPIS).Resumen ejecutivo, Vol. I, Lima (Peru),1990.

CDC - Centers for Disease Control. *Escherichia coli* serotype O157:H7: Novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants **Emerg Infec Dis** Vol.1, nº 2, April-June 1995.

Ceballos BSO, König A, Lomans B, Athayde AB , Pearson HW. Evaluation of a tropical single cell waste stabilization pond system for irrigation.**Wat Sci Tech** 1995; 31(12):267-273.

CETESB. **Guia e orientação e preservação de amostras de água**. São Paulo, 1986.

CETESB Norma Técnica– L5.550 – Helminthos e Protozoários Patogênicos – Contagem de ovos e cistos em amostras ambientais, São Paulo, 1989.

CETESB Norma Técnica – L5.225 – Determinação colifagos em amostras de água, São Paulo, 1990.

CETESB Norma Técnica – L5.218 – **Salmonella** – Isolamento e Identificação, São Paulo, 1993.

Chalmers RM, Aird H , Bolton FJ. Waterborne *Escherichia coli* O157. **J Appl Microbiol Symposium** 2000; 88:124S-132S.

Chapman PA, Ellin M, Aston R , Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **Int J of Food Microbiol** 2001, 68:11-20.

Cifuentes E, Blumenthal UJ, Ruis-Palacios G , Bennett S. Health impact evaluation of wastewater use in Mexico. **Public Health Rev.** 1991/92; 19:243-250.

Cifuentes E; Blumenthal M; Ruiz-Palacios, G; Bennet S , Peasey, A. Infecciones gastrointestinales asociadas al riego agrícola con aguas residuales, perspectivas de control. **Salud Publica de Mexico** 1993; 35:6-11.

Cifuentes E; Blumenthal UJ, Ruiz-Palacios G; Bennet S , Peasey A. Escenario epidemiológico del uso agrícola del agua residual: El Valle del Mezquital, Mexico. **Salud Publica de Mexico** 1994; 36:3-9.

Cooper RC. Public health concerns in wastewater reuse. **Wat Sci Tech** 1991; 24(9): 55-65.

Crook J , Surampalli RY. Water reclamation and reuse criteria in the U.S. **Wat Sci Tech** 1996; 33(10-11): 451-462.

Cutolo S.A. **Reúso de águas residuárias e a transmissão de helmintíases no município de São Paulo, Brasil.** São Paulo, 2002. [Tese de doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Daniel LA, Campos JR. Desinfecção de efluentes de sistemas de tratamento aeróbio e anaeróbio. Parâmetros cinéticos de desinfecção de coliformes com radiação ultravioleta. In: **Agua,vivenda y desarrollo do Congreso Nacional Agua,36/Agua vivenda y Desarrollo Internacional del Caribe,2.** Memorias. Cartagena de Indisa:Abodal/Adesapa/Aidis, 1993.

Devaux I, Gerbaud L, Planchon C, Bontoux J ,Glanddler Y. Infectiious risk associated with wastewater reuse: an epidemiological approach applied to the case of Clermont-Ferrend, France. **Wat Sci Tech.**,2001, 43(12): 53-60.

Emparanza-Knörr A , Torrella F. Microbiological performance and Salmonella dynamics in a wastewater depuration pond system of southeastern Spain. **Wat Sci Tech** 1995;31(12):239-248.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Control de aguas de riego destinadas a production hortofruticola, Chile. Technical report of Project TCP / CHI/2251ca/ FAO, Rome.69p.

Fane SA, Ashbolt NJ , White SB. Decentralised urban water reuse: The implications of system scale for cost and pathogen risk. **Wat Sci Tech** 2002; 46(6-7): 281-288.

Fasciolo GE, Meca MI, Gabriel E , Morabito J. Effects on crops of irrigation with treated municipal wastewater. **Wat Sci Tech** 2002; 45(1):133-138.

Feachem RG, Bradley DJ, Garelick H, Mara DD. Sanitation and disease:Health aspects of excreta and wastewater management. John Wiley, Chicester,1983.

Feng P. *Escherichia coli* serotype O157:H7:novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. **Emerg Infect Dis** 1995;1(2)[on line]. Disponível em [URL:http://www.cdc.org/ncidod/EID.htm](http://www.cdc.org/ncidod/EID.htm) [20/08/2002].

Friedler E. Water reuse – an integral part of water resources management:Israel as a case study. **Wat Policy** 2001; 3(1):29-39.

Fundação SEADE. Anuário estatístico do Estado de São Paulo:2000,São Paulo;2002.

Gantzer C, Gillerman L, Kuznetsov M, Oron G. Adsorption and survival of faecal coliforms, somatic coliphages and F-specific RNA phages in soil irrigated with wastewater. **Wat Sci Tech** 2001;43(12):117-124.

Gerba CP, Rose JB, Haas CN , Crabtree KD. Waterborne rotavirus: a risk assessment. **Wat Res.** 1996; 30(12): 2929-2940.

Habbari K, Tifnouti A, Bitton G , Mandil A. Geohelminthic infections associated with raw wastewater reuse for agricultural purposes in Beni-Mellal, Morocco. **Parasitol Internat** 2000a; 48:249-254.

Habbari K, Tifnouti A, Bitton G, Mandil A. Intestinal parasitosis and environmental pollution: 1343 pediatric cases in Beni-Mellal, Morocco. **Tunis Med** 2000b;78(2):109-124.

Hachich EM , Sato MIZ. Protozoários e vírus patogênicos em águas: riscos, regulamentações e métodos de detecção. **Rev.Bras Pesq Desenvol**, 2001, 3(2):95-106.

Hespanhol I. Guidelines and integrated measures for public health protection in agricultural reuse systems. **J Water SRT-Aqua** 1990; 39(4):237-249.

Hespanhol I , Prost AME. Who Guidelines and national standards for reuse and water quality. **Wat Res** 1994; 28(1): 119-124.

Hespanhol I. Potencial de reúso de água no Brasil.In: Mancuso PCS e Santos HF, editores. **Reúso de águas**. 1ª edição. São Paulo:Manole/USP, 2003.p.58.

IBGE. Censo demográfico: resultados Estado de São Paulo – Cidades (10º recenseamento Geral do Brasil). Disponível em [URL:http://www.ibge.gov.br/](http://www.ibge.gov.br/) [20/03/2002].

IAWPRC. Study group on health related water microbiology. Bacteriophages as model viruses in water quality control. **Wat Res** 1991;25:529-545.

Irino K, Vaz TMI, Kato MAMF, Naves ZVF, Lara RR, Marco MEC, Rocha MMM, Moreira TP, Gomes TAT ,Guth BEC. O157:H7 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo,Brazil. **Emerg Infect Dis** Letter 2002; 8 (5) [on line].Disponível em [URL:http://www.cdc.org/ncidat/EID.htm](http://www.cdc.org/ncidat/EID.htm) [10/05/2003].

Jiménez B; Chávez A; Maya C, Jardines, L. Removal of microorganisms in different stages of wastewater treatment for Mexico City. **Wat Sci Tech** 2001; 43 (10): 155-162.

Karch H, Bielaszewska M. Sorbitol-fermenting shiga-producing *Escherichia coli* O157:H₇ strain: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics and microbiological diagnosis. **J Clin Microbiol** 2001;39(6):2043-2049.

Keawvichit R, Wongworapat K, Putsyainant P, Silprasert A, Karnchanawong S. Parasitic and bacterial contamination in collards using effluent from treated domestic wastewater in Chiang Mai, Thailand. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 2001; 322(2):240-244.

Kimura R, Mandrell, RE, Galland JC, Hyatt D , Riley LW Restriction-site-specific PCR as a rapid test to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains in environmental samples. **App Environm Microbiol** 2000, 66(6):2513-2519.

König A, Ceballos BSO, dos Santos AV, Cavalcante RB, Andrade JLS, Tavares JL. Uso de esgoto tratado como fonte de água não convencional para irrigação de forrageiras. In: **Anais 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**; 1997 setembro; Foz do Iguaçu. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1997, v.033, p.2072-2078.

Kouraa A, Fethi F, Fahde A, Lahlou A, Ouazzani N. Reuse of urban wastewater treated by a combined stabilisation pond in Benslimane (Marocco). **Urban Water** 2002; 4:373-378.

Legnani PP, Leoni E, Baraldi M, Pinelli G, Bisbini P. Evaluation of disinfection treatment systems for municipal wastewater reclamation and reuse. **Zentralb Hyg Umweltmed** 1996; 198(6):552-66.

Léon GS , Cavallini JM. Tratamento e uso de águas residuárias, Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, Departamento de Engenharia Agrícola, 1999, Paraíba, Brasil.

Madera CA, Peña MR , Mara DD. Microbiological quality of waste stabilization pond effluent used for restricted irrigation in Valle del Cauca, Colombia. **Wat Sci Tech** 2002; 45(1):139-143.

Mancuso PCS. **O reúso da água sua possibilidade na Região Metropolitana de São Paulo**, 1992. [Tese de doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Mara DD, Silva SA. Removal of intestinal nematode eggs in tropical waste stabilization ponds. **J Trop Med Hyg** 1986, 89:71-74.

Marecos do Monte MH, Angelakis NA, Asano T. Necessity and basis for establishment of european guidelines for reclaimed wastewater in the mediterranean region. **Wat Sci Tech** 1996, 33 (10-11):303-316.

Marques RG, Vasconcelos SM, Santos PP , Serafim AB. Caracterização sorológica e perfil de susceptibilidade de *Salmonella* spp isoladas de águas de irrigação de hortaliças em municípios de Goiás. **Hig Alimentar** 2003, **Resumos**, 17 (104-105):108.

Mathew K; Ho GE; Anda, M. Reuse of wastewater in aboriginal communities in western Australia. **Schiftenr Ver Wasser Boden Lufthyg** 2000; 105:233-9.

Maule A. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soli, water and on surfaces. **J Appl Microbiol** 2000; 88 Suppl:71S-78S.

Maurer JJ, Schmidt D., Petrosko P, Sanchez S , Bolton L. Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. **Appl Environ Microbiol** 1999; 65(7):2954-60.

Melloul AA , Hassani L. *Salmonella* infection in children from wastewater-spreading zone of Marrakesh city (Marocco). **J Appl Microbiol** 1999;87:536-539.

Monreal J. Estudio de caso en Chile/Evolución de la morbilidad entérica en Chile, luego de la aplicación de medidas de restricción de cultivos en zonas regadas con aguas servidas – Memoria del taller regional para las Américas sobre aspectos de salud, agricultura y ambiente vinculados al uso de las aguas residuales In: **REPINDEX / REPIDISCA**, n. 53, Mar, 1995. OMS/OPAS/CEPIS

Moscoso J , León G. Uso de aguas residuales / Wastewater use In: **REPINDEX / REPIDISCA**, n. 53, Mar, 1995. OMS/OPAS/CEPIS.

Moscoso J. Estudio de caso/ Reúso de aguas residuales en Peru - Memoria del taller regional para las Américas sobre aspectos de salud, agricultura y ambiente vinculados al uso de las aguas residuales In: **REPINDEX / REPIDISCA**, n. 53, Mar, 1995. OMS/OPAS/CEPIS.

Mujeriego R. Técnicas de recuperación, distribución y reutilización de las aguas depuradas. 1997[on line]. Disponible em URL:<http://www.ictnet.es/conferencias/mujer.htm> [09/10/2001].

Müller EE, Ehlers MM , Grabow WOK. The occurrence of *E. coli* O157:H7 in south african water sources intended for direct and indirect human consumption. **Wat Res** 2001;35(13):3085-3088.

Nataro JP , Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev** Jan, 1998;11(1):142-201.

Nasser A, Adin A , Fattal B. Comparative survival of E.coli, F+ bacteriophages onto sand. **Wat Sci Tech** 1993;27(7-8):331-338.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Diretrizes sanitarias sobre el uso de aguas residuales en agricultura y acuicultura. Serie de informes técnicos 778, 1989, Ginebra, Suíça.

Oron G, Armon R, Mandelbaum R, Manor Y, Campos C, Gillerman L, Salgot M, Gerba C, Klein I , Enriquez C. Secondary wastewater disposal for crop irrigation with minimal risks. **Wat Sci Tech** 2001;43(10):139-146.

Ouazzani N, Bouhoum K, Mandi L, Bouarab L, Habbari KH, Rafiq F, Picot B, Bontoux J , Schwartzbrod J. Wastewater treatment by stabilization pond: Marrakesh experiment.. **Wat Sci Tech** 1995;31(12):75-80.

Paixão KV da, Delforge JL, Brandão CCS. Avaliação de um equipamento de geração de misturas oxidantes na inativação de patógenos, utilizando como indicadores coliformes e colifagos. In: **Anais do XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2002, Cancun, México; Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2002.

Palacios MP, Lupiola P, Tejedor MT, Del-Nero E, Pardo A , Pita L. Climatic effects on *Salmonella* survival in plant soil irrigated with artificially inoculated wastewater: preliminary results. **Wat Sci Tech** 2001;43(12):103-108.

Palmateer GA, Dutka BJ, Jansen EM, Meissner SM, Sakelaris MG. Coliphage and bacteriophage as indicators of recreational water quality. **Wat Res** 1991; 25(3):355-357.

Pessoa GVA, Silva EAM. Meios de Rugais e lisina-motilidade combinados em um só tubo para identificação presuntiva de enterobactérias. **Rev Adolfo Lutz** 1972;32:97-100.

Petterson SR, Ashbolt NJ. Viral risks associated with wastewater reuse: modelling virus persistence on wastewater irrigated salad crops. **Wat Sci Tech** 2001; 43(12):23-26.

Salgot M, Pascual A. Existing guidelines and regulations in Spain on wastewater recalculation and reuse. **Wat Sci Tech** 1996; 34(11):261-267.

Salgot M, Campos C, Galotré B, Tapias JC. Biological control tool for wastewater reclamation and reuse: A critical review. **Wat Sci Tech** 2001; 43(10):195-201.

Sears CL e Kaper JB. Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol Ver Mar** 1996:167-215.

Semenas L, Brugni N, Viozzi G, Kreiter A. Monitoreo de parásitos en efluentes domiciliarios. **Rev Saúde Pública** 1999; 33(4) [on line]. Disponível em URL: <http://fsp.rsp.br/> [05/06/2002].

Sheikh B, Cooper RC, Israel KE. Hygienic evaluation of reclaimed water used to irrigate food crops – a case study. **Wat Sci Tech** 1999; 40(4-5):261-267.

Shuval H, Adin A, Fattal B, Rawitz E , Perez Y. Integrated resource recovery wastewater irrigation in developing countries. **World Bank Technical Paper** nº 51, Washington, 324 págs, 1986.

Shuval HI. Effects of wastewater irrigation of pastures on the health of farm animals and humans. **Rev Sci Tech Off Int Epiz.** 1991; 10(3):847-866.

Shuval HI. Investigation of typhoid fever and cholera transmission by raw wastewater irrigation in Santiago, Chile. **Wat Sci Tech** 1993; 27(3/4):167-174.

Shuval HI, Lampert Y , Fattal B. Development of a risk assessment approach for evaluating wastewater reuse standards for agriculture. **Wat Sci Tech** 1997; 35(11/12):15-20.

Soumet C, Ermel G, Rose N, Drouin P, Salvat G e Colin P. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Samonella* sp., *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* from environmental swabs of poultry houses. **Letters Appl Microbiol** 1999; 28:113-117.

Strauss M. Health aspects of nightsoil and sludge in agriculture and aquacultura In: Part II Pathogen survival, 1986, **IRCWD Report** nº 4/85.

Strauss M. Human waste use: Health protection practices and scheme monitoring. **Wat Sci Tech** 1991; 24:67-79.

Tanner BD, Kawahara S, Gerba CP, Reynolds KA. Evaluating of eletrochemically generated ozone for the disinfection of water and wastewater. In: **Anais do Symposium on Health-Related Water Microbiology**, 2003,Cape Town, África do Sul; IWA-International Water Association, 2003.

The Engelberg Report: Health of wastewater and excreta use in agriculture and aquaculture. **The World Bank/ United Nations Development Programme (UNDP)/ World Health Organization (WHO)/ International Reference Centre for Waste Disposal (IRCWD)**. Engelberg, Switzerland, July 1-4, 1985.

Tree JA, Adams MR , Lees DN. Virus inactivation during disinfection of wastewater by chlorination and UV irradiation and the efficacy of F⁺ bacteriophage as a "viral indicator". **Wat Sci Tech** 1997; 35(11-12):227-232.

Toze S. Microbial pathogens in wastewater. **C SI RO Land and Water**. Literature Review for Urban Water Systems. Technical Report N° 1/97, June 1997.

U.S.Environmental Protection Agency & United States Agency for International Development. **Guidelines for Water Reuse**. Washington D.C. USA, 1992.

U.S.Environmental Protection Agency & United States Agency for International Development. **Alternative disinfectants and oxidants-Guidance Manual**. Washington D.C. USA, 1997.

Vaz da Costa-Vargas SM, Mara DD , Vargas-Lopez CE. Residual faecal contamination on effluent-irrigated lettuces. **Wat Sci Tech** 1991;24(9):89-94.

Vaz da Costa-Vargas SM, Bastos RKX , Mara DD. Bacteriological aspects of wastewater irrigation. **Research Monographs in Tropical Public Health Engineering**, Research monograph n° 8, Department of civil engineering, University of Leeds, 1996.

Vélez OR, Fascilolo GE , Bertranou AV. Domestic wastewater treatment in waste stabilization ponds for irrigation in Mendoza, Argentina: policies and challenges. **Wat Sci Tech** 2002; 45(1):127-132.

Von Sperling, M. **Princípios de tratamento biológico de águas residuárias – Lagoas de estabilização**, vol.3, 4ª ed. Belo Horizonte. DESA-UFMG, 1996.

Westcot DW. Quality control of wastewater for irrigated crop production (water report-10). **Food and Agricultura Organization of the United Nations**, Roma,1997.

Yanko WA. Ocurrence of pathogens in distribution and marketing municipal sludges. USEPA/600/1-87/014, 1988.

Xu,P ; Valette,F; Brissaud F; Fazio A , Lazarova V. Technical-economic modelling of integrated water management: wastewater reuse in a French island. **Wat Sci Tech** 2001;43(10):67-74.

ANEXOS

ANEXO 1

Densidade de coliformes totais e *E. coli* em amostras de esgoto doméstico bruto e tratado e submetido à desinfecção com hipoclorito de sódio e ozônio no período de agosto de 2001 a novembro de 2002, Lins (SP).

Data coleta	Esgoto Bruto		Esgoto tratado		Tipo de desinfecção							
					Hipoclorito de sódio				Ozônio			
	Colif.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL	Colif.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL	Dose mg/L	T.Contato min.	Col.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL	Dose mg/L	T.Contato min.	Col.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL
07/08/01	$2,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	3,0	5	$2,0 \times 10^5$	$5,9 \times 10^4$				
						10	$2,0 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$				
						15	$2,0 \times 10^5$	$5,9 \times 10^4$				
						20	$2,0 \times 10^5$	$2,9 \times 10^4$				
						25	$2,0 \times 10^5$	$3,6 \times 10^4$				
						30	$2,0 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$				
						35	$2,0 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$				
						40	$1,7 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$				
						45	$1,7 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$				
						50	$1,7 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$				
					5,0	5	$2,0 \times 10^5$	$5,6 \times 10^4$				
						10	$2,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$				
						15	$2,0 \times 10^5$	$3,4 \times 10^4$				
						20	$2,0 \times 10^5$	$5,6 \times 10^4$				
						25	$1,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$				
						30	$5,9 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$				
						35	$2,9 \times 10^4$	$3,1 \times 10^3$				
						40	$2,4 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$				
						45	$4,8 \times 10^4$	$4,2 \times 10^3$				
						50	$3,2 \times 10^4$	$3,1 \times 10^3$				
27/08/01	$57,6 \times 10^5$	$12,2 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	8,0	5	$2,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$				
						10	$2,4 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$				
						15	$2,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$				
						20	$2,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$				
						25	$2,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$				
						30	$2,4 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$				
						35	$2,4 \times 10^5$	$7,4 \times 10^4$				
						40	$2,4 \times 10^5$	$6,3 \times 10^4$				
					11,6	5	$2,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$				
						10	$2,4 \times 10^5$	$9,8 \times 10^4$				
						15	$2,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$				
						20	$2,4 \times 10^5$	$4,4 \times 10^4$				
						25	$2,4 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$				
						30	$2,4 \times 10^5$	$5,3 \times 10^4$				
						35	$2,4 \times 10^5$	$9,6 \times 10^4$				
						40	$2,4 \times 10^5$	$3,8 \times 10^4$				

Densidade de coliformes totais e *E. coli* em amostras de esgoto doméstico bruto e tratado e submetido à desinfecção com hipoclorito de sódio e ozônio no período de agosto de 2001 a novembro de 2002, Lins (SP).

Data coleta	Esgoto Bruto		Esgoto tratado		Tipo de desinfecção							
					Hipoclorito de sódio				Ozônio			
	Colif.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL	Colif.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL	Dose mg/L	T.Contato min.	Col.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL	Dose mg/L	T.Contato min.	Col.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL
11/09/01	$2,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	10,0	5	$2,3 \times 10^8$	$1,0 \times 10^5$				
						10	$1,5 \times 10^8$	$2,0 \times 10^5$				
						15	$2,8 \times 10^8$	< 1				
						20	$3,1 \times 10^8$	$9,6 \times 10^5$				
						25	$6,3 \times 10^5$	< 1				
						30	$2,4 \times 10^8$	< 1				
						35	$9,8 \times 10^5$	< 1				
						40	$1,5 \times 10^8$	< 1				
						45	$1,1 \times 10^8$	< 1				
						50	$9,8 \times 10^5$	< 1				
					15,0	5	$3,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$				
						10	$6,3 \times 10^4$	< 1				
						15	$6,2 \times 10^4$	< 1				
						20	$3,1 \times 10^4$	< 1				
						25	$2,0 \times 10^3$	< 1				
						30	$2,0 \times 10^3$	< 1				
						35	$3,0 \times 10^3$	< 1				
						40	$3,1 \times 10^4$	< 1				
						45	$4,0 \times 10^3$	< 1				
						50	$8,0 \times 10^3$	< 1				
02/10/01	$1,7 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^9$	$2,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	7,0	5	$1,3 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$				
						10	$7,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$				
						15	$8,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^2$				
						20	$3,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$				
					10,0	5	$4,2 \times 10^5$	$4,1 \times 10^4$				
						10	$9,7 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$				
						15	$3,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$				
						20	$2,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^5$				
06/11/01	$2,2 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	80×10^5	50×10^5	26,6	20	$5,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$				
20/11/01	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$6,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$								
03/12/01	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$3,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	15,0	5	< 1	< 1				
						10	< 1	< 1				
						15	< 1	< 1				
						20	< 1	< 1				
						25	< 1	< 1				
						35	< 1	< 1				

Densidade de coliformes totais e *E. coli* em amostras de esgoto doméstico bruto e tratado e submetido à desinfecção com hipoclorito de sódio e ozônio no período de agosto de 2001 a novembro de 2002, Lins (SP).

Data coleta	Esgoto Bruto		Esgoto tratado		Tipo de desinfecção							
					Hipoclorito de sódio				Ozônio			
	Colif.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL	Colif.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL	Dose mg/L	T.Contato min.	Col.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL	Dose mg/L	T.Contato min.	Col.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL
17/12/01	$5,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	15,2	10 20 30 40	30 < 1 $9,0 \times 10^2$ $7,0 \times 10^3$	< 1 < 1 $1,7 \times 10^2$ $7,0 \times 10^3$				
07/01/02	$1,7 \times 10^8$	$5,0 \times 10^7$	$2,3 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$	15,4	10 20 30 40	< 1 < 1 < 1 < 1	< 1 < 1 < 1 < 1				
14/01/02			$3,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$					5,5	9,5	$8,0 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$
21/01/02	$1,7 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	15,0	10 20 30	< 1 < 1 < 1	< 1 < 1 < 1				
					10,5	10	< 1	< 1				
05/02/02	$1,1 \times 10^8$	$3,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	< 1		10 20 30 40	$8,6 \times 10^4$ $1,1 \times 10^6$ < 1 < 1	< 1 < 1 < 1 < 1	1,85	2,85	$5,2 \times 10^4$	< 1
18/02/02	$9,0 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$2,3 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$	9,5	5 10 20 30	$2,2 \times 10^2$ $2,3 \times 10^3$ $3,3 \times 10^2$ 22	13 2×10^2 8 2	5,5 7,3	9,5 12,7	$3,0 \times 10^8$ $8,0 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$ $3,0 \times 10^5$
06/03/02	$6,8 \times 10^{12}$	$1,2 \times 10^{11}$	$2,2 \times 10^{10}$	< 1	2,1	12,5	$6,3 \times 10^7$	< 1	5,6	8,6	$2,1 \times 10^8$	< 1
18/03/02	> 2.419,2	$1,2 \times 10^{13}$	$1,9 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	8,0	10 20 30	$2,4 \times 10^{10}$ $6,1 \times 10^5$ $3,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^2$ $3,1 \times 10^2$ < 1				
02/04/02	$1,2 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$	$1,3 \times 10^5$	3,0	30	$1,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^5$				
17/04/02	$2,4 \times 10^9$	$1,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^{11}$	$8,3 \times 10^5$	1,8	5 10 15	$2,4 \times 10^{10}$ $1,4 \times 10^{10}$ $2,4 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^5$ $1,8 \times 10^4$ $3,8 \times 10^4$	3,9	6,1	$2,4 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^5$
08/05/02	$8,6 \times 10^{11}$	$6,8 \times 10^7$	$9,2 \times 10^6$	$4,9 \times 10^5$	5,0	15 30 45 60	$9,8 \times 10^5$ $1,5 \times 10^6$ $1,2 \times 10^6$ $8,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$ $1,6 \times 10^4$ $1,9 \times 10^4$ $1,7 \times 10^5$	7,4	11,6	$1,2 \times 10^8$	$1,4 \times 10^5$
20/05/02	$1,7 \times 10^8$	$4,1 \times 10^7$	$8,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	5,9	15 30 45 60	$2,4 \times 10^5$ $1,2 \times 10^4$ $1,2 \times 10^5$ $9,0 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$ $5,1 \times 10^3$ $1,7 \times 10^5$ $2,8 \times 10^5$	6,6	10,3	$1,2 \times 10^8$	$1,5 \times 10^5$

Densidade de coliformes totais e *E. coli* em amostras de esgoto doméstico bruto e tratado e submetido à desinfecção com hipoclorito de sódio e ozônio no período de agosto de 2001 a novembro de 2002, Lins (SP).

Data coleta	Esgoto Bruto		Esgoto tratado		Tipo de desinfecção							
					Hipoclorito de sódio				Ozônio			
	Colif.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL	Colif.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL	Dose mg/L	T.Contato min.	Col.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL	Dose mg/L	T.Contato min.	Col.totais NMP/100mL	<i>E. coli</i> NMP/100mL
03/06/02	1,1 x10 ¹¹	1,7 x10 ⁸	6,3 x10 ⁴	1,0 x10 ³	11,2	13	< 1	< 1	7	11,4	1,5 x10 ⁸	1,9 x10 ⁴
						26	< 1	< 1				
						39	< 1	< 1				
						52	< 1	< 1				
25/06/02	1,2 x10 ⁹	7,2 x10 ⁷	3,4 x10 ⁶	2,2 x10 ⁵	5,6	10	2,4 x10 ⁸	1,0 x10 ⁵	5,4	8,4	2,4 x10 ⁵	5,7 x10 ⁴
						20	2,2 x10 ⁸	1,4 x10 ⁵	13,4	20,9	1,9 x10 ⁶	6,2 x10 ³
						30		3,4 x10 ⁵				
						40	1,7 x10 ⁵	1,2 x10 ⁵				
11/07/02	9,2 x10 ⁷	7,2 x10 ⁶	6,8 x10 ⁷	1,4 x10 ⁶	9,7	10	1,0 x10 ⁸	3,4 x10 ⁵	8,6	13,3	1,2 x10 ⁸	1,5 x10 ⁵
						20	2,4 x10 ⁸	2,4 x10 ⁵				
						30	1,9 x10 ⁶	6,8 x10 ⁵				
						40	2,4 x10 ⁶	3,1 x10 ⁵				
24/07/02	7,7 x10 ¹²	7,3 x10 ¹¹	9,8 x10 ⁵	1,6 x10 ⁵	9,7	10	6,3 x10 ¹	< 1	6,5	10	2,4 x10 ⁸	7,7 x10 ⁴
						20	6,3 x10 ³	< 1	9,6	15	8,6 x10 ⁵	1,7 x10 ⁴
						30	< 1	< 1				
						40	< 1	< 1				
08/08/02	2,4 x10 ¹³	8,6 x10 ⁸	1,2 x10 ⁸	2,8 x10 ⁵	8,1	10	2,4 x10 ¹⁰	2,0 x10 ¹	9,2	14	1,1 x10 ⁹	5,1 x10 ⁷
						20	2,4 x10 ⁸	1,2 x10 ⁵				
						30	1,0 x10 ⁷	< 1				
						40	2,4 x10 ¹⁰	< 1				
19/08/02	9,2 x10 ⁹	5,1 x10 ⁷	3,6 x10 ⁷	2,3 x10 ⁵	8,6	10	1,2 x10 ⁶	6,3 x10 ¹	8,7	13,6	2,4 x10 ⁷	6,4 x10 ⁴
						20	8,1 x10 ⁶	9,7 x10 ¹				
						30	2,4 x10 ⁵	2,4 x10 ³				
						40	7,2 x10 ⁵	3,5 x10 ¹				
11/09/02	3,2 x10 ⁹	5,7 x10 ⁷	1,9 x10 ⁸	2,4 x10 ⁵	7,6	15	2,4x10 ⁸	3,4x10 ²	8,7	13	1,2 x10 ⁷	1,9 x10 ⁵
						22	2,4x10 ⁷	< 1				
						30	9,8x10 ⁷	3,2x10 ²				
25/09/02	8,6x10 ¹¹	1,2 x10 ⁸	3,9 x10 ⁶	2,4 x10 ⁵	5,6	20	2,6 x10 ⁴	6,6 x10 ¹			2,4 x10 ⁶	5,7 x10 ³
08/10/02	1,5x10 ⁸	4,1 x10 ⁷	7,2 x10 ⁶	8,6 x10 ⁴					7,3	11	3,2 x10 ⁷	7,2 x10 ⁴
22/10/02	1,0x10 ⁸	1,9 x10 ⁷	>2,4x10 ⁶	>2,4x10 ⁵					27	34	6,4x10 ⁵	2,4x10 ⁴
06/11/02	1,2 x10 ⁸	3,0 x10 ⁷	2,4 x10 ⁶	1,7 x10 ⁵	1,6	30	>2,4 x10 ⁶	1,5 x10 ⁵			>2,4 x10 ⁵	>2,4 x10 ⁴

ANEXO 2

Resultados das análises de presença e ausência de *Salmonella* no esgoto doméstico tratado por sistema de lagoa de estabilização e submetido à desinfecção por hipoclorito de sódio e ozônio no período de novembro de 2001 a setembro de 2002, Lins (SP).

Data da coleta	Esgoto tratado P/A	Tipo de Desinfecção					
		Hipoclorito de sódio			Ozônio		
		mg/L	Tempo contato (minutos)	<i>Salmonella</i> P/A	mg/L	Tempo contato (minutos)	<i>Salmonella</i> P/A
06/11/01	A	26,6	20	A	NR	NR	NR
20/11/01	P	NR	NR	NR	NR	NR	NR
03/12/01	A	15,0	35	A	NR	NR	NR
17/12/01	A	15,2	40	A	NR	NR	NR
07/01/02	P	15,4	40	A	NR	NR	NR
14/01/02	A	NR	NR	NR	5,5	9,5	A
21/01/02	P	15,0	30	A	NR	NR	NR
05/02/02	P	6,4	40	A	1,85	2,9	A
18/02/02	A	9,5	30	A	7,3	12,7	A
06/03/02	P	2,1	12,5	A	5,6	8,6	P
18/03/02	A	8,0	30	A	6,9	10,8	A
02/04/02	A	3,0	30	A	NR	NR	NR
17/04/02	P	1,8	15	P	3,9	6,1	A
08/05/02	A	5,0	30	A	7,4	11,6	A
20/05/02	A	5,9	30	A	6,6	10,3	A
30/06/02	P	11,2	26	A	5,6	8,6	A
25/06/02	A	5,6	30	A	5,4	8,4	A
11/07/02	A	9,7	30	A	8,6	13,3	A
24/07/02	A	9,7	30	A	9,6	15,0	A
08/08/02	A	8,1	30	A	9,2	14,0	A
19/08/02	P	8,6	30	A	8,7	13,6	A
11/09/02	A	7,6	30	A	8,7	13,0	A

P/A - Presença / Ausência

NR - Não Realizado

ANEXO 3

Densidade de colifagos em amostras de esgoto doméstico bruto e tratado por sistema de lagoa de estabilização e submetido à desinfecção por hipoclorito de sódio e ozônio no período de novembro de 2001 a setembro de 2002, Lins (SP).

Data da coleta	Esgoto		Tipo de Desinfecção					
	Bruto	Tratado	Hipoclorito de sódio			Ozônio		
	UFP/100mL	UFP/100mL	mg/L	Tempo contato	UFP/100mL	mg/L	Tempo contato	UFP/100mL
	x 10 ³	x 10 ³		min.	x 10 ³		min.	x 10 ³
06/11/01	865	12,7	26,6	20,0	5,0	NR	NR	NR
20/11/01	NR	8,0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
03/12/01	490	4,0	15,0	35,0	0,0	NR	NR	NR
17/12/01	645	20,0	15,2	40,0	2,0	NR	NR	NR
07/01/02	225	6,0	15,4	40,0	0,0	5,5	9,5	0,2
05/02/02	145	86,0	6,4	40,0	6,0	1,8	2,8	55,0
18/02/02	240	7,0	9,5	30,0	0,1	7,3	12,7	0,9
06/03/02	150	60,0	2,1	12,5	5,0	5,6	8,6	2,5
18/03/02	130	15,0	8,0	30,0	0,1	6,9	10,8	1,5
02/04/02	200	46,0	3,0	30,0	24,0	NR	NR	NR
17/04/02	425	5,0	1,8	15,0	5,0	3,9	6,1	5,5
08/05/02	75	3,0	5,0	30,0	4,0	7,4	11,6	3,0
20/05/02	250	5,0	5,9	30,0	0,8	6,6	10,3	0,1
30/06/02	130	13,0	11,2	26,0	0,2	7,3	11,4	Ausente
25/06/02	370	15,0	5,6	30,0	21,0	5,4	8,4	0,1
11/07/02	270	9,0	9,7	30,0	0,4	8,6	13,3	0,6
24/07/02	90	6,0	9,7	30,0	0,1	9,6	15,0	3,6
08/08/02	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
19/08/02	90	0,6	8,6	30,0	0,0	8,7	13,6	2,5
11/09/02	90	1,5	7,6	30,0	0,3	8,7	13,0	0,2

ANEXO 4

Ovos de helmintos encontrados no esgoto doméstico tratado por sistema de lagoas de estabilização no período de agosto de 2001 a setembro de 2002, Lins (SP).

Data da coleta	Ovos totais			Ovos viáveis*			Ovos de helmintos**
	(ovos/L)			(ovos/L)			
	<i>Ascaris</i>	<i>Trichuris</i>	<i>Ancylostoma</i>	<i>Ascaris</i>	<i>Trichuris</i>	<i>Ancylostoma</i>	
10/08/01	3	Ausente	Ausente	3	Ausente	Ausente	<i>Strongiloydes sp</i> <i>Taenia sp</i>
27/08/01	5	Ausente	Ausente	4	Ausente	Ausente	<i>Enterobius vermicularis</i>
04/09/01	2	Ausente	Ausente	2	Ausente	Ausente	
26/10/01	1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Hymenolepis diminuta</i>
06/11/01	26	Ausente	Ausente	22	Ausente	Ausente	<i>Enterobius vermicularis</i> <i>Hymenolepis diminuta</i> <i>Fasciola sp</i>
20/11/01	2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Hymenolepis diminuta</i>
03/12/01	2	Ausente	Ausente	2	Ausente	Ausente	
17/12/01	2	Ausente	Ausente	1	Ausente	Ausente	
07/01/02	2	Ausente	Ausente	1	Ausente	Ausente	
14/01/02	1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Taenia sp</i> <i>Hymenolepis sp</i>
21/01/02	8	Ausente	Ausente	3	Ausente	Ausente	<i>Enterobius sp</i> <i>Strongyloides sp</i> <i>Taenia sp</i>
05/02/02	8	Ausente	Ausente	5	Ausente	Ausente	<i>Enterobius sp</i> <i>Taenia sp</i>
18/02/02	11	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
06/03/02	15	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Taenia sp</i> ovo não identificado
18/03/02	4	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	ovo não identificado
02/04/02	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
17/04/02	22	Ausente	Ausente	4	Ausente	Ausente	<i>Taenia sp</i> <i>Enterobius sp</i> <i>Schistosoma sp</i>
08/05/02	11	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
20/05/02	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
03/06/02	8	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
25/06/02	9	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Hymenolepis sp</i>
11/07/02	13	Ausente	Ausente	8	Ausente	Ausente	<i>Taenia sp</i>
24/07/02	7	Ausente	Ausente	3	Ausente	Ausente	<i>Hymenoplepis sp</i> <i>Taenia sp</i>
08/08/02	2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Taenia sp</i>
19/08/02	12	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
11/09/02	15	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Hymenolepis sp</i> <i>Taenia sp</i>

* - indicadores de nemátodos intestinais recomendados pela OMS (1989) no controle sanitário de águas de reúso

** - Outros ovos de helmintos encontrados nas amostras analisadas.

ANEXO 5

Ovos de helmintos encontrados no esgoto doméstico tratado por sistema de lagoas de estabilização e submetido a desinfecção com hipoclorito de sódio no período de agosto de 2001 a setembro de 2002, Lins (SP).

Data da coleta	Dosagem	Tempo de contato	Ovos totais			Ovos viáveis*			Ovos de helmintos**
	(mg/L)	(minutos)	(ovos/L)			(ovos/L)			(ovos/L)
			<i>Ascaris</i>	<i>Trichuris</i>	<i>Ancylostoma</i>	<i>Ascaris</i>	<i>Trichuris</i>	<i>Ancylostoma</i>	
27/08/01	8,0	40	5	Ausente	Ausente	5	Ausente	Ausente	<i>Strongiloydes sp</i> <i>Enterobius sp</i>
	11,6	40	6	Ausente	Ausente	5	Ausente	Ausente	
02/10/01	7,0	5	2	Ausente	Ausente	2	Ausente	Ausente	<i>Taenia sp</i>
		10	4	Ausente	Ausente	2	Ausente	Ausente	
		20	3	Ausente	Ausente	3	Ausente	Ausente	
06/11/01	26,6	20	7	Ausente	Ausente	1	Ausente	Ausente	<i>Taenia sp</i>
03/12/01	15,0	35	7	Ausente	Ausente	6	Ausente	Ausente	<i>Hymenolepis diminuta</i>
17/12/01	15,2	40	2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
07/01/01	15,4	40	1	Ausente	Ausente	1	Ausente	Ausente	
21/01/02	15,0	30	12	Ausente	Ausente	9	Ausente	Ausente	<i>Strongyloides sp</i> <i>Taenia sp</i>
05/02/02	6,4	40	9	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Hymenolepis nana</i> <i>Taenia sp</i>
18/02/02	9,5	30	5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
06/03/02	2,1	30	8	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
18/03/02	8,0	30	5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
02/04/02	2,0	30	3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
17/04/02	1,8	15	37	Ausente	Ausente	3			<i>Taenia sp</i>
08/05/02	5,0	30	1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
20/05/02	5,9	30	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
03/06/02	11,2	26	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
25/06/02	5,6	30	3	Ausente	Ausente	2	Ausente	Ausente	<i>Taenia sp</i>
11/07/02	9,7	30	5	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Taenia sp</i> <i>Hymenoplepis sp</i>
24/07/02	9,7	30	1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Hymenoplepis sp</i>
08/08/02	8,1	30	1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
19/08/02	8,6	30	12	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Hymenolepis sp</i>
11/09/02	7,6	30	1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	

* - indicadores de nemátodos intestinais recomendados pela OMS (1989) no controle sanitário de águas de reúso

** - Outros ovos de helmintos encontrados nas amostras analisadas.

ANEXO 6

Ovos de helmintos encontrados no esgoto doméstico tratado por sistema de lagoas de estabilização e submetido a desinfecção com ozônio no período de novembro de 2001 a setembro de 2002, Lins (SP).

Data da coleta	Dosagem (mg/L)	Tempo de contato (minutos)	Ovos totais			Ovos viáveis*			Ovos de helmintos**
			ovos/L			(ovos/L)			(ovos/L)
			<i>Ascaris</i>	<i>Trichuris</i>	<i>Ancylostoma</i>	<i>Ascaris</i>	<i>Trichuris</i>	<i>Ancylostoma</i>	
06/11/01			27	Ausente	Ausente	10	Ausente	Ausente	<i>Taenia sp</i> <i>Hymenolepis nana</i> <i>Enterobius vermicularis</i>
14/01/01	5,5	9,5	2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Taenia sp</i>
21/01/02	5,7	9,5	2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Strongyloides sp</i> <i>Enterobius sp</i> <i>Taenia sp</i>
05/02/02	18,5	2,9	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
18/02/02	7,3	12,7	17	Ausente	Ausente	1	Ausente	Ausente	<i>Enterobius sp</i> <i>Taenia sp</i>
06/03/02	5,6	8,6	3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
18/03/02	6,9	10,8	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
17/04/02	3,9	6,1	16	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
08/05/02	7,4	11,6	4	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
20/05/02	6,6	10,3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
03/06/02	7,3	11,4	3	Ausente	Ausente	2			<i>Taenia sp</i>
25/06/02	5,4	8,4	16	Ausente	Ausente	6	Ausente	Ausente	<i>Hymenolepis sp</i> <i>Taenia sp</i>
11/07/02	8,6	13,3	3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Hymenolepis sp</i>
24/07/02	9,6	15,0	8	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Taenia sp</i>
08/08/02	9,2	14,0	10	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<i>Toxocara sp</i>
19/08/02	8,7	13,6	10	Ausente	Ausente	1	Ausente	Ausente	
11/09/02	8,7	13,0	10	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	

* - indicadores de nemátodos intestinais recomendados pela OMS (1989) no controle sanitário de águas de reúso

** - Outros ovos de helmintos encontrados nas amostras analisadas.

ANEXO 7

Valores de pH, temperatura e turbidez encontrados nas amostras de efluentes tratado (Saída da lagoa facultativa) e após desinfecção com hipoclorito de sódio e ozônio, no período de maio de 2001 a novembro de 2002, Lins (SP).

Data	Saída Lagoa Facultativa			Efluente após cloração			Efluente após ozonização		
	pH	Temperatura	Turbidez	pH	Temperatura	Turbidez	pH	Temperatura	Turbidez
		°C	UNT		°C	UNT		°C	UNT
06.11.01	6,0	27,0	30	8,0	29,0	57	8,0	26,0	36
20.11.01	6,0	27,0	45	8,0	28,0	40	*	*	42
03.12.01	6,0	26,5	30	7,0	26,0	32	*	*	25
17.12.01	7,0	28,0	70	7,0	28,0	50	*	*	*
07.01.02	7,0	28,0	45	7,0	27,0	40	*	*	42
14.01.02	*	*	*	*	*	*	*	*	*
21.01.02	*	*	*	*	*	*	*	*	*
04.02.02	*	*	*	*	*	*	*	*	*
19.02.02	*	*	*	*	*	*	*	*	*
06.03.02	7,0	29,0	30	7,0	28,0	40	*	*	*
18.03.02	7,0	31,0	30	7,0	30,0	25	7,0	29,0	32
02.04.02	7,0	30,0	70	7,0	30,0	50	*	*	*
17.04.02	7,0	27,0	40	7,0	29,0	42	7,0	28,0	35
08.05.02	7,0	27,0	60	7,0	28,0	40	*	*	55
20.05.02	7,0	27,0	35	7,0	27,0	45	*	*	60
03.06.02	7,0	23,5	40	7,0	24,0	35	7,0	23,0	35
25.06.02	7,0	23,0	35	7,0	24,0	70	7,0	22,0	65
11.07.02	7,0	23,0	42	7,0	24,0	45	7,0	22,0	40
24.07.02	7,0	23,0	35	7,0	24,0	42	7,0	23,0	40
08.08.02	7,0	23,0	42	7,0	23,5	40	7,0	23,0	35
19.08.02	7,0	23,0	50	7,0	24,0	45	7,0	22,0	40
11.09.02	7,0	27,0	35	7,0	26,0	35	7,0	26,0	30
25.09.02	7,0	27,0	55	7,0	25,0	60	7,0	24,0	50
08.10.02	8,0	32,0	30	7,0	30,0	35	7,0	29,0	30
21.10.02	7,0	29,0	42	*	*	*	7,0	29,0	45
06.11.02	7,0	30,0	40	7,0	29,0	42	7,0	29,0	42
Média	7,1	26,7	41,8	7,0	29,0	42,0	7,0	24,7	43,0

* - Determinação não realizada

Anexo 8 –

Tabela de resultados, em NMP/100mL, fornecida pelo fabricante para a obtenção dos resultados da densidade de coliformes totais e *E. coli*.

# Large Wells Positive	IDEXX Quanti-Tray/2000 MPN Table																								
	# Small Wells Positive																								
Positive	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	<1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.0	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.2	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.3	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.6	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.4	13.4	14.4	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1	28.2
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.3	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.2	26.3	27.4	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.8	11.6	12.7	13.8	14.9	15.9	17.0	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.4	8.5	9.6	10.7	11.8	12.8	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	33.9
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.5	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.3	15.5	16.6	17.7	18.9	20.0	21.1	22.3	23.4	24.6	25.7	26.9	28.0	29.2	30.3	31.5	32.7	33.8	35.0	36.2	37.4	38.6
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.7	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.4	40.7	41.9
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.6	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.1	42.4	43.6
14	18.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.4	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.9	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.6	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2
17	20.3	21.6	22.8	24.0	25.3	26.5	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.4	47.8	49.1	50.5	51.9	53.2
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	39.0	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.4	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.6	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.6
21	26.5	27.8	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.7	39.1	40.5	41.9	43.3	44.7	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.7	62.2
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.4	36.8	38.2	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.6	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.6	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	51.9	53.4	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.5	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	70.0
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.3	42.8	44.3	45.9	47.4	48.9	50.4	52.0	53.5	55.1	56.7	58.2	59.8	61.4	63.0	64.7	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9
27	37.4	38.9	40.4	41.9	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.8	54.4	56.0	57.6	59.2	60.8	62.4	64.1	65.7	67.4	69.1	70.8	72.5	74.2	75.9
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.2	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.1	61.8	63.5	65.2	66.9	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0
29	41.6	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	51.2	52.8	54.5	56.1	57.8	59.5	61.2	62.9	64.6	66.3	68.0	69.8	71.5	73.3	75.1	76.9	78.7	80.5	82.3
30	43.9	45.5	47.1	48.7	50.4	52.0	53.7	55.4	57.1	58.8	60.5	62.2	64.0	65.7	67.5	69.3	71.0	72.8	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0	85.9
31	46.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.6	56.3	58.1	59.8	61.8	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.1	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5	93.6
33	51.2	53.0	54.7	56.5	58.3	60.1	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.5	95.7	97.8
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	66.9	68.9	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.4	93.5	95.7	97.9	100.1	102.4
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.4	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.9	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.3	102.6	105.0	107.3
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	105.3	107.7	110.2	112.7
37	62.9	65.0	67.0	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6
38	66.3	68.4	70.6	72.7	74.9	77.1	79.4	81.6	83.9	86.2	88.6	91.0	93.4	95.8	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4	122.2	125.0
39	69.9	72.2	74.4	76.6	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.3	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.5	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2	132.2
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.7	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.2	127.3	130.5	133.7	137.0	140.3
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.6	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.3	138.8	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2	87.8	90.5	93.2	96.0	98.8	101.7	104.6	107.6	110.6	113.7	116.9	120.1	123.3	126.7	130.1	133.6	137.1	140.8	144.5	148.3</			

Large Wells
Positive

IDEXX Quanti-Tray/2000 MPN Table
Small Wells Positive

	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
0	25.3	26.3	27.4	28.4	29.5	30.5	31.5	32.6	33.6	34.7	35.7	36.8	37.8	38.9	39.9	41.0	42.1	43.1	44.2	45.3	46.3	47.4	48.5	49.5
1	26.6	27.6	28.7	29.7	30.8	31.9	32.9	34.0	35.0	36.1	37.2	38.2	39.3	40.4	41.4	42.5	43.6	44.7	45.7	46.8	47.9	49.0	50.1	51.2
2	27.9	29.0	30.0	31.1	32.2	33.2	34.3	35.4	36.5	37.5	38.6	39.7	40.8	41.9	42.9	44.0	45.1	46.2	47.3	48.4	49.5	50.6	51.7	52.8
3	29.3	30.3	31.4	32.5	33.6	34.7	35.7	36.8	37.9	39.0	40.1	41.2	42.3	43.4	44.5	45.6	46.7	47.8	48.9	50.0	51.2	52.3	53.4	54.5
4	30.7	31.7	32.8	33.9	35.0	36.1	37.2	38.3	39.4	40.5	41.6	42.8	43.9	45.0	46.1	47.2	48.3	49.5	50.6	51.7	52.9	54.0	55.1	56.3
5	32.1	33.2	34.3	35.4	36.5	37.6	38.7	39.8	41.0	42.1	43.2	44.3	45.5	46.6	47.7	48.9	50.0	51.2	52.3	53.5	54.6	55.8	56.9	58.1
6	33.5	34.6	35.8	36.9	38.0	39.1	40.3	41.4	42.6	43.7	44.8	46.0	47.1	48.3	49.4	50.6	51.7	52.9	54.1	55.2	56.4	57.6	58.7	59.9
7	35.0	36.2	37.3	38.4	39.6	40.7	41.9	43.0	44.2	45.3	46.5	47.7	48.8	50.0	51.2	52.3	53.5	54.7	55.9	57.1	58.2	59.4	60.6	61.8
8	36.5	37.7	38.9	40.0	41.2	42.3	43.5	44.7	45.9	47.0	48.2	49.4	50.6	51.8	53.0	54.1	55.3	56.5	57.7	58.9	60.2	61.4	62.6	63.8
9	38.1	39.3	40.5	41.6	42.8	44.0	45.2	46.4	47.6	48.8	50.0	51.2	52.4	53.6	54.8	56.0	57.2	58.4	59.7	60.9	62.1	63.4	64.6	65.8
10	39.7	40.9	42.1	43.3	44.5	45.7	46.9	48.1	49.3	50.6	51.8	53.0	54.2	55.5	56.7	57.9	59.2	60.4	61.6	62.9	64.2	65.4	66.7	67.9
11	41.4	42.6	43.8	45.0	46.3	47.5	48.7	49.9	51.2	52.4	53.6	54.9	56.1	57.4	58.6	59.9	61.2	62.4	63.7	65.0	66.2	67.5	68.8	70.1
12	43.1	44.3	45.6	46.8	48.1	49.3	50.5	51.8	53.1	54.3	55.6	56.8	58.1	59.4	60.7	61.9	63.2	64.5	65.8	67.1	68.4	69.7	71.0	72.3
13	44.9	46.1	47.4	48.6	49.9	51.2	52.4	53.7	55.0	56.3	57.6	58.9	60.2	61.5	62.8	64.1	65.4	66.7	68.0	69.3	70.7	72.0	73.3	74.7
14	46.7	48.0	49.3	50.5	51.8	53.1	54.4	55.7	57.0	58.3	59.6	60.9	62.3	63.6	64.9	66.3	67.6	68.9	70.3	71.6	73.0	74.4	75.7	77.1
15	48.6	49.9	51.2	52.5	53.8	55.1	56.4	57.8	59.1	60.4	61.8	63.1	64.5	65.8	67.2	68.5	69.9	71.3	72.6	74.0	75.4	76.8	78.2	79.6
16	50.5	51.8	53.2	54.5	55.8	57.2	58.5	59.9	61.2	62.6	64.0	65.3	66.7	68.1	69.5	70.9	72.3	73.7	75.1	76.5	77.9	79.3	80.8	82.2
17	52.5	53.9	55.2	56.6	58.0	59.3	60.7	62.1	63.5	64.9	66.3	67.7	69.1	70.5	71.9	73.3	74.8	76.2	77.6	79.1	80.5	82.0	83.5	84.9
18	54.6	56.0	57.4	58.8	60.2	61.6	63.0	64.4	65.8	67.2	68.6	70.1	71.5	73.0	74.4	75.9	77.3	78.8	80.3	81.8	83.3	84.8	86.3	87.8
19	56.8	58.2	59.6	61.0	62.4	63.9	65.3	66.7	68.2	69.7	71.1	72.6	74.1	75.5	77.0	78.5	80.0	81.5	83.1	84.6	86.1	87.6	89.2	90.7
20	59.0	60.4	61.9	63.3	64.8	66.3	67.7	69.2	70.7	72.2	73.7	75.2	76.7	78.2	79.8	81.3	82.8	84.4	85.9	87.5	89.1	90.6	92.2	93.8
21	61.3	62.8	64.3	65.8	67.3	68.8	70.3	71.8	73.3	74.9	76.4	77.9	79.5	81.0	82.6	84.2	85.8	87.4	89.0	90.6	92.2	93.8	95.4	97.1
22	63.7	65.3	66.8	68.3	69.8	71.4	72.9	74.5	76.1	77.6	79.2	80.8	82.4	84.0	85.6	87.2	88.9	90.5	92.1	93.8	95.5	97.1	98.8	100.5
23	66.3	67.8	69.4	71.0	72.5	74.1	75.7	77.3	78.9	80.5	82.1	83.8	85.4	87.1	88.7	90.4	92.1	93.8	95.5	97.2	98.9	100.6	102.3	104.1
24	68.9	70.5	72.1	73.7	75.3	77.0	78.6	80.2	81.9	83.6	85.2	86.9	88.6	90.3	92.0	93.8	95.5	97.2	99.0	100.7	102.5	104.3	106.1	107.9
25	71.7	73.3	75.0	76.6	78.3	80.0	81.6	83.3	85.0	86.8	88.5	90.2	92.0	93.7	95.5	97.3	99.1	100.9	102.7	104.5	106.3	108.2	110.0	111.9
26	74.6	76.3	78.0	79.7	81.4	83.1	84.8	86.6	88.4	90.1	91.9	93.7	95.5	97.3	99.2	101.0	102.9	104.7	106.6	108.5	110.4	112.3	114.2	116.2
27	77.6	79.4	81.1	82.9	84.6	86.4	88.2	90.0	91.9	93.7	95.5	97.4	99.3	101.2	103.1	105.0	106.9	108.8	110.8	112.7	114.7	116.7	118.7	120.7
28	80.8	82.6	84.4	86.2	88.1	89.9	91.8	93.7	95.6	97.5	99.4	101.3	103.3	105.2	107.2	109.2	111.2	113.2	115.2	117.3	119.3	121.4	123.5	125.6
29	84.2	86.1	87.9	89.8	91.7	93.6	95.6	97.5	99.5	101.5	103.5	105.5	107.5	109.5	111.6	113.7	115.7	117.8	120.0	122.1	124.2	126.4	128.6	130.8
30	87.8	89.7	91.7	93.6	95.6	97.6	99.6	101.6	103.7	105.7	107.8	109.9	112.0	114.1	116.3	118.5	120.6	122.8	125.1	127.3	129.5	131.8	134.1	136.4
31	91.6	93.6	95.6	97.7	99.7	101.8	103.9	106.0	108.2	110.3	112.5	114.7	116.9	119.1	121.4	123.6	125.9	128.2	130.5	132.9	135.3	137.7	140.1	142.5
32	95.7	97.7	99.8	102.0	104.2	106.3	108.5	110.7	113.0	115.2	117.5	119.8	122.1	124.5	126.8	129.2	131.6	134.0	136.5	139.0	141.5	144.0	146.6	149.1
33	100.0	102.2	104.4	106.6	108.9	111.2	113.5	115.8	118.2	120.5	122.9	125.3	127.8	130.3	132.8	135.3	137.8	140.4	143.0	145.6	148.3	150.9	153.6	156.4
34	104.7	107.0	109.3	111.7	114.0	116.4	118.9	121.3	123.8	126.3	128.8	131.4	134.0	136.6	139.2	141.9	144.6	147.3	150.1	152.9	155.7	158.6	161.5	164.4
35	109.7	112.2	114.6	117.1	119.6	122.1	124.7	127.3	129.9	132.6	135.3	138.0	140.8	143.6	146.4	149.2	152.1	155.0	158.0	161.0	164.0	167.1	170.2	173.3
36	115.2	117.8	120.4	123.0	125.7	128.4	131.1	133.9	136.7	139.5	142.4	145.3	148.3	151.3	154.3	157.3	160.4	163.6	166.8	170.0	173.3	176.6	179.9	183.3
37	121.3	124.0	126.8	129.6	132.4	135.3	138.2	141.2	144.2	147.2	150.3	153.5	156.8	159.9	163.1	166.4	169.8	173.2	176.7	180.2	183.7	187.3	191.0	194.7
38	127.9	130.8	133.8	136.8	139.9	143.0	146.1	149.3	152.6	155.9	159.2	162.6	166.1	169.6	173.2	176.8	180.4	184.2	188.0	191.8	195.7	199.6	203.7	207.7
39	135.3	138.5	141.7	145.0	148.3	151.7	155.1	158.6	162.1	165.7	169.4	173.1	176.9	180.7	184.7	188.6	192.7	196.8	201.0	205.3	209.6	214.0	218.5	223.0
40	143.7	147.1	150.6	154.2	157.8	161.5	165.3	169.1	173.0	177.0	181.1	185.2	189.4	193.7	198.1	202.5	207.0	211.7	216.4	221.1	226.0	231.0	236.0	241.1
41	153.2	157.0	160.9	164.8	168.9	173.0	177.2	181.4	185.8	190.3	194.8	199.5	204.2	209.1	214.0	219.0	224.2	229.4	234.8	240.2	245.8	251.5	257.2	263.1
42	164.3	168.6	172.9	177.3	181.9	186.5	191.3	196.1	201.1	206.2	211.4	216.7	222.1	227.7	233.4	239.2	245.2	251.3	257.5	263.8	270.3	276.9	283.6	290.5
43	177.5	182.3	187.3	192.4	197.6	202.9	208.4	214.0	219.8	225.8	231.8	238.1	244.5	251.0	257.7	264.6	271.7	278.9	286.3	293.8	301.5	309.4	317.4	325.6
44	193.6	199.3	205.0	211.0	217.2	223.5	230.0	236.7	243.6	250.7	258.1	265.6	273.3	281.2	289.4	297.8	306.3	315.1	324.1	333.3	342.8	352.4	362.3	372.4
45	214.1	220.9	227.9	235.1	242.7	250.4	258.4	266.7	275.3	284.1	293.2	302.6	312.3	322.3	332.5	343.0	353.8	364.9	376.2	387.9	399.8	412.0	424.5	437.4
46	241.5	250.0	258.9	268.2	277.8	287.7	298.1	308.8	319.9	331.4	343.3	355.5	368.1	381.1	394.5	408.3	422.5	437.0	452.0	467.4	483.3	499.5	516.3	533.5
47	280.9	292.4	304.4	316.9	330.0	343.6	357.8	372.5	387.7	403.4	419.8	436.6	454.1	472.1	490.7	509.9	529.8	550.4	571.7	593.8	616.7	640.5	665.3	691.0
48	344.1	360.9	378.4	396.8	416.0	436.0	456.9	478.6	501.2	524.7	549.2	574.8	601.5	629.4	658.6	689.3	721.5	755.5	791.5	829.7	870.4	913.9	960.6	1011.1
49	461.1	488.4	517.2	547.5	579.4	613.1	648.8	686.7	727.0	770.1	816.4	866.4	920.8	980.4	1046.24	1119.85	1203.31	1299.65	1413.60	1553.07	1732.67	1986.28	2419.17	>2419.2

# Large Wells Positive	IDEXX Quanti-Tray/2000 MPN Table																								
	# Small Wells Positive																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	<1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.0	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.2	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.3	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.6	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.4	13.4	14.4	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1	28.2
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.3	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.2	26.3	27.4	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.6	12.7	13.8	14.9	15.9	17.0	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.4	8.5	9.6	10.7	11.8	12.8	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	33.9
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.5	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.3	15.5	16.6	17.7	18.9	20.0	21.1	22.3	23.4	24.6	25.7	26.9	28.0	29.2	30.3	31.5	32.7	33.8	35.0	36.2	37.4	38.6
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.7	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.4	40.7	41.9
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.6	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.1	42.4	43.6
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.4	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.9	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.6	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2
17	20.3	21.6	22.8	24.0	25.3	26.5	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.4	47.8	49.1	50.5	51.9	53.2
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	39.0	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.4	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.6	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.6
21	26.5	27.8	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.7	39.1	40.5	41.9	43.3	44.7	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.7	62.2
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.4	36.8	38.2	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.6	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.6	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	51.9	53.4	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.5	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	70.0
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.3	42.8	44.3	45.9	47.4	48.9	50.4	52.0	53.5	55.1	56.7	58.2	59.8	61.4	63.0	64.7	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9
27	37.4	38.9	40.4	41.9	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.8	54.4	56.0	57.6	59.2	60.8	62.4	64.1	65.7	67.4	69.1	70.8	72.5	74.2	75.9
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.2	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.1	61.8	63.5	65.2	66.9	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0
29	41.6	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	51.2	52.8	54.5	56.1	57.8	59.5	61.2	62.9	64.6	66.3	68.0	69.8	71.5	73.3	75.1	76.9	78.7	80.5	82.3
30	43.9	45.5	47.1	48.7	50.4	52.0	53.7	55.4	57.1	58.8	60.5	62.2	64.0	65.7	67.5	69.3	71.0	72.8	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0	85.9
31	48.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.6	56.3	58.1	59.8	61.6	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.1	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5	93.6
33	51.2	53.0	54.7	56.5	58.3	60.1	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.5	95.7	97.8
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	66.9	68.9	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.4	93.5	95.7	97.9	100.1	102.4
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.4	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.9	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.3	102.6	105.0	107.3
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	105.3	107.7	110.2	112.7
37	62.9	65.0	67.0	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6
38	66.3	68.4	70.6	72.7	74.9	77.1	79.4	81.6	83.9	86.2	88.6	91.0	93.4	95.8	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4	122.2	125.0
39	69.9	72.2	74.4	76.6	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.3	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.5	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2	132.2
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.7	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.2	127.3	130.5	133.7	137.0	140.3
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.6	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.3	138.9	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2	87.8	90.5	93.2	96.0	98.8	101.7	104.6	107.6	110.6	113.7	116.9	120.1	123.3	126>									

# Large Wells Positive	IDEXX Quanti-Tray/2000 MPN Table																							
	# Small Wells Positive																							
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
0	25.3	26.3	27.4	28.4	29.5	30.5	31.5	32.6	33.6	34.7	35.7	36.8	37.8	38.9	39.9	41.0	42.1	43.1	44.2	45.3	46.3	47.4	48.5	49.5
1	26.6	27.6	28.7	29.7	30.8	31.9	32.9	34.0	35.0	36.1	37.2	38.2	39.3	40.4	41.4	42.5	43.6	44.7	45.7	46.8	47.9	49.0	50.1	51.2
2	27.9	29.0	30.0	31.1	32.2	33.2	34.3	35.4	36.5	37.5	38.6	39.7	40.8	41.9	42.9	44.0	45.1	46.2	47.3	48.4	49.5	50.6	51.7	52.8
3	29.3	30.3	31.4	32.5	33.6	34.7	35.7	36.8	37.9	39.0	40.1	41.2	42.3	43.4	44.5	45.6	46.7	47.8	48.9	50.0	51.2	52.3	53.4	54.5
4	30.7	31.7	32.8	33.9	35.0	36.1	37.2	38.3	39.4	40.5	41.6	42.8	43.9	45.0	46.1	47.2	48.3	49.5	50.6	51.7	52.9	54.0	55.1	56.3
5	32.1	33.2	34.3	35.4	36.5	37.6	38.7	39.8	41.0	42.1	43.2	44.3	45.5	46.6	47.7	48.9	50.0	51.2	52.3	53.5	54.6	55.8	56.9	58.1
6	33.5	34.6	35.8	36.9	38.0	39.1	40.3	41.4	42.6	43.7	44.8	46.0	47.1	48.3	49.4	50.6	51.7	52.9	54.1	55.2	56.4	57.6	58.7	59.9
7	35.0	36.2	37.3	38.4	39.6	40.7	41.9	43.0	44.2	45.3	46.5	47.7	48.8	50.0	51.2	52.3	53.5	54.7	55.9	57.1	58.2	59.4	60.6	61.8
8	36.5	37.7	38.9	40.0	41.2	42.3	43.5	44.7	45.9	47.0	48.2	49.4	50.6	51.8	53.0	54.1	55.3	56.5	57.7	58.9	60.2	61.4	62.6	63.8
9	38.1	39.3	40.5	41.6	42.8	44.0	45.2	46.4	47.6	48.8	50.0	51.2	52.4	53.6	54.8	56.0	57.2	58.4	59.7	60.9	62.1	63.4	64.6	65.8
10	39.7	40.9	42.1	43.3	44.5	45.7	46.9	48.1	49.3	50.6	51.8	53.0	54.2	55.5	56.7	57.9	59.2	60.4	61.6	62.9	64.2	65.4	66.7	67.9
11	41.4	42.6	43.8	45.0	46.3	47.5	48.7	49.9	51.2	52.4	53.6	54.9	56.1	57.4	58.6	59.9	61.2	62.4	63.7	65.0	66.2	67.5	68.8	70.1
12	43.1	44.3	45.6	46.8	48.1	49.3	50.5	51.8	53.1	54.3	55.6	56.8	58.1	59.4	60.7	61.9	63.2	64.5	65.8	67.1	68.4	69.7	71.0	72.3
13	44.9	46.1	47.4	48.6	49.9	51.2	52.4	53.7	55.0	56.3	57.6	58.9	60.2	61.5	62.8	64.1	65.4	66.7	68.0	69.3	70.7	72.0	73.3	74.7
14	46.7	48.0	49.3	50.5	51.8	53.1	54.4	55.7	57.0	58.3	59.6	60.9	62.3	63.6	64.9	66.3	67.6	68.9	70.3	71.6	73.0	74.4	75.7	77.1
15	48.6	49.9	51.2	52.5	53.8	55.1	56.4	57.8	59.1	60.4	61.8	63.1	64.5	65.8	67.2	68.5	69.9	71.3	72.6	74.0	75.4	76.8	78.2	79.6
16	50.5	51.8	53.2	54.5	55.8	57.2	58.5	59.9	61.2	62.6	64.0	65.3	66.7	68.1	69.5	70.9	72.3	73.7	75.1	76.5	77.9	79.3	80.8	82.2
17	52.5	53.9	55.2	56.6	58.0	59.3	60.7	62.1	63.5	64.9	66.3	67.7	69.1	70.5	71.9	73.3	74.8	76.2	77.6	79.1	80.5	82.0	83.5	84.9
18	54.6	56.0	57.4	58.8	60.2	61.6	63.0	64.4	65.8	67.2	68.6	70.1	71.5	73.0	74.4	75.9	77.3	78.8	80.3	81.8	83.3	84.8	86.3	87.8
19	56.8	58.2	59.6	61.0	62.4	63.9	65.3	66.7	68.2	69.7	71.1	72.6	74.1	75.5	77.0	78.5	80.0	81.5	83.1	84.6	86.1	87.6	89.2	90.7
20	59.0	60.4	61.9	63.3	64.8	66.3	67.7	69.2	70.7	72.2	73.7	75.2	76.7	78.2	79.8	81.3	82.8	84.4	85.9	87.5	89.1	90.6	92.2	93.8
21	61.3	62.8	64.3	65.8	67.3	68.8	70.3	71.8	73.3	74.9	76.4	77.9	79.5	81.0	82.6	84.2	85.8	87.4	89.0	90.6	92.2	93.8	95.4	97.1
22	63.7	65.3	66.8	68.3	69.8	71.4	72.9	74.5	76.1	77.6	79.2	80.8	82.4	84.0	85.6	87.2	88.9	90.5	92.1	93.8	95.5	97.1	98.8	100.5
23	66.3	67.8	69.4	71.0	72.5	74.1	75.7	77.3	78.9	80.5	82.1	83.8	85.4	87.1	88.7	90.4	92.1	93.8	95.5	97.2	98.9	100.6	102.3	104.1
24	68.9	70.5	72.1	73.7	75.3	77.0	78.6	80.2	81.9	83.6	85.2	86.9	88.6	90.3	92.0	93.8	95.5	97.2	99.0	100.7	102.5	104.3	106.1	107.9
25	71.7	73.3	75.0	76.6	78.3	80.0	81.6	83.3	85.0	86.8	88.5	90.2	92.0	93.7	95.5	97.3	99.1	100.9	102.7	104.5	106.3	108.2	110.0	111.9
26	74.6	76.3	78.0	79.7	81.4	83.1	84.8	86.6	88.4	90.1	91.9	93.7	95.5	97.3	99.2	101.0	102.9	104.7	106.6	108.5	110.4	112.3	114.2	116.2
27	77.6	79.4	81.1	82.9	84.6	86.4	88.2	90.0	91.9	93.7	95.5	97.4	99.3	101.2	103.1	105.0	106.9	108.8	110.8	112.7	114.7	116.7	118.7	120.7
28	80.8	82.6	84.4	86.2	88.1	89.9	91.8	93.7	95.6	97.5	99.4	101.3	103.3	105.2	107.2	109.2	111.2	113.2	115.2	117.3	119.3	121.4	123.5	125.6
29	84.2	86.1	87.9	89.8	91.7	93.6	95.6	97.5	99.5	101.5	103.5	105.5	107.5	109.5	111.6	113.7	115.7	117.8	120.0	122.1	124.2	126.4	128.6	130.8
30	87.8	89.7	91.7	93.6	95.6	97.6	99.6	101.6	103.7	105.7	107.8	109.9	112.0	114.1	116.3	118.5	120.6	122.8	125.1	127.3	129.5	131.8	134.1	136.4
31	91.6	93.6	95.6	97.7	99.7	101.8	103.9	106.0	108.2	110.3	112.5	114.7	116.9	119.1	121.4	123.6	125.9	128.2	130.5	132.9	135.3	137.7	140.1	142.5
32	95.7	97.7	99.9	102.0	104.2	106.3	108.5	110.7	113.0	115.2	117.5	119.8	122.1	124.5	126.8	129.2	131.6	134.0	136.5	139.0	141.5	144.0	146.6	149.1
33	100.0	102.2	104.4	106.6	108.9	111.2	113.5	115.8	118.2	120.5	122.9	125.3	127.8	130.3	132.8	135.3	137.8	140.4	143.0	145.6	148.3	150.9	153.6	156.4
34	104.7	107.0	109.3	111.7	114.0	116.4	118.9	121.3	123.8	126.3	128.8	131.4	134.0	136.6	139.2	141.9	144.6	147.3	150.1	152.9	155.7	158.6	161.5	164.4
35	109.7	112.2	114.6	117.1	119.6	122.1	124.7	127.3	129.9	132.6	135.3	138.0	140.8	143.6	146.4	149.2	152.1	155.0	158.0	161.0	164.0	167.1	170.2	173.3
36	115.2	117.8	120.4	123.0	125.7	128.4	131.1	133.9	136.7	139.5	142.4	145.3	148.3	151.3	154.3	157.3	160.4	163.6	166.8	170.0	173.3	176.6	179.9	183.3
37	121.3	124.0	126.8	129.6	132.4	135.3	138.2	141.2	144.2	147.2	150.3	153.5	156.8	159.9	163.1	166.4	169.8	173.2	176.7	180.2	183.7	187.3	191.0	194.7
38	127.9	130.8	133.8	136.8	139.9	143.0	146.1	149.3	152.6	155.9	159.2	162.6	166.1	169.6	173.2	176.8	180.4	184.2	188.0	191.8	195.7	199.6	203.7	207.7
39	135.3	138.5	141.7	145.0	148.3	151.7	155.1	158.6	162.1	165.7	169.4	173.1	176.9	180.7	184.7	188.6	192.7	196.8	201.0	205.3	209.6	214.0	218.5	223.0
40	143.7	147.1	150.6	154.2	157.8	161.5	165.3	169.1	173.0	177.0	181.1	185.2	189.4	193.7	198.1	202.5	207.0	211.7	216.4	221.1	226.0	231.0	236.0	241.1
41	153.2	157.0	160.9	164.8	168.9	173.0	177.2	181.4	185.8	190.3	194.8	199.5	204.2	209.1	214.0	219.0	224.2	229.4	234.8	240.2	245.8	251.5	257.2	263.1
42	164.3	168.6	172.9	177.3																				

# Large Wells Positive	IDEXX Quanti-Tray/2000 MPN Table																								
	# Small Wells Positive																								
Positive	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	<1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.0	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.2	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.3	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.6	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.4	13.4	14.4	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1	28.2
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.3	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.2	26.3	27.4	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.6	12.7	13.8	14.9	15.9	17.0	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.4	8.5	9.6	10.7	11.8	12.8	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	33.9
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.5	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.3	15.5	16.6	17.7	18.9	20.0	21.1	22.3	23.4	24.6	25.7	26.9	28.0	29.2	30.3	31.5	32.7	33.8	35.0	36.2	37.4	38.6
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.7	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.4	40.7	41.9
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.6	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.1	42.4	43.6
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.4	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.9	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.6	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2
17	20.3	21.6	22.8	24.0	25.3	26.5	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.4	47.8	49.1	50.5	51.9	53.2
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	39.0	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.4	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.6	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.6
21	26.5	27.8	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.7	39.1	40.5	41.9	43.3	44.7	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.7	62.2
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.4	36.8	38.2	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.6	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.6	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	51.9	53.4	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.5	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	70.0
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.3	42.8	44.3	45.9	47.4	48.9	50.4	52.0	53.5	55.1	56.7	58.2	59.8	61.4	63.0	64.7	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9
27	37.4	38.9	40.4	41.9	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.8	54.4	56.0	57.6	59.2	60.8	62.4	64.1	65.7	67.4	69.1	70.8	72.5	74.2	75.9
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.2	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.1	61.8	63.5	65.2	66.9	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0
29	41.6	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	51.2	52.8	54.5	56.1	57.8	59.5	61.2	62.9	64.6	66.3	68.0	69.8	71.5	73.3	75.1	76.9	78.7	80.5	82.3
30	43.9	45.5	47.1	48.7	50.4	52.0	53.7	55.4	57.1	58.8	60.5	62.2	64.0	65.7	67.5	69.3	71.0	72.8	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0	85.9
31	46.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.6	56.3	58.1	59.8	61.6	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.1	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5	93.6
33	51.2	53.0	54.7	56.5	58.3	60.1	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.5	95.7	97.8
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	66.9	68.9	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.4	93.5	95.7	97.9	100.1	102.4
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.4	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.9	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.3	102.6	105.0	107.3
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	105.3	107.7	110.2	112.7
37	62.9	65.0	67.0	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6
38	66.3	68.4	70.6	72.7	74.9	77.1	79.4	81.6	83.9	86.2	88.6	91.0	93.4	95.8	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4	122.2	125.0
39	69.9	72.2	74.4	76.6	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.3	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.5	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2	132.2
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.7	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.2	127.3	130.5	133.7	137.0	140.3
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.6	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.3	138.8	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2	87.8	90.5	93.2	96.0	98.8	101.7	104.6	107.6	110.6	113.7	116.9	120.1	123.3	12									

IDEXX Quanti-Tray/2000 MPN Table
Small Wells Positive

# Large Wells Positive	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
0	25.3	26.3	27.4	28.4	29.5	30.5	31.5	32.6	33.6	34.7	35.7	36.8	37.8	38.9	39.9	41.0	42.1	43.1	44.2	45.3	46.3	47.4	48.5	49.5
1	26.6	27.6	28.7	29.7	30.8	31.9	32.9	34.0	35.0	36.1	37.2	38.2	39.3	40.4	41.4	42.5	43.6	44.7	45.7	46.8	47.9	49.0	50.1	51.2
2	27.9	29.0	30.0	31.1	32.2	33.2	34.3	35.4	36.5	37.5	38.6	39.7	40.8	41.9	42.9	44.0	45.1	46.2	47.3	48.4	49.5	50.6	51.7	52.8
3	29.3	30.3	31.4	32.5	33.6	34.7	35.7	36.8	37.9	39.0	40.1	41.2	42.3	43.4	44.5	45.6	46.7	47.8	48.9	50.0	51.2	52.3	53.4	54.5
4	30.7	31.7	32.8	33.9	35.0	36.1	37.2	38.3	39.4	40.5	41.6	42.8	43.9	45.0	46.1	47.2	48.3	49.5	50.6	51.7	52.9	54.0	55.1	56.3
5	32.1	33.2	34.3	35.4	36.5	37.6	38.7	39.8	41.0	42.1	43.2	44.3	45.5	46.6	47.7	48.9	50.0	51.2	52.3	53.5	54.6	55.8	56.9	58.1
6	33.5	34.6	35.8	36.9	38.0	39.1	40.3	41.4	42.6	43.7	44.8	46.0	47.1	48.3	49.4	50.6	51.7	52.9	54.1	55.2	56.4	57.6	58.7	59.9
7	35.0	36.2	37.3	38.4	39.6	40.7	41.9	43.0	44.2	45.3	46.5	47.7	48.8	50.0	51.2	52.3	53.5	54.7	55.9	57.1	58.2	59.4	60.6	61.8
8	36.5	37.7	38.9	40.0	41.2	42.3	43.5	44.7	45.9	47.0	48.2	49.4	50.6	51.8	53.0	54.1	55.3	56.5	57.7	58.9	60.2	61.4	62.6	63.8
9	38.1	39.3	40.5	41.6	42.8	44.0	45.2	46.4	47.6	48.8	50.0	51.2	52.4	53.6	54.8	56.0	57.2	58.4	59.7	60.9	62.1	63.4	64.6	65.8
10	39.7	40.9	42.1	43.3	44.5	45.7	46.9	48.1	49.3	50.6	51.8	53.0	54.2	55.5	56.7	57.9	59.2	60.4	61.6	62.9	64.2	65.4	66.7	67.9
11	41.4	42.6	43.8	45.0	46.3	47.5	48.7	49.9	51.2	52.4	53.6	54.9	56.1	57.4	58.6	59.9	61.2	62.4	63.7	65.0	66.2	67.5	68.8	70.1
12	43.1	44.3	45.6	46.8	48.1	49.3	50.5	51.8	53.1	54.3	55.6	56.8	58.1	59.4	60.7	61.9	63.2	64.5	65.8	67.1	68.4	69.7	71.0	72.3
13	44.9	46.1	47.4	48.6	49.9	51.2	52.4	53.7	55.0	56.3	57.6	58.9	60.2	61.5	62.8	64.1	65.4	66.7	68.0	69.3	70.7	72.0	73.3	74.7
14	46.7	48.0	49.3	50.5	51.8	53.1	54.4	55.7	57.0	58.3	59.6	60.9	62.3	63.6	64.9	66.3	67.6	68.9	70.3	71.6	73.0	74.4	75.7	77.1
15	48.6	49.9	51.2	52.5	53.8	55.1	56.4	57.8	59.1	60.4	61.8	63.1	64.5	65.8	67.2	68.5	69.9	71.3	72.6	74.0	75.4	76.8	78.2	79.6
16	50.5	51.8	53.2	54.5	55.8	57.2	58.5	59.9	61.2	62.6	64.0	65.3	66.7	68.1	69.5	70.9	72.3	73.7	75.1	76.5	77.9	79.3	80.8	82.2
17	52.5	53.9	55.2	56.6	58.0	59.3	60.7	62.1	63.5	64.9	66.3	67.7	69.1	70.5	71.9	73.3	74.8	76.2	77.6	79.1	80.5	82.0	83.5	84.9
18	54.6	56.0	57.4	58.8	60.2	61.6	63.0	64.4	65.8	67.2	68.6	70.1	71.5	73.0	74.4	75.9	77.3	78.8	80.3	81.8	83.3	84.8	86.3	87.8
19	56.8	58.2	59.6	61.0	62.4	63.9	65.3	66.7	68.2	69.7	71.1	72.6	74.1	75.5	77.0	78.5	80.0	81.5	83.1	84.6	86.1	87.6	89.2	90.7
20	59.0	60.4	61.9	63.3	64.8	66.3	67.7	69.2	70.7	72.2	73.7	75.2	76.7	78.2	79.8	81.3	82.8	84.4	85.9	87.5	89.1	90.6	92.2	93.8
21	61.3	62.8	64.3	65.8	67.3	68.8	70.3	71.8	73.3	74.9	76.4	77.9	79.5	81.0	82.6	84.2	85.8	87.4	89.0	90.6	92.2	93.8	95.4	97.1
22	63.7	65.3	66.8	68.3	69.8	71.4	72.9	74.5	76.1	77.6	79.2	80.8	82.4	84.0	85.6	87.2	88.9	90.5	92.1	93.8	95.5	97.1	98.8	100.5
23	66.3	67.8	69.4	71.0	72.5	74.1	75.7	77.3	78.9	80.5	82.1	83.8	85.4	87.1	88.7	90.4	92.1	93.8	95.5	97.2	98.9	100.6	102.3	104.1
24	68.9	70.5	72.1	73.7	75.3	77.0	78.6	80.2	81.9	83.6	85.2	86.9	88.6	90.3	92.0	93.8	95.5	97.2	99.0	100.7	102.5	104.3	106.1	107.9
25	71.7	73.3	75.0	76.6	78.3	80.0	81.6	83.3	85.0	86.8	88.5	90.2	92.0	93.7	95.5	97.3	99.1	100.9	102.7	104.5	106.3	108.2	110.0	111.9
26	74.6	76.3	78.0	79.7	81.4	83.1	84.8	86.6	88.4	90.1	91.9	93.7	95.5	97.3	99.2	101.0	102.9	104.7	106.6	108.5	110.4	112.3	114.2	116.2
27	77.6	79.4	81.1	82.9	84.6	86.4	88.2	90.0	91.9	93.7	95.5	97.4	99.3	101.2	103.1	105.0	106.9	108.8	110.8	112.7	114.7	116.7	118.7	120.7
28	80.8	82.6	84.4	86.2	88.1	89.9	91.8	93.7	95.6	97.5	99.4	101.3	103.3	105.2	107.2	109.2	111.2	113.2	115.2	117.3	119.3	121.4	123.5	125.6
29	84.2	86.1	87.9	89.8	91.7	93.6	95.6	97.5	99.5	101.5	103.5	105.5	107.5	109.5	111.8	113.7	115.7	117.8	120.0	122.1	124.2	126.4	128.6	130.8
30	87.8	89.7	91.7	93.6	95.6	97.6	99.6	101.6	103.7	105.7	107.8	109.9	112.0	114.1	116.3	118.5	120.6	122.8	125.1	127.3	129.5	131.8	134.1	136.4
31	91.6	93.6	95.6	97.7	99.7	101.8	103.9	106.0	108.2	110.3	112.5	114.7	116.9	119.1	121.4	123.6	125.9	128.2	130.5	132.9	135.3	137.7	140.1	142.5
32	95.7	97.7	99.9	102.0	104.2	106.3	108.5	110.7	113.0	115.2	117.5	119.8	122.1	124.5	126.8	129.2	131.6	134.0	136.5	139.0	141.5	144.0	146.6	149.1
33	100.0	102.2	104.4	106.6	108.9	111.2	113.5	115.8	118.2	120.5	122.9	125.3	127.8	130.3	132.8	135.3	137.8	140.4	143.0	145.6	148.3	150.9	153.6	156.4
34	104.7	107.0	109.3	111.7	114.0	116.4	118.9	121.3	123.8	126.3	128.8	131.4	134.0	136.6	139.2	141.9	144.6	147.3	150.1	152.9	155.7	158.6	161.5	164.4
35	109.7	112.2	114.6	117.1	119.6	122.1	124.7	127.3	129.9	132.6	135.3	138.0	140.8	143.6	146.4	149.2	152.1	155.0	158.0	161.0	164.0	167.1	170.2	173.3
36	115.2	117.8	120.4	123.0	125.7	128.4	131.1	133.9	136.7	139.5	142.4	145.3	148.3	151.3	154.3	157.3	160.4	163.5	166.6	170.0	173.3	176.6	179.9	183.3
37	121.3	124.0	126.8	129.6	132.4	135.3	138.2	141.2	144.2	147.2	150.3	153.5	156.6	159.9	163.1	166.4	169.8	173.2	176.7	180.2	183.7	187.3	191.0	194.7
38	127.9	130.8	133.8	136.8	139.9	143.0	146.1	149.3	152.6	155.9	159.2	162.6	166.1	169.6	173.2	176.8	180.4	184.2	188.0	191.8	195.7	199.8	203.7	207.7
39	135.3	138.5	141.7	145.0	148.3	151.7	155.1	158.8	162.1	165.7	169.4	173.1	176.9	180.7	184.7	188.6	192.7	196.8	201.0	205.3	209.6	214.0	218.5	223.0
40	143.7	147.1	150.6	154.2	157.8	161.5	165.3	169.1	173.0	177.0	181.1	185.2	189.4	193.7	198.1	202.5	207.0	211.7	216.4	221.3	226.0	231.0	236.0	241.1
41	153.2	157.0	160.9	164.8	168.9	173.0	177.2	181.4	185.8	190.3	194.8	199.5	204.2	209.1	214.0	219.0	224.2	229.4	234.8	240.2	245.8	251.5	257.2	263.1
42	164.3	168.6	172.9	177.3	181.9	186.5	191.3	196.1	201.1	206.2	211.4	216.7	222.1	227.7	233.4	239.2	245.2	251.3	257.5	263.8	270.3	276.9	283.6	290.5
43	177.5	182.3	187.3	192.4	197.6	202.9	208.4	214.0	219.8	225.8	231.8	238.1	244.5	251.0	257.7	264.6	271.7	278.9	286.3	293.8	301.5	309.4	317.4	325.6
44	193.6	199.3	205.0	211.0	217.2	223.5	230.0	236.7	243.6	250.7	258.1	265.6	273.3	281.2	289.4	297.8	306.3	315.1	324.1	333.3	342.8	352.4	362.3	372.4
45	214.1	220.9	227.9	235.1	242.7	250.4	258.4	266.7	275.3	284.1	293.2	302.6	312.3	322.3	332.5	343.0	353.8	364.9	376.2	387.9	399.8	412.0	424.5	437.4
46	241.5	250.0	258.9	268.2	277.8	287.7	298.1	308.8	319.9	331.4	343.3	355.5	368.1	381.1	394.5	408.3	422.5	437.0	452.0	467.4	483.3	499.5	516.3	533.5
47	280.9	292.4	304.4	316.9	330.0	343.6	357.8	372.5	387.7	403.4	419.8	436.6	454.1	472.1	490.7	509.9	529.8	550.4	571.7	593.8	616.7	640.5	665.3	691.0
48	344.1	360.9	378.4	396.8	416.0	436.0	456.9	478.6	501.2	524.7	549.2	574.8	601.5	629.4	658.8	689.3	721.5	755.5	791.5	829.7	870.4	913.9	960.6	1011.1
49	461.1	488.4	517.2	547.5	579.4	613.1	648.8	686.7	727.0	770.1	816.4	866.4	920.8	980.4	1046.24	1118.85	1203.31	1299.65	1413.60	1553.07	1732.87	1966.28	2419.17	>2419.2

Anexo 9

Meios de cultura e reagentes utilizados

Determinação de *Salmonella*

Ágar Xilose lisina desoxicolato, segundo Taylor (ágar XLD) –Marca Difco

Fórmula:

Extrato de levedura	3,0 g
L-lisina	5,0 g
Xilose	3,75 g
Lactose	7,5 g
Sacarose	7,5 g
Desoxicolato de sódio	2,5 g
Citrato férrico amoniacal	0,8 g
Tiosulfato de sódio	6,8 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Vermelho de fenol	0,08 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

pH final de $7,4 \pm 0,2$ a 25°C

Preparo

Foram dissolvidos 57g do meio desidratado em 1000 mL de água destilada fria, deixando em repouso cerca de 15 minutos, após repouso foi submetido a aquecimento para completa dissolução do ágar. Estabilizou-se a temperatura a 55 a 60°C e então foi realizada a distribuição, em fluxo laminar, de 12 mL em placas de Petri descartáveis estéreis. A armazenagem foi feita em geladeira por no máximo 2 semanas.

Caldo selenito novobiocina –Marca Difco

Fórmula:

Triptona	5,0 g
Lactose	4,0 g
Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4)	10,0 g
Selenito de sódio	4,0 g
Novobiocina sódica	0,04 g
Água destilada	1000 mL

pH final $7,0 \pm 0,2$ a 25°C

Preparo

Foram dissolvidos 23g do meio desidratado em 1000 mL de água destilada fria e submetido a aquecimento para completa dissolução do meio, sem atingir a temperatura de ebulição, e adicionou-se 0,04g de novobiocina sódica. Volumes de 100 mL foram distribuídos ,asepticamente, em *erlenmeyers* previamente esterilizados e tamponados. O armazenamento foi feito em geladeira por no máximo 1 semana.

Determinação de Colifagos

Caldo de soja triptona glicerinado –Marca Difco

Fórmula:

Triptona	17,0 g
Peptona de soja	3,0 g
Dextrose	2,5 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.	5,0 g
Fosfato dipotássico anidro (K_2HPO_4) p.a.	2,5 g
Água destilada	1000 mL

pH final 7,3

Preparo

Foram dissolvidos 30g do meio desidratado em 1000 mL de água destilada fria e submetido a aquecimento para completa dissolução do meio, sem atingir a temperatura d ebulição. Estabilizou-se a temperatura a 25°C e então acrescentou-se ao meio 10% de glicerina p.a. O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Armazenou-se em geladeira.

Ágar soja e triptona – Marca Difco

Fórmula:

Triptona	15,0 g
Peptona de soja	5,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.	5,0 g
Fosfato dipotássico anidro (K ₂ HPO ₄) p.a.	2,5 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

pH final 7,3

Preparo

Dissolveu-se 30g do meio desidratado em 1000 mL de água destilada fria e aqueceu-se o meio em banho-maria, agitando-se freqüentemente até completa dissolução do ágar. Efetuou-se a autoclavação a 121 °C por 15 minutos, após esterilização, a temperatura do meio foi estabilizada a 45 °C e distribuídos, assepticamente, volumes de 20 a 25 mL em placas de Petri descartáveis estéreis. O armazenamento foi feito em geladeira por no máximo 2 semanas.

Ágar de soja triptona modificado – Marca Difco

Fórmula:

Triptona	17,0 g
Peptona	3,0 g

Dextrose	2,5 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.	5,0 g
Fosfato dipotássico anidro (K ₂ HPO ₄) p.a.	2,5 g
Nitrato de amônia (NH ₄ NO ₃) p.a.	1,6 g
Nitrato de estrôncio (Sr(NO ₃) ₂) p.a.	0,21 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

pH final 7,3

Preparo

Foram dissolvidos 30g do meio desidratado em água destilada fria e ele foram adicionados 2,5g de dextrose, 1,6g de nitrato de amônia e 0,21g de nitrato de estrôncio. Deixou-se em repouso por 15 minutos e aquecido, não se deixando chegar a temperatura de ebulição, até completa dissolução do ágar. Volumes de 5,5 mL foram distribuídos em tubos de ensaio de 16mm x 150 mm. Os tubos foram tamponados e autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Após autoclavagem foram armazenados em geladeira.

Preparo da cultura hospedeira *Escherichia coli* C (ATCC nº 13 706)

Colheu-se um inóculo da cultura estoque de *E. coli* C, contida em tubo com ágar de soja e triptona, e transferiu-se para 10 mL de caldo de soja e triptona glicerinado. Incubou-se o meio com inóculo a 35°C por um período de 18 a 24 horas. Após o período de incubação, transferiu-se o crescimento bacteriano, assepticamente, para frasco contendo 25 mL de caldo de soja e triptona glicerinado e incubou-se a a 35°C até obter a leitura óptica, em espctrofotômetro calibrado com caldo de soja e triptona glicerinado estéril, de 0,5 a 520nm,correpondendo a 1×10^9 *E. coli*/mL. A cultura bacteriana foi estocada em freezer, -20 °C, por um período máximo de 6 semanas.

Ágar Lúria (ágar conservação)

Fórmula:

Triptona	1,0 g
Extrato de levedura	0,4 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.	1,0 g
Ágar	1,5 g
Água destilada	100 mL

pH final $7,0 \pm 03$

Preparo

Os reagentes foram pesados em balança analítica transferidos a um *erlenmeyer* de 250 mL e a eles acrescentou-se 100 mL de água destilada fria e repousando por 15 minutos. O meio foi aquecido para completa dissolução do ágar, sem atingir a temperatura de ebulição. Após completa dissolução, foram transferidos volumes de 5 mL a tubos de 12mm x 120mm, tamponados e esterilizados a 121°C por 15 minutos. Após esterilização e enquanto o meio ainda estava quente, foram colocados em posição inclinada até completa solidificação e armazenados em geladeira.

Determinação de ovos de helmintos

Solução de sulfato de zinco 33%

Dissolveu-se 454g de sulfato de zinco (ZnSO_4) em 1000 mL de água destilada e verificou-se a densidade da solução com densímetro, sendo esta de 1,8.

Solução de ácido sulfúrico 0,1N

Diluiu-se 3 mL de H_2SO_4 concentrado e completou-se o volume para 1000 mL com água destilada em balão volumétrico de 1000mL. Armazenou-se no próprio balão volumétrico em local seco e arejado.

Reagentes para ensaios moleculares

TEI I (Tampão Tris-EDTA)

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

SDS 10%

Dodecil sulfato de sódio, solução a 10% em água destilada

Ajuste de pH para 7,2

TE II (Tampão Tris-EDTA)

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 0,1 mM

Agarose 1,5%

Agarose **1,5 g**

TBE 1X 100 mL

Agarose 1,8%

Agarose 1,8 g

TBE 1X 100 mL

TAE (Tampão Tris-Acetato-EDTA)

Solução 50X (estoque)

Tris-base 242 g

Ácido acético glacial 57,1 mL

EDTA- Na_2 pH 8,0 100mL

Água destilada q.s.q 1000 mL

Solução de brometo de etídeo 1%

EtBr 1,0 g

Água destilada 100 mL

(essa solução foi armazenada em frasco escuro ,protegido da luz)

Corante Vistra Greem

Usos em diluição, segundo instruções do fabricante.

TBE 10X

Tris-borato 89,0 mM

EDTA 2,0 mM

Ajuste de pH para 8,0

Solução de azul de bromofenol

Azul de bromofenol 0,25%

Glicerol 60 %

DNA ladder 1,0 µg/µL

Lote 11033-8, Gibco

Enzima Taq DNA polimerase

Lote 136124, Promega, WI, USA

MgCl₂ 10X, dNTP's e tampão de Taq, provenientes do kit Promega.