



JULIANE ARAÚJO GREINERT GOULART

Estudo da remoção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. e caracterização da microfauna em estações de tratamento de esgoto: instrumentos de avaliação e controle do processo.

Campinas

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



JULIANE ARAÚJO GREINERT GOULART

Estudo da remoção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. e caracterização da microfauna em estações de tratamento de esgoto: instrumentos de avaliação e controle do processo.

este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
JULIANE ARAÚJO G. GOULART
Regina M. Franco
• aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutora em Parasitologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco

Coorientadores:

Profa. Dra. Isabel Cristina Vidal Siqueira de Castro

Profa. Dr. Edson Aparecido Abdul Nour

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G863e Greinert-Goulart, Juliane Araújo, 1977-
Estudo da remoção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. e avaliação da microfauna em estações de tratamento de esgoto : instrumentos de avaliação e controle do processo / Juliane Araújo Greinert Goulart. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Regina Maura Bueno Franco.
Coorientadores: Isabel Cristina Vidal Siqueira de Castro e Edson Aparecido Abdul Nour.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Giardia*. 2. *Cryptosporidium*. 3. Tratamento de esgoto. 4. Predação (Biologia). 5. Microfauna. I. Franco, Regina Maura Bueno, 1958-. II. Siqueira-Castro, Isabel Cristina Vidal. III. Nour, Edson Aparecido Abdul, 1961-. IV. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Removal study of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. and characterization of microfauna in wastewater treatment plants : assessment instruments and process control

Palavras-chave em Inglês:

Giardia

Cryptosporidium

Wastewater treatment

Predation (Biology)

Microfauna

Área de concentração: Parasitologia

Titulação: Doutora em Parasitologia

Banca examinadora:

Regina Maura Bueno Franco [Orientador]

Luiz Antônio Daniel

Luciana Urbano dos Santos

Maria Inês Zanoli Sato

Roberto Júnio Pedroso Dias

Data da defesa: 22-07-2013

Programa de Pós Graduação: Parasitologia

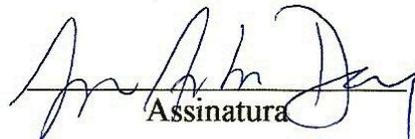
Campinas, 22 de Julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Luiz Antônio Daniel


Assinatura

Profa. Dra. Luciana Urbano dos Santos


Assinatura

Profa. Dra. Maria Inês Zanoli Sato


Assinatura

Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias


Assinatura

Prof. Dr. Romeu Cantusio Neto

Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

Assinatura

RESUMO

Os protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. são importantes patógenos de veiculação hídrica e são responsáveis por diversos surtos epidêmicos relacionados ao consumo de água contaminada. O estudo da remoção de patógenos e da microfauna que compõem sistemas combinados anaeróbio/aeróbio ainda é incipiente no mundo. Este trabalho teve como objetivo estudar a remoção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. e avaliar a microfauna do sistema combinado anaeróbio/aeróbio de dois sistemas de Tratamento de Esgoto. Na ETE Piçarrão foram colhidas amostras de esgoto bruto, efluente e lodo do Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente (RAFA), lodo recirculado do tanque de aeração, efluente tratado e lodo condicionado e, da estação de tratamento de esgoto em escala de bancada foram colhidas amostras do lodo do filtro anaeróbio, lodo do biofiltro aerado submerso e lodo do decantador e efluente tratado. Os cistos e oocistos foram concentrados mediante centrifugação e filtração em membrana, empregou-se a reação de imunofluorescência direta e confirmação dos protozoários utilizando o corante vital DAPI e DIC. Para a análise da microfauna foram colhidas amostras de lodo ativado do tanque de aeração e do líquido obtido do biofiltro aerado submerso. A análise quantitativa dos micrometazoários e dos protozoários foi realizada em câmara de Sedgwick-Rafter. A análise qualitativa incluiu observação *in vivo*, culturas e técnicas ciliatológicas. A ETE Piçarrão apresentou eficiências de remoção de cistos de *Giardia* spp. que variaram de 99,8 a 100%, sendo observadas altas concentrações de cistos de *Giardia* spp. no esgoto bruto com uma média de 98.333 cistos/L, sendo que a maior parte dos cistos foi removida pelo RAFA e concentrou-se no lodo condicionado. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados em apenas 3 meses na ETE Piçarrão e cistos de *Giardia* spp. foram detectados em todos os 24 meses de análises. O sistema em escala de bancada apresentou eficiência de remoção de praticamente 100% durante todo o estudo demonstrando que a combinação de sistemas anaeróbio/aeróbio, além de remover nutrientes, também contribui para remoção destes parasitos. O sequenciamento das amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. resultou em perfis compatíveis com as espécies *C. hominis* e *C. parvum* e para *Giardia* spp. em perfis compatíveis com a espécie *G. duodenalis* assembleias AII e BIV. A microfauna do lodo ativado da ETE Piçarrão é diversificada e composta principalmente por organismos indicadores de boas condições operacionais. A microfauna do sistema em escala de bancada que visava remoção de nitrogênio teve composição diferente com relação às espécies e as abundâncias se comparados com aqueles encontrados em sistemas de lodos ativados convencional. Os ciliados *Euplotes aediculatus* e *Sterkiella cavicola* isolados da ETE Piçarrão demonstraram potencial predatório sobre oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*. O estudo da remoção destes parasitos patogênicos ressalta a importância do tratamento de esgotos sanitários para redução do impacto dos efluentes gerados no meio ambiente e na saúde pública; a necessidade de maior controle quanto ao tratamento de lodo condicionado e a utilização da microfauna como uma importante ferramenta na avaliação do desempenho de sistemas de tratamento de esgoto.

Palavras-chave: *Giardia* spp.; *Cryptosporidium* spp.; estações de tratamento de esgoto; microfauna; predação

ABSTRACT

Giardia spp. and *Cryptosporidium* spp. are important waterborne pathogens responsible for several outbreaks related to consumption of contaminated water. Due to its long-term survival and peculiar behavior during sewage treatment, changes in system performance may result in decreased removal of these protozoa. Removal of pathogens and study of microfauna from combined system anaerobic / aerobic are still incipient in the world. This work aimed to study the removal of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts and evaluate the microfauna of the aerobic system of two wastewater treatment systems. Samples of the WWTP Piçarrão were collected from raw sewage, UASB effluent, UASB sludge, recirculated sludge from the aeration tank, treated effluent and conditioned sludge. Samples of the system bench scale were collected from the anaerobic filter sludge, submerged aerated biofilter sludge and sludge from the clarifier and the treated effluent. The cysts and oocysts were concentrated by centrifugation and membrane filtration. Protozoa were searched using the direct immunofluorescence assay and confirmation of protozoa using the vital dye DAPI and DIC. Samples were taken from the activated sludge of aeration tank and the liquid obtained from the submerged aerated biofilter for the analysis of the microfauna. Quantitative analysis of small metazoans and protozoan were held in Sedgwick-Rafter chamber. Predation assays were performed with ciliates from the two systems studied. WWTP Piçarrão showed removal efficiencies of *Giardia* spp. ranging from 99.8 to 100%. Raw sewage presented high concentrations of *Giardia* spp. (average of 98,333 cysts / L). The majority of cysts were removed by UASB and concentrated in the conditioned sludge emphasizing the importance of proper treatment of this residue. *Cryptosporidium* spp. was detected in 3 months in WWTP Piçarrão and *Giardia* spp. was detected in all 24 months of analysis. The combined system bench scale attained almost 100% of removal efficiency during the monitoring period demonstrating that the combination of anaerobic / aerobic systems contributes to removal of these parasites. All samples tested positive for *Cryptosporidium* spp. by immunofluorescence were also positive by PCR. The sequencing reaction resulted in profiles compatible with the species *C. hominis* and *C. parvum*, compared to homologous sequences available in GenBank database and *Giardia* spp. resulted in profiles supporting the species *G. duodenalis* assemblage IIA and BIV. The microfauna of the activated sludge from the WWTP Piçarrão is diverse and composed mainly of indicator organisms of good operating condition. Microfauna of the bench scale system, which aimed nitrogen removal, had different composition concerning the species and its abundance when compared with those found in conventional activated sludge systems. Free-living ciliates *Euplotes aediculatus* and *Sterkiella cavicola* isolated from WWTP Piçarrão demonstrated predatory potential for *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts. This study underscores the importance of sewage treatment to reduce the impact of effluents generated in the environment and in public health; the need for greater control regarding the treatment of conditioned sludge generated in sewage treatment plants and the use of microfauna as an important tool for assessing the performance of wastewater treatment systems.

Key-words: *Giardia* spp.; *Cryptosporidium* spp.; Wastewater Treatment Plant; microfauna; predation

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XXII
1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO DA LITERATURA	27
3. OBJETIVOS	49
3.1 OBJETIVO GERAL	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE ESTUDO	51
4.2 INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE <i>GIARDIA</i> SPP. E <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. E AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE CISTOS E OOCISTOS.	56
4.3 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS	60
4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>GIARDIA</i> E <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	61
4.4.1 <i>Giardia</i> spp.....	61
4.4.2 <i>Cryptosporidium</i> spp.....	63
4.5 AVALIAÇÃO DA MICROFAUNA	68
4.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREDATÓRIO DE CILIADOS COMPONENTES DA MICROFAUNA.	70
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
5. RESULTADOS	75
5.1 INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE <i>GIARDIA</i> SPP. E <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. E AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE CISTOS E OOCISTOS.	75
5.1.1 <i>Estação de Tratamento de Esgoto Piçarrão</i>	75
5.1.2 <i>Sistema combinado em escala de bancada</i>	78
5.2 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS	82
5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE <i>GIARDIA</i> SPP. E <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP.....	90

5.4 AVALIAÇÃO DA MICROFAUNA.....	98
5.4.1 Estação de Tratamento de Esgoto Piçarrão	98
5.4.2 Sistema combinado em escala de bancada.....	114
5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREDATÓRIO DE ESPÉCIES DE CILIADOS COMPONENTES DA MICROFAUNA.	125
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	127
5.6.1 Estação de Tratamento de Esgoto Piçarrão	127
5.6.2 Sistema Combinado em Escala de Bancada	133
6. DISCUSSÃO	143
6.1 INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE <i>GIARDIA</i> SPP. E <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. E AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE CISTOS E OOCISTOS.	144
6.1.1 Estação de Tratamento de Esgoto Piçarrão	144
6.1.2 Sistema combinado em escala de bancada.....	151
6.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE <i>GIARDIA</i> E <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	154
6.2.1 <i>Cryptosporidium</i> spp.....	154
6.2.2 <i>Giardia</i> spp.....	157
6.3 AVALIAÇÃO DA MICROFAUNA DO LODO ATIVADO	158
6.3.1 Estação de Tratamento de Esgoto Piçarrão	159
6.3.2 Sistema Combinado em Escala de Bancada	168
6.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREDATÓRIO DE ESPÉCIES DE CILIADOS COMPONENTES DA MICROFAUNA.	174
7. CONCLUSÕES.....	176
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	179

Agradecimentos

Agradeço em especial ao meu marido, Rogério, pelo grande incentivo, amor, carinho, compreensão e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À minha filha Beatriz e ao meu filho Rogerinho, que está a caminho, por tornar todos os dias muito alegres, felizes e por me incentivar para lutar por um mundo melhor.

Aos meus pais, José e Irene, e à minha irmã, Jaqueline, pelo amor, carinho, apoio e incentivo.

À minha cunhada Chrystianne e aos meus sogros Marilza e Rogério Goulart, pela amizade, carinho, apoio e incentivo.

À Universidade Regional de Blumenau, pelo afastamento para realização do Doutorado e pela concessão de bolsa de estudos, conforme Edital 05/2008 PROPEX/FURB.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Regina Maura Bueno Franco, por seus ensinamentos, pelo incentivo, compreensão e sua amizade que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional durante a realização deste trabalho.

À Prof^a. Dra. Isabel Cristina Vidal Siqueira de Castro, pela orientação, incentivo, amizade e grande auxílio na identificação, montagem das pranchas dos protozoários de vida livre e análise das amostras para a pesquisa de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

Ao Prof. Dr. Edson A. Abdoul Nour, pela contribuição na execução dos experimentos de bancada, pelos seus ensinamentos e sua amizade.

Ao amigo Mario Foco, por ter cedido o sistema em escala de bancada que fazia parte da sua pesquisa de mestrado, para avaliação da microfauna e remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp..

Aos amigos do Laboratório de Protozoologia (IB-UNICAMP), Diego, Sandra, Bruna, Audrey, Levy, Clarisse, Mayra, Rahel, Taís, Ana Rita e Nilson pelo grande incentivo, amizade, carinho,

companheirismo e dedicação durante todo o período em que trabalhamos juntos, em especial ao Diego Leal pelo grande auxílio nas análises na fase inicial do estudo e ao Nilson Branco pelo auxílio nas análises moleculares de *Cryptosporidium* spp.

Ao amigo Maurício Durigan, do Laboratório de Análise Genética e Molecular, pelo auxílio nas análises moleculares de *Giardia* spp..

À Prof^a. Dra. Maria Helena Matté à Dra. Ronalda Silva de Araújo da Faculdade de Saúde Pública da USP pelas análises moleculares das amostras positivas para *Cryptosporidium* spp.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do IB pelos seus valiosos ensinamentos e pela amizade, em especial, as Prof^a. Dra. Ana Guaraldo e a Prof^a. Dra. Silmara Allegretti.

À Dra. Luciana Urbano dos Santos pelas valiosas contribuições na redação deste trabalho.

Ao Gerente de Operação de Esgoto da Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento de Campinas (SANASA), Eng. Renato Rossetto, por permitido a realização dos estudos na ETE Piçarrão.

Ao Eng. Carlos Uildson Oliveira, coordenador de tratamento de esgoto da SANASA, e ao Eng. Bruno Silveira da ETE Piçarrão por terem cedido os resultados das análises físicas e químicas e pelo apoio técnico nas coletas.

Aos técnicos funcionários da SANASA, pelo auxílio na coleta das amostras na ETE Piçarrão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, CNPq – Edital Universal 2010 e à FAPESP (Processo 2010/16222-4) pelo auxílio financeiro para realização das análises deste trabalho.

Aos professores, colegas e amigos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta Tese, gostaria de expressar a minha gratidão.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema espacial do sistema combinado em escala de bancada.....	54
Figura 2. Esquema espacial da ETE Piçarrão.	57
Figura 3. Gráfico da estimativa do número de cistos/L de <i>Giardia</i> spp. detectados nas diferentes etapas de tratamento da ETE Piçarrão.....	77
Figura 4. Cisto de <i>Giardia</i> spp. detectado no RAFA.....	78
Figura 5. Gráfico da estimativa do número de cistos/L de <i>Giardia</i> spp. presentes nas amostras de lodo coletadas no Filtro Anaeróbio (FA), Biofiltro Aerado Submerso (BAS) e decantador (DEC)	81
Figura 6. (a) Cisto de <i>Giardia</i> spp. e (b) oocisto de <i>Cryptosporidium</i> spp. detectados no lodo do biofiltro aerado submerso.....	82
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos amplificados nas reações de <i>nested-PCR</i> para o fragmento de 826pb.	90
Figura 8. Posição filogenética de isolados de <i>Cryptosporidium</i> spp. de amostras de esgoto da ETE Piçarrão (1a, 2a, 3a e 4a) e hospitalar (5a e 6a)	92
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 3% evidenciando as bandas de 530pb do gene <i>tpi</i> a partir de amplificação de amostras da ETE Piçarrão. L = <i>Ladder 1kb plus</i> (Invitrogen).	93
Figura 10. Posição filogenética de isolados de <i>Giardia duodenalis</i> de amostras de esgoto da ETE Piçarrão, obtidas através do alinhamento de 530 nucleotídeos da região codificante do gene <i>tpi</i>	95

Figura 11. Posição filogenética de isolados de <i>Giardia duodenalis</i> de amostras de esgoto hospitalar, obtidas através do alinhamento de 530 nucleotídeos da região codificante do gene <i>tpi</i>	97
Figura 12. Frequência relativa dos grupos da microfauna observado no tanque de aeração da ETE Piçarrão.....	99
Figura 13. Média dos organismos / mL detectados nas amostras frescas de lodo ativado nos tanques de aeração durante os meses de abril de 2010 a março de 2012.....	102
Figura 14. Fotomicrografias de protozoários ciliados livre natantes presentes no lodo ativado da ETE Piçarrão..	105
Figura 15. Fotomicrografias de protozoários bacterívoros rastejantes presentes no lodo ativado da ETE Piçarrão.	106
Figura 16. Protozoários ciliados rastejantes presentes no lodo ativado da ETE - Piçarrão.	107
Figura 17. Protozoários ciliados rastejantes presentes no lodo ativado da ETE Piçarrão. a–c:	108
Figura 18. Fotomicrografias de protozoários ciliados sésseis <i>in vivo</i> em contraste de fase e contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC), presentes no lodo ativado da ETE Piçarrão. a–b: <i>Vorticella infusionum</i> ; c: <i>Vorticella convallaria</i> ; d: Colônia de <i>Epistylis plicatilis</i> ; e: Colônia de <i>Carchesium polypinum</i> . b = ciliado impregnado pelo protargol; Barra = 20 µm. .	109
Figura 19. Fotomicrografias em contraste de fase e contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC) de protozoários ciliados predadores sésseis <i>in vivo</i> , presentes no lodo ativado da ETE - Piçarrão.....	110
Figura 20. Fotomicrografias em contraste de fase de protozoários flagelados e ameboides <i>in vivo</i> , presentes no lodo ativado da ETE - Piçarrão.	111

Figura 21. Fotomicrografias em contraste de fase de micrometazoários <i>in vivo</i> , presentes no lodo ativado da ETE - Piçarrão.	112
Figura 22. Frequência relativa dos grupos da microfauna presentes no biofiltro aeróbio submerso, no período de outubro de 2009 a outubro de 2011.....	115
Figura 23. Média dos organismos / mL detectados no biofiltro aerado submerso durante os meses de outubro de 2009 a outubro de 2011.....	118
Figura 24. Fotomicrografias de protozoários ciliados livre natantes presentes no biofiltro aerado submerso.....	119
Figura 25. Fotomicrografias de protozoários ciliados rastejantes presentes no biofiltro aerado submerso.....	120
Figura 26. a-f: Fotomicrografias de protozoários ciliados sésseis presentes no biofiltro aerado submerso.....	121
Figura 27. a) <i>Euplotes aediculatus</i> em campo claro; b) <i>E. aediculatus</i> em imunofluorescência e campo claro após predação de oocisto (seta); c) <i>Sterkiella cavicola</i> em imunofluorescência e campo claro após predação de um cisto (seta) e presença de (*) cistos e (+) oocistos próximos ao ciliado; d) <i>S. cavicola</i> em imunofluorescência e campo claro após predação de um cisto (seta). Barra = 20 μ m	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies e genótipos do gênero <i>Giardia</i>	30
Tabela 2. Espécies de <i>Cryptosporidium</i> válidas e infectividade para o ser humano.	33
Tabela 3. Classificação utilizada para agrupar os organismos constituintes da microfauna do lodo ativado quanto ao modo de vida.....	42
Tabela 4. Conversão do Índice Biológico do Lodo (IBL) em quatro classes de qualidade e respectivas características do sistema	46
Tabela 5. Características operacionais de cada uma das etapas de operação do sistema em escala de bancada.	55
Tabela 6. Sequências de referência utilizadas para o gene <i>tpi</i> obtidas do Genbank	63
Tabela 7. Lista de iniciadores empregados para amplificação do fragmento 18S rRNA de <i>Cryptosporidium</i>	65
Tabela 8. Classificação das correlações de Pearson.....	73
Tabela 9. Estimativa do número de cistos/L de <i>Giardia</i> spp. detectados nas diferentes etapas de tratamento da ETE Piçarrão.	76
Tabela 10. Estimativa do número de cistos/L de <i>Giardia</i> spp. presentes nas amostras de lodo coletadas no Filtro Anaeróbio (FA), Biofiltro Aerado Submerso (BAS), decantador (DEC) e efluente tratado (ET).	80
Tabela 11. Variáveis físicas e químicas da Estação de Tratamento de Esgoto Piçarrão determinados no período entre abril de 2010 a março de 2012	83
Tabela 12. Variáveis físicas e químicas do Sistema Combinado Anaeróbio-Aeróbio determinados no período entre fevereiro de 2010 a abril de 2010.....	84

Tabela 13. Variáveis físicas e químicas do Sistema Combinado Anaeróbio-Aeróbio determinados no período entre maio de 2010 a junho de 2010	85
Tabela 14. Variáveis físicas e químicas do Sistema Combinado Anaeróbio-Aeróbio determinados no período entre junho de 2010 a janeiro de 2011	86
Tabela 15. Variáveis físicas e químicas do Sistema Combinado Anaeróbio-Aeróbio determinados no período entre janeiro de 2011 a abril de 2011	87
Tabela 16. Variáveis físicas e químicas do Sistema Combinado Anaeróbio-Aeróbio determinados no período entre maio de 2011 a julho de 2011	88
Tabela 17. Variáveis físicas e químicas do Sistema Combinado Anaeróbio-Aeróbio.....	89
Tabela 18. Resultados da <i>Nested</i> -PCR e genotipagem das amostras de esgoto da ETE Piçarrão e Sistema em escala de bancada positivas para <i>Cryptosporidium</i> spp. por meio da RID.....	91
Tabela 19. Resultados da PCR e genotipagem das amostras de esgoto da ETE Piçarrão positivas para <i>Giardia</i> spp. por meio da RID.....	94
Tabela 20. Resultados da PCR e genotipagem das amostras de esgoto hospitalar positivas para <i>Giardia</i> spp. por meio da RID.....	96
Tabela 21. Frequência relativa e abundância dos grupos componentes da microfauna presente no lodo ativado da ETE Piçarrão.....	98
Tabela 22. Frequência e abundância de protozoários e micrometazoários do lodo ativado da ETE Piçarrão observadas no dia da coleta em amostras de lodo ativado	101
Tabela 23. Levantamento das espécies de protozoários ciliados encontradas na ETE Piçarrão. + = ocorrência do ciliado.	104

Tabela 24. Densidade média de protozoários e classificação do lodo ativado da ETE Piçarrão ao longo do período de coleta.	113
Tabela 25. Frequência relativa e abundância dos grupos componentes da microfauna presente no biofiltro aeróbio submerso,	115
Tabela 26. Média dos organismos / mL detectados no biofiltro aerado submerso	117
Tabela 27. Número total de protozoários ciliados e flagelados, grupos dominantes, Índice Biótico do Lodo (IBL) e classe do lodo por coleta no sistema em escala de bancada.	123
Tabela 28. Comparação múltipla de médias das densidades de cistos de <i>Giardia</i> spp. no Esgoto Bruto entre os trimestres do ano na ETE Piçarrão.	127
Tabela 29. Correlação linear de Pearson (r) entre a densidade dos grupos de protozoários ciliados do tanque de aeração e dados físicos e químicos do efluente do RAFA da ETE Piçarrão.	128
Tabela 30. Correlação linear de Pearson (r) entre a densidade das espécies da microfauna do tanque de aeração e dados físicos e químicos do Efluente do RAFA da ETE Piçarrão.....	129
Tabela 31. Correlação linear de Pearson (r) entre a densidade das espécies da microfauna do tanque de aeração e dados físicos e químicos do Efluente do RAFA da ETE Piçarrão.....	130
Tabela 32. Correlação linear de Pearson (r) entre a densidade dos grupos de ciliados do tanque de aeração e dados físicos e químicos do Efluente Tratado da ETE Piçarrão.	131
Tabela 33. Correlação linear de Pearson (r) entre a densidade das espécies da microfauna do tanque de aeração e dados físicos e químicos do Efluente Tratado da ETE Piçarrão.....	132
Tabela 34. Correlação linear de Pearson (r) entre a densidade das espécies da microfauna do tanque de aeração e dados físicos e químicos do Efluente Tratado da ETE Piçarrão.	133

Tabela 35. Comparação múltipla de médias das densidades de cistos de <i>Giardia</i> spp. no lodo do Filtro Anaeróbio, entre os trimestres estudados, do Sistema Combinado em Escala de Bancada.	134
Tabela 36. Correlação linear de Pearson (r) entre a densidade dos grupos de ciliados do Biofiltro Aerado Submerso e dados físicos e químicos do Filtro Anaeróbio.	135
Tabela 37. Correlação linear de Pearson (r) entre a densidade das espécies da microfauna do Biofiltro Aerado Submerso e dados físicos e químicos do Filtro Anaeróbio.....	136
Tabela 38. Correlação linear de Pearson (r) entre a densidade das espécies da microfauna do Biofiltro Aerado Submerso e dados físicos e químicos do Filtro Anaeróbio.....	137
Tabela 39. Correlação linear de Pearson (r) entre a densidade dos grupos de ciliados do Biofiltro Aerado Submerso e dados físicos e químicos do Biofiltro Aerado Submerso (Efluente tratado).	139
Tabela 40. Correlação linear de Pearson (r) entre as espécies da microfauna do Biofiltro Aerado Submerso e dados físicos e químicos do Biofiltro Aerado Submerso.	140
Tabela 41. Correlação linear de Pearson (r) entre as espécies da microfauna do Biofiltro Aerado Submerso e dados físicos e químicos do Biofiltro Aerado Submerso.	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

AOV – Ácidos Orgânicos Voláteis

AP – Alcalinidade Parcial

AT – Alcalinidade Total

BAS – Biofiltro Aerado Submerso

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DAPI: 4,6 -diamino-2-phenylindole.

DBO₅ – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DEC - Decantador

DQO – Demanda Química de Oxigênio

DIC – *Diferencial Interference Contrast*

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

FA – Filtro Anaeróbio

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

IBL – Índice Biótico do Lodo

IMS – *Immunomagnetic Separation* (Separação Imunomagnética)

NKT - Nitrogênio Kjeldahl Total

OD – Oxigênio Dissolvido

PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

RID – Reação de Imunofluorescência Direta

SANASA - Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento de Campinas, SP

SDT - Sólidos Dissolvidos Totais

SDF - Sólidos Dissolvidos Fixos

SDV - Sólidos Dissolvidos Voláteis

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SST – Sólidos Suspensos Totais

SSV – Sólidos Suspensos Voláteis

SSF - Sólidos Suspensos Fixos

SSV - Sólidos Suspensos Voláteis

SS - Sólidos Sedimentáveis

ST – Sólidos Totais Sólidos Totais Fixos

STV - Sólidos Totais Voláteis

USEPA – *United States Environmental Protection Agency*

1. INTRODUÇÃO

A água é essencial para o desenvolvimento da vida humana, uma vez que praticamente todas as atividades realizadas pelo homem, sejam elas urbanas, industriais ou agropecuárias, dependem substancialmente dela (ONU, 2006). Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), mediante o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), 21 nações sofrem com a falta de água e o consumo mundial foi multiplicado por seis no último século. Para MACÊDO (2000), aliadas à falta de água, estão ainda a sua má distribuição e a contaminação desse recurso.

Os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* (sin. *G. lamblia*, *G. intestinalis*) são parasitos obrigatórios e agentes causais da criptosporidiose e giardiose, respectivamente, infectando tanto indivíduos imunocomprometidos como também imunocompetentes (KOTHAVADE et al., 2012; THOMPSON e MONIS, 2012). A principal forma de transmissão dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. ocorre por meio da veiculação hídrica após a ingestão de seus estádios evolutivos infectantes, cistos e oocistos respectivamente, sendo a rota de transmissão fecal-oral responsável pela manutenção do ciclo na natureza (GRACZYK et al. 2008; SMITH et al., 2010).

Como as formas infectantes estão presentes nas fezes que compõem o esgoto bruto que chega às estações de tratamento de esgotos (ETE) (ROBERTSON et al., 2006; NASSER et al., 2012) é de fundamental importância o tratamento adequado das águas residuárias para preservação dos mananciais que muitas vezes servem para abastecimento público.

Devido à escassez de água e o excesso de resíduos produzidos pelas ETE, muitos países já utilizam os produtos finais das ETE em diversas atividades econômicas. O efluente tratado

geralmente é lançado em rios, lagos ou águas costeiras, porém já se tem relato do uso na irrigação (POLLICE et al., 2004; LONIGRO et al., 2006; AL-SAED, 2007). O lodo condicionado tem sido utilizado como fertilizante do solo, porém, vários estudos têm demonstrado altos níveis de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em biossólidos, lodo de esgoto sem tratamento e efluente biologicamente tratado (CHARLES et al., 2003; RIMHANEN-FINNE et al., 2004; BRIANESCO e BONADONA, 2005; MONTEMAYOR et al., 2005; CANTUSIO-NETO et al., 2006; BONATTI, 2007; GRACZYK et al., 2007, 2008; CHENG et al., 2009).

Os sistemas convencionais de tratamento de esgoto em nível secundário não foram configurados para remover completamente estes patógenos (ROBERTSON et al. 2000; CACCIÒ et al. 2003; CHENG et al., 2009), sendo necessária a avaliação destes sistemas para entender em quais etapas ocorrem falhas na remoção e, se existe possibilidade de melhorias, visando também a remoção destes protozoários.

Nos sistemas de tratamento convencionais por lodos ativados a microfauna presente no tanque de aeração exerce um papel fundamental na remoção da matéria orgânica. Existem alguns relatos da ocorrência de espécies de ciliados e rotíferos que compõem a microfauna, que exercem a predação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. podendo contribuir para remoção destes do esgoto doméstico (FAYER et al., 2000; STOTT et al., 2001; STOTT et al., 2003).

Atualmente, os sistemas combinados anaeróbio/aeróbio são uma alternativa para o tratamento de águas residuárias. Estes sistemas são mais econômicos, produzem uma quantidade menor de resíduos sólidos e, muitas vezes, removem além da matéria orgânica, nutrientes como nitrogênio e fósforo. O estudo da remoção de patógenos e da microfauna que compõe estes sistemas combinados ainda é incipiente no mundo. A maioria dos estudos tem sido realizada em estações de tratamento de esgoto convencionais utilizando lodos ativados no tratamento aeróbio.

2. REVISÃO DA LITERATURA

As fontes de poluição dos recursos hídricos estão divididas em três grandes grupos. O primeiro grupo é o das águas residuárias urbanas (esgotos) que contêm dejetos humanos, restos de alimentos, sabões e detergentes e, por este motivo, apresentam elevada concentração de bactérias e parasitos, alguns dos quais são patogênicos ao homem, pois podem ser provenientes de pessoas infectadas doentes ou portadoras de agentes infecciosos (TUNDISI e TUNDISI, 2005). No segundo grupo, enquadram-se as águas residuárias de origem agropecuária, contendo dejetos que, por meio das chuvas e proximidade aos leitos de rios ou nascentes, atingem águas superficiais ou lençóis subterrâneos veiculando zoonoses e agrotóxicos (MOTA, 1995). O terceiro grupo é o das águas residuárias industriais, onde se observa uma grande quantidade de substâncias tóxicas, como por exemplo, compostos orgânicos, petróleo e derivados, detergentes e compostos inorgânicos, incluindo metais tóxicos (GÜNTER, 1980; VARELA, 1987; MOTA, 1995).

A água pode ser responsável por muitas doenças, quando serve de veículo para a transmissão de uma variedade de microrganismos resultantes da ingestão de água contaminada pelo ser humano, do emprego de água poluída para irrigação, pesca e recreação, ou seja, as chamadas doenças de veiculação hídrica (CHENG et al., 2009).

Os patógenos podem alcançar os recursos hídricos pela drenagem de fezes e do lodo de esgoto usado na agricultura e, em função de escoamentos superficiais provocados por fortes chuvas. Porém, é a disposição deste resíduo em um corpo d'água uma das maiores fontes de contaminação. Além dos lançamentos *in natura*, a disposição de esgoto sem tratamento adequado nos mananciais é uma importante fonte de patógenos no ambiente (OTTOSON et al., 2006).

As enfermidades mais comumente veiculadas pela água incluem a cólera, as hepatites A e E, as shigeloses, as infecções por rotavírus, a esquistossomose, a ciclosporoze, a toxoplasmose, a amebiose, a giardiose e a criptosporidiose (GAJADHAR et al., 2004; FUNASA, 2006). As formas infectantes destes agentes são liberadas via fezes e/ou urina dos hospedeiros infectados, fazendo com que o esgoto doméstico seja uma das mais importantes fontes de contaminação ambiental (MACPHERSON, 2005; MONTEMAYOR et al., 2005), causando um grande impacto na saúde pública e ambiental. Em geral, a maioria destes agentes de veiculação hídrica, ao serem ingeridos, tem como principal sintomatologia os processos diarreicos, o que fecha o ciclo de transmissão das enfermidades.

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que 88,0% das mortes por diarreia no mundo são causadas por ingestão de água contaminada ou saneamento inadequado. Das 1,8 milhões de pessoas que vão a óbito por ano por esta patogenia, 90,0% são crianças com menos de cinco anos de idade (ONU, 2006).

Infecções intestinais por protozoários estão associadas às altas taxas de morbidade e mortalidade, com mais de 58 milhões de caso/ano em todo mundo e, com custos diretos na ordem de US\$ 15 milhões (SAVIOLI et al., 2006).

Em nível mundial, os protozoários foram a causa de 524 surtos epidêmicos de veiculação hídrica nos últimos 28 anos (FRANCO et al., 2012). Entre as várias espécies, destacaram-se *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. que foram os agentes etiológicos de 50,8% e 40,6% destes surtos, respectivamente, no período entre 1984 a 2004 (KARANIS et al., 2007) e, entre 2004 a 2010, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foram os agentes etiológicos de 35,2% e 60,3% dos surtos epidêmicos (BALDURSSON e KARANIS, 2011).

A criptosporidiose e a giardiose são as principais protozooses transmitidas por veiculação hídrica em países desenvolvidos da América do Norte, Europa e Austrália, mesmo contando com elevado padrão de abastecimento de água e tratamento de esgoto (FLETCHER et al, 2012).

A giardiose é causada pelo protozoário *Giardia* spp. e, atualmente, a *Giardia* esta classificada no supergrupo Excavata, primeiro rank Fornicata, segundo rank Eopharyngia: Diplomonadida: Giardiinae (ADL et al., 2005) apesar de uma nova proposição de classificação ainda estar em debate (THOMPSON e MONIS, 2012).

Muitas espécies de *Giardia* habitam o trato intestinal de quase todas as classes de vertebrados e, segundo Thompson e Monis (2012), *Giardia duodenalis* (sinonímia *G. lamblia*, *G. intestinalis*) é encontrada em humanos e na maioria dos mamíferos domésticos e silvestres. Com o advento da biologia molecular foi possível confirmar o caráter zoonótico de *Giardia duodenalis*. O parasito apresenta grande diversidade genética sendo considerado um complexo de espécies, subdividido em sete genótipos ou assembleias (FRANCO et al., 2012), circulantes somente entre os seres humanos, animais ou entre ambos (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies e genótipos do gênero *Giardia*.

Espécie	Genótipo	Hospedeiros principais	Tamanho dos Cistos (µm)	Referencias
<i>Giardia duodenalis</i> (= <i>G. lamblia</i> ; <i>G. intestinalis</i>)	A	Humanos e outros primatas, canídeos, felinos, bovinos, roedores, animais silvestres.	12-15 x 6-8	Homan et al., 1992; Mayrhofer et al., 1995
	B	Humanos e outros primatas, canídeos, animais silvestres.	12-15 x 6-8	Homan et al., 1992; Mayrhofer et al., 1995
	C	Canídeos	12-15 x 6-8	Meloni & Thompson, 1987
	D	Canídeos	12-15 x 6-8	Monis et al., 1998
	E	Bovinos e animais de pastoreio (herbívoros)	12-15 x 6-8	Ey et al., 1997
	F	Felinos	12-15 x 6-8	Monis et al., 1999
	G	Roedores	12-15 x 6-8	Monis et al., 1999
<i>G. agilis</i>	--	Anfíbios	20-30 x 4-5	Kunstler, 1882, 1883
<i>G. muris</i>	--	Roedores, aves e répteis.	9-12 x 5-7	Grassi, 1879
<i>G. psittaci</i>	--	Aves	14 x 6,0	Erlandsen & Bemrich, 1987
<i>G. ardeae</i>	--	Aves	10 x 6,5	Erlandsen et al., 1990
<i>G. microti</i>	--	Roedores	12-15 x 6-8	Feely, 1988

Fonte: Franco et al. 2012.

A análise de mais de 1000 isolados de DNA do parasito (extraído de amostras fecais e analisados por PCR) de indivíduos de diferentes localizações geográficas confirmam que apenas os genótipos A e B infectam o homem (CACCIÒ e RYAN, 2008). Além disso, a genotipagem de multiloci de *Giardia* spp. provenientes de infecções de seres humanos e outros hospedeiros mamíferos de diferentes partes do mundo demonstrou a ocorrência de cepas zoonóticas em hospedeiros humanos e não humanos (cães, gatos, gado e animais silvestres) residentes das

mesmas áreas geográficas, ressaltando o potencial deste tipo de transmissão (LEONHARD et al., 2007; THOMPSON e SMITH, 2011).

A determinação de subgrupos destes genótipos elucidou importantes aspectos epidemiológicos envolvidos com a transmissão da parasitose, e contribuiu para a compreensão de que os subgenótipos AII e BIV são considerados antroponóticos (humanoespecíficos) e os subgenótipos AI e BIII considerados zoonóticos (THOMPSON, 2004).

As infecções sintomáticas agudas caracterizam-se por diarreia do tipo aquosa, explosiva, de odor fétido, acompanhada de gases com distensão e dores abdominais. Nas infecções crônicas, os sintomas podem persistir por anos, manifestando-se com episódios de diarreia que podem ser contínuos, intermitentes ou esporádicos (VIANA, 2008). Esses sintomas variam de acordo com a virulência do parasito, bem como com características do hospedeiro (estado nutricional, imunológico e de desenvolvimento). Crianças menores de cinco anos e idosos costumam apresentar sintomas mais severos. A infecção pode ser responsável por redução do crescimento e desenvolvimento de crianças (ORTEGA e ADAM, 1997). Mesmo assim, há indivíduos assintomáticos que, como reservatórios naturais, eliminam cistos nas fezes por muito tempo (THOMPSON, 2004). A ocorrência de manifestações clínicas extraintestinais como urticaria, dermatite atópica, angioedema, uveíte, alterações na retina, dentre outras, parecem ser mais comuns do que previamente previsto (CANTEY et al., 2011).

Estimativas apontam 500.000 novos casos de incidência de giardiose em humanos por ano (THOMPSON, 2004). A prevalência varia de 20 a 30 % em países em desenvolvimento e de 2 a 5 % em países desenvolvidos. Mais de 200 milhões de pessoas na África, Ásia e América Latina apresentam a doença com sintomas (SAVIOLI et al., 2006; THOMPSON, 2009). Só nos Estados Unidos, onde a incidência pode ser superior a 0,7% da população (MORRISON et al., 2007), há

estimativas de dois milhões de novos casos anualmente sendo esses atribuídos em sua maioria à contaminação de água (MEAD et al., 1999; THOMPSON e MONIS, 2012). Considerados os últimos 30 anos, a *Giardia* spp. foi a causa mais comum de surtos epidêmicos de doenças de transmissão hídrica nos EUA (AUBERT e VILLENA, 2009).

A criptosporidiose é causada pelo protozoário *Cryptosporidium* spp., sendo classificado no supergrupo Chromalveolata, primeiro rank Alveolata, segundo rank Apicomplexa: Conoidasida: Coccidiasina (ADL et al., 2005).

As espécies *C. hominis* e *C. parvum* genótipo bovino são as espécies mais observadas em infecções humanas (FAYER, 2010). Nos últimos anos, novas espécies pertencentes ao gênero *Cryptosporidium* foram descritas inclusive outras espécies zoonóticas que exibem potencial infectante para o homem (Tabela 2).

Tabela 2. Espécies de *Cryptosporidium* válidas e infectividade para o ser humano.

Espécie	Hospedeiro Principal	Infeccioso para o ser humano	Tamanho dos oocistos (µm)	Referencia
1. <i>C. hominis</i>	Homem	Sim	4,5 x 5,4	Morgan-Ryan et al., 2002
2. <i>C. parvum</i>	Ruminantes	Sim	4,5 x 5,5	Tyzzler, 1912
3. <i>C. andersoni</i>	Bovinos	Sim	5,5 x 7,4	Lindsay et al., 2000
4. <i>C. muris</i>	Roedores	Sim	5,6 x 7,4	Tyzzler, 1907
5. <i>C. suis</i>	Suíños	Sim	4,4 x 4,9	Ryan et al., 2004
6. <i>C. felis</i>	Felinos	Sim	4,5 x 5,0	Iseki, 1979
7. <i>C. canis</i>	Canídeos	Sim	3,68 x 5,88	Fayer et al., 2001; Pedraza-Díaz et al., 2001.
8. <i>C. bovis</i>	Bovinos	--	4,63 x 4,89	Fayer et al., 2005
9. <i>C. ryanae</i>	Bovinos	--	3,16 x 3,73	Fayer et al., 2008
10. <i>C. xiaoi</i>	Ovelhas	--	2,94 x 3,44	Fayer & Santín, 2009
11. <i>C. wairi</i>	Cobaíos	--	4,0 x 4,8	Vetterling et al., 1971
12. <i>C. baileyi</i>	Aves	Sim	5,2 x 6,3	Current et al., 1986
13. <i>C. meleagridis</i>	Aves	Sim	4,5 x 4,6	Slavin, 1955
14. <i>C. galli</i>	Aves	--	6,2 x 8,5	Ryan et al., 2003
15. <i>C. serpentis</i>	Répteis	--	4,8 x 5,6	Levine, 1980
16. <i>C. fayeri</i>	Cangurus	--	4,3 x 4,9	Ryan et al, 2008
17. <i>C. macropodum</i>	Cangurus	--	4,9 x 5,1	Power & Ryan, 2008
18. <i>C. varanii</i>	Lagartos	--	4,7 x 4,8	Pavlasek & Ryan, 2008
19. <i>C. ubiquitum</i>	Cervos	Sim	5,04 x 4,66	Fayer et al, 2010
20. <i>C. cuniculus</i>	Coelhos	Sim	5,98 x 5,38	Robinson et al., 2010.
21. <i>C. tyzzeri</i>	Camundongos	--	4,64 x 4,19	Ren et al., 2012.
22. <i>C. viatorum</i>	Homem	sim	5,35 x 4,72	Elwin et al., 2012
23. <i>C. scrofarum</i>	Suíños	sim	5,16 x 4,83	Kvac et al., 2013
24. <i>C. fragile</i>	Sapo preto	--	6,2 x 5,5	Jirku et al., 2008
25. <i>C. molnari</i>	Peixes	--	4,7 x 4,5	Sitja-Bobadilla et al. 2005
26. <i>C. scopthalmi</i>	Peixes	--	4,4 x 3,9	Alvarez-Pellitero et al., 2009

Fonte: Adaptado de Franco et al., 2012 e Chalmers e Katzer, 2013. (--) Ausência de casos humanos descritos

Os primeiros casos humanos foram descritos, em 1976, em indivíduos em contato com animais domésticos, mas a criptosporidiose só adquiriu relevância após o reconhecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Além do comportamento oportunista em pacientes portadores do vírus HIV, verificou-se também que *Cryptosporidium* spp. é um importante agente causador de gastroenterites agudas, mesmo em indivíduos imunocompetentes (FRANCO e SANTOS, 2008).

A sintomatologia pode ser variável de indivíduo para indivíduo sendo influenciada pela idade, status nutricional e espécie ou subtipo causador da infecção, porém, o que delimita a severidade da doença é o status imunológico do hospedeiro (O'CONNOR et al., 2011). Nos indivíduos imunocompetentes a infecção pode ser assintomática ou apresentar duração auto-limitada sendo frequentemente não diagnosticada (FAYER et al., 2000). O principal sintoma é a diarreia líquida que tende a ter longa duração (em média 5 - 10 dias), acompanhada de cólicas abdominais, fadiga, náusea, anorexia, perda de peso, febre baixa, vômitos, dores nas articulações e mialgias (FAYER et al., 2000; SHIRLEY et al., 2012). Em indivíduos imunodeficientes, a infecção se agrava e adquire um caráter oportunista sendo frequente causa de óbitos (FARTHING, 2006; O'CONNOR et al., 2011). Em pacientes portadores de HIV/ AIDS, a infecção geralmente apresenta-se mais grave quando os níveis de linfócitos T CD4 caem para níveis abaixo de 100 células/mm³, ocorrendo má-absorção intestinal, significativa perda de peso e elevado coeficiente de letalidade (CABADA e WHITE, 2010; IQBAL et al., 2012). Manifestações extra-intestinais ocorrem mais frequentemente em indivíduos imunossuprimidos e indicam um mal prognóstico da doença: acometem os dutos biliares (com aparecimento de colangite), fígado, pulmão, e provocam quadros graves de pancreatite (DENKINGER et al., 2008).

Atualmente, a criptosporidiose está distribuída em todos os continentes excetuando-se a Antártica. Na Europa, *Cryptosporidium parvum* apresenta maior prevalência (média de 57,0%) em relação aos demais. Quanto às espécies, no continente Americano, África e Austrália, são reportados mais casos de infecção por *Cryptosporidium hominis* (média de 62,0%); no Oriente médio a infecção mais prevalente se dá por *C. parvum*. (CACCIÒ et al, 2005; XIAO, 2010).

De acordo com Slifko et al. (2000), os protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. tornaram-se importantes patógenos contaminantes da água por três principais fatores: a criptosporidiose pode ocorrer em diversos animais (zoonoses); uma baixa densidade de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. infectantes já é suficiente causar infecções e, esses cistos e oocistos resistem aos processos de tratamento sendo resistentes aos desinfetantes comumente utilizados no tratamento da água.

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. permanecem infectantes por seis meses em água doce a uma temperatura variando entre zero e 20°C; na água do mar a infectividade se mantém por 40 dias a 18°C e 35 % de salinidade (FAYER, 2004). Já os cistos de *Giardia* spp. podem sobreviver no ambiente por até dois meses a 8°C (CACCIÒ et al., 2003).

Os cistos de *Giardia* spp. e os oocistos de *Cryptosporidium* spp. são amplamente encontrados como contaminantes de águas marinhas (JOHNSON et al., 1997), de águas não tratadas e recreação (BUKHARI et al., 1997; KARANIS et al., 1998; FRANCO et al, 2001; ONO et al., 2001; GREINERT et al., 2004; SATO et al., 2013). Tanto *Giardia* spp. quanto *Cryptosporidium* spp. são, frequentemente, agentes causais de inúmeros surtos epidêmicos de diarreia ocorridos por contaminação da rede pública de distribuição de água (FISK,1987; RICHARDSON et al., 1991; MACKENZIE et al., 1994, MORRIS et al., 1998), em viajantes que ingeriram água contaminada (GOSTIN et al., 2000), por ingestão de alimentos contaminados

(ROSE e SLIFKO, 1999) e após a utilização de piscinas contaminadas (BELL et al., 1993; McANULTY et al., 1994; MACKENZIE et al., 1995; CDC, 2001; CDC, 2007).

O maior surto de giardiose por veiculação hídrica ocorreu na Noruega entre os anos de 2004 e 2005 acometendo 1500 indivíduos (ROBERTSON et al, 2006); a fonte de contaminação do surto foi a entrada de esgoto doméstico em uma estação de tratamento de água que utilizava apenas a cloração para desinfecção da água, porém sem a etapa de filtração, hoje em dia muito bem estabelecida como crítica para a remoção de protozoários patogênicos.

O primeiro grande surto de criptosporidiose relatado ocorreu em Braun Station, subúrbio de San Antonio, no Estado do Texas, EUA (D'ANTONIO et al., 1985). Em 1988, aproximadamente 100.000 pessoas foram infectadas em Oxford, Reino Unido, apesar do sistema de tratamento da água e os parâmetros usados para atestar sua qualidade estarem sendo rigorosamente seguidos (POULTON et al., 1991; RICHARDSON et al., 1991). Fato similar ocorreu em Milwaukee, EUA, nos meses de março e abril de 1993, quando ocorreu o maior surto epidêmico de criptosporidiose desse país, com 403.000 indivíduos infectados. Foi demonstrado que o Lago Michigan, uma das fontes de abastecimento de água desta região, durante o período da epidemia, apresentava uma concentração de dejetos muito maior do que o normal, indicando uma provável relação entre essa epidemia e a contaminação parasitológica da água que abastecia a cidade (MACKENZIE et al., 1994; EISENBERG et al., 1998; MORRIS et al., 1998). Outros surtos epidêmicos foram relatados em outros países desenvolvidos como Reino Unido, França e Canadá (SMITH et al., 2006).

No Brasil, surtos de veiculação hídrica por protozoários já foram registrados e, embora nenhum surto de *Cryptosporidium* spp. ou *Giardia* spp. por veiculação hídrica tenha sido devidamente registrado, é evidente a vulnerabilidade dos sistemas de distribuição de água

brasileiros e, a real possibilidade de ocorrência de surtos destes protozoários mediante a transmissão hídrica, em função da frequente contaminação dos mananciais por estes patógenos (FRANCO, 2007; SANTOS et al., 2008).

No Brasil, a inclusão da pesquisa de protozoários patogênicos no monitoramento de amostras ambientais está se iniciando (FRANCO et al., 2012). Embora a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (Brasil, 2011) recomende a avaliação da presença dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água destinada ao consumo humano e ressalte a obrigatoriedade de monitoramento dos mananciais de acordo com a concentração de *Escherichia coli*, vários fatores dificultam o atendimento em curto prazo desta recomendação. Entre eles se destacam a complexidade inerente aos métodos de detecção, a carência de recursos humanos qualificados para o trabalho e a escassez de informações disponíveis sobre a ocorrência desses agentes patogênicos nos recursos hídricos nacionais. Hachich et al. (2004) realizaram um levantamento em 28 mananciais do estado de São Paulo, sendo que 5,0% deles foram positivos para *Cryptosporidium* spp. e 31,5% para *Giardia* spp. Franco et al. (2001) detectaram oocistos e cistos destes protozoários em água bruta do rio Atibaia, com concentração de 57,5 cistos e 54,1 oocistos/0,5 litro. Cantusio Neto e Franco (2004) também observaram positividade superior a 90% para cistos de *Giardia* em amostras de água obtidas no ponto de captação da SANASA, no rio Atibaia.

Em função dos múltiplos modos de transmissão, surtos de criptosporidiose e giardiose podem iniciar a partir de uma fonte comum e, em seguida, ter uma propagação contínua através do contato direto pessoa à pessoa dentro de uma comunidade (KATZ et al., 2006). Assim, em 2004, estas enfermidades foram incluídas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), na lista da “Iniciativa das Doenças

Negligenciadas”, pois, juntamente com os vírus e bactérias fazem parte de um complexo grupo que restringem o desenvolvimento e a melhoria socioeconômica, não permitindo que alguns países desenvolvam todo o seu potencial (SAVIOLI et al., 2006).

Embora a contaminação dos recursos hídricos também ocorra por meio da drenagem das pastagens e de adubação orgânica utilizada na agricultura, a avaliação molecular de amostras analisadas de vários surtos de doença de veiculação hídrica tem atribuído ao esgoto doméstico a principal fonte de contaminação dos mananciais (MACPHERSON, 2005; AIYUK et al., 2006).

Segundo Nasser et al. (2012), a contaminação das águas superficiais por *Giardia* spp., em nível mundial, varia de 26 - 43%, sendo que a concentração de cistos observada em diversos estudos realizados variou 0,3 a 100 cistos / L. Com relação ao esgoto bruto, em 25 estudos realizados em 17 países com as mais diversas condições sócio econômicas, 21 (84,6%) apresentaram positividade para *Giardia* spp. com concentrações de cistos que variaram de 0,23 a 100.000 cistos / L) (NASSER et al., 2012). Devido às altas taxas de contaminação do esgoto por *Giardia* spp., o descarte de esgoto não tratado em mananciais que são utilizados como fonte de água para abastecimento público e/ou a aplicação na agricultura podem ser responsáveis por surtos epidêmicos de giardiose colocando toda a população em risco.

Cantusio Neto et al. (2006) avaliaram a eficiência da Estação de Tratamento de Esgoto Samambaia (ETE) do município de Campinas (SP), que possui sistema de lodo ativado, na remoção de cistos *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. e a desinfecção do efluente através da luz UV. Os pesquisadores observaram uma eficiência na remoção de cistos de 98,9 % e 99,7 % de oocistos no efluente quando comparado ao afluente do sistema de lodo ativado e verificaram que a luz UV utilizada na ETE não foi eficaz na inativação de cistos de *Giardia* spp.

Cheng et al. (2009) avaliaram a sobrevivência e o destino de *C. parvum*, *C. hominis* e *G. duodenalis* em quatro ETE da Irlanda que utilizavam sistema de lodos ativados ou biofiltro percolador para o tratamento secundário. A análise do efluente tratado indicou que 97% dos oocistos e cistos foram eliminados com exceção de uma estação de tratamento que alcançou 64% de remoção. Todas as amostras de lodo estavam positivas para *C. parvum*, *C. hominis* e *G. duodenalis* com uma concentração máxima de 20 oocistos e 8 cistos por grama de lodo indicando a necessidade de tratamento adicional de sanitização. Este trabalho demonstrou que os patógenos estão presentes durante todo o processo de tratamento do esgoto e nos produtos finais, podendo alcançar o ambiente aquático com consequente implicação negativa para saúde pública.

Graczyk et al. (2009) analisaram o efluente de uma ETE que utilizava sistema de leitos cultivados com superfície livre (*wetlands*), em pequena escala, usado para o polimento do efluente gerado por um tratamento secundário de esgoto que continha alta concentração de cistos de *G. duodenalis* e esporos do protozoário *Enterocytozoon bieneusi*. O estudo demonstrou que o sistema empregando leitos cultivados não removeu os cistos e os esporos presentes. Assim, grandes volumes de efluente do sistema estudado, quando atingem o corpo hídrico receptor, podem contaminar águas superficiais utilizadas para recreação e abastecimento público.

O tratamento biológico de esgotos reproduz, de certa maneira, os processos naturais que ocorrem em um corpo d'água após o lançamento de despejos. No corpo d'água, a matéria orgânica é convertida em produtos minerais inertes por mecanismos puramente naturais, caracterizando a autodepuração. Em uma estação de tratamento de esgotos os mesmos fenômenos básicos ocorrem a partir da inclusão de tecnologias. A compreensão da microbiologia do tratamento de esgotos é, portanto, essencial para a otimização do projeto e operação dos sistemas de tratamento biológico (SPERLING, 1996).

Nos sistemas de lodos ativados os componentes dos flocos biológicos constituem um microsistema complexo e são representados pelos organismos decompositores e consumidores. Os decompositores incluem as bactérias e os fungos, os quais realizam a depuração da matéria carbonácea e promovem estruturação dos flocos e correspondem a 95% da biomassa. Os consumidores, que formam a microfauna, incluem os flagelados heterotróficos, ciliados, rizópodes e micrometazoários que correspondem a aproximadamente 5% da biomassa (CHEN et al., 2004).

Os componentes da microfauna também têm importante papel na manutenção de uma comunidade bacteriana equilibrada, na remoção de *E. coli*, na redução da demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅) e na floculação. Por serem extremamente sensíveis às alterações no processo, os componentes da microfauna alternam-se no sistema em resposta às mudanças nas condições físico-químicas e ambientais. Assim, a composição da microfauna do lodo ativado revela tendências do processo, tais como: eficiência da remoção da DBO₅; eficiência da remoção de sólidos suspensos (SS); condições de sedimentação do lodo; nível de aeração empregado no sistema; presença de compostos tóxicos (metais pesados e amônia) e ocorrência de sobrecargas orgânicas e de nitrificação (GERARDI, 1986; HOFFMANN e PLATZER, 2000, MADONI, 2003).

A microfauna do lodo ativado pode ser agrupada conforme Jenkins et al.(1993), Madoni (1994), Figueiredo et al (1997) e Bento et al (2000) em (i) ciliados predadores de flocos (*Crawling* ou Rastejantes); (ii) ciliados livres natantes; (iii) ciliados sésseis; (iv) tecamebas; (v) amebas nuas; (vi) zooflagelados, (vii) rotíferos, (viii) nematóides, (ix) anelídeos e (x) tardígrados (Tabela 3). Recentemente Madoni (2011), em seu artigo de revisão sobre protozoários em sistemas biológicos de tratamento de esgoto, classifica os protozoários ciliados que compõem a

microfauna do lodo ativado conforme o modo de alimentação, os quais incluem os ciliados bacterívoros e os ciliados carnívoros.

Tabela 3. Classificação utilizada para agrupar os organismos constituintes da microfauna do lodo ativado quanto ao modo de vida.

Grupos	Classificação	Breve descrição
Ciliados	Ciliados Rastejantes	Organismos livres associados à superfície do floco de lodo de ativado. Possuem corpo dorsoventralmente achatado e cílios ou cirros distribuídos na face ventral da célula em contato com o substrato. Apresentam desenvolvida ciliatura oral, sendo vorazes predadores de bactérias e flagelados. Constitui esse grupo funcional os ciliados pertencentes aos táxons Hypotrichia, Cyrtophorida e Microthoracida.
	Ciliados Livre Natantes	Organismos livres que nadam livremente entre os flocos. Possuem cílios distribuídos regularmente por todo o corpo. Podem ser bacterívoros, predadores de outros ciliados e carnívoros. Constitui esse grupo funcional ciliados pertencentes aos táxons Heterotrichea, Litostomatea (Haptorais), Oligohymenophorea e Karyorelictea.
	Ciliados Sésseis	Organismos sésseis, fixos ao substrato por um pedúnculo, pertencentes às subclasses Peritrichia e Suctoria. Os peritriquesos são bacterívoros, com uma desenvolvida ciliatura oral, podendo ser isolados ou coloniais. Os suctorais são predadores de outros ciliados, desprovidos de cílios, apresentando tentáculos.
Amebas	Tecamebas	Possuem revestimento externo - a carapaça que pode ser secretada pelo citoplasma ou composta por materiais aglutinados na célula.
	Amebas Nusas	Não possuem forma definida e são desprovidas de carapaça ou teca.
Flagelados	Zooflagelados	São flagelados não pigmentados podendo ter de um a vários flagelos. Ingerem matéria sólida ou substâncias orgânicas dissolvidas.
Micrometazoários	Rotíferos, Nematóides, Anelídeos, Tardígrados	Organismos pluricelulares, caracterizados pela diferenciação histológica. Alimentam-se de bactérias e protozoários.

Fonte: Adaptado de Bento et al. (2000) e Madoni et al. (2011).

Os protozoários ciliados são numerosos em todos os tipos de sistema de tratamento biológico aeróbio. Eles são comumente encontrados em sistemas de lodos ativados em densidades aproximadas de 10.000 células / mL e constituem aproximadamente 9% do peso seco de sólidos suspensos na mistura (MADONI, 1994). Mais de 200 espécies de protistas (dos quais 33 flagelados, 25 rizópodes, 6 actinópodes e 160 ciliados) são encontrados nos vários tipos de tratamentos aeróbios. No entanto, menos da metade são observados com frequência (AL-SHAHWANI e HORAN, 1991; AMANN et al., 1998).

Protozoários ciliados estão presentes em todos os tipos de sistemas de tratamento aeróbio e desempenham um papel importante no processo de purificação, estão envolvidos na remoção de matéria orgânica, controlam a densidade da população bacteriana por predação e contribuem para o processo de floculação, sendo então, considerados bons indicadores da qualidade do efluente e da eficiência do processo (MARTIN-CERECEDA et al, 1996; MADONI, 2003; ZHOU et al. 2006; MADONI, 2011). As comunidades de ciliados de estações que utilizam lodos ativados são muito sensíveis às variações ambientais e as alterações nesta comunidade podem afetar a dinâmica das populações desses ecossistemas artificiais, comprometendo assim a eficiência biológica da estação de tratamento de águas residuárias (MADONI, 1994; LEE et al. 2004; CHEN et al. 2004).

A comunidade presente no sistema de lodos ativados é dinâmica e fundamental para o tratamento do esgoto. A composição taxonômica e distribuição das populações de protozoários estão diretamente relacionadas com os tipos de processo de tratamento de efluentes, condições de funcionamento e a qualidade e quantidade de afluentes que alimentam o processo (LEE et al. 2004; LIU et al. 2008). A avaliação microbiológica do lodo é capaz de fornecer informação sobre o desempenho da estação de tratamento de esgoto e também a qualidade do efluente, ou seja,

quando a composição da microfauna do lodo ativado se altera, pode resultar em efluentes de baixa qualidade (SALVADÓ et al., 1995).

O sistema biológico de tratamento de esgoto pelo processo de lodos ativados abriga uma grande diversidade de protozoários. A identificação e o levantamento das espécies de protozoários ciliados ocorrentes em sistemas biológicos de esgoto contribuem para o conhecimento de espécies indicadoras de condições operacionais (SIQUEIRA-CASTRO, 2008).

Muitos estudos têm-se centrado sobre o significado dos protozoários ciliados no lodo ativado de estações de tratamento de águas residuárias (CURDS e COCKBURN, 1970; MADONI e GHETTI, 1981; AL-SHAHWANI e HORAN, 1991; ESTEBAN et al, 1991; MADONI, 1994; ZHOU et al., 2006; TYAGI et al 2008;. SIGNORILE et al 2010;. DUBBER e GRAY, 2011a; MADONI, 2011), porém, estudos sobre a correlação entre a microfauna e tratamento de águas residuais por processos combinados anaeróbios/aeróbios ainda são escassos no mundo (PÉREZ-UZ et al., 2010; DUBBER e GRAY, 2011b).

Os sistemas combinados (anaeróbio/aeróbio) são uma boa alternativa para o tratamento de águas residuárias municipais, pois geram um volume menor de resíduos sólidos, são mais econômicos, produzem efluente de boa qualidade e, além disso, a combinação torna possível a remoção de nitrogênio e, algumas vezes, fósforo (ABREU e ZAIAT, 2008; CHERNICHARO, 2007).

A avaliação da dinâmica populacional de protozoários no lodo ativado de reatores aerados que recebem efluentes de reatores anaeróbios é importante, pois há uma grande possibilidade de se encontrar uma abundância e diversidade de espécies de protozoários distintas das já descritas para lodos ativados de sistemas convencionais, uma vez que grande proporção de moléculas biodegradáveis foi removida na fase anaeróbia.

Ao longo dos anos alguns modelos, baseados nas características biológicas do lodo, foram propostos para a verificação das condições operacionais e a avaliação da eficiência dos sistemas de lodos ativados. Dentre estes, destacam-se o modelo criado por Madoni (1994), por De Marco et al (1991) e Bedgoni et al (1991). De Marco et al (1991) classificaram as estações de tratamento por lodos ativados, baseado na densidade total dos protozoários presentes no tanque de aeração, em três categorias: (a) Sistemas ineficientes: aqueles com aproximadamente 10 protozoários / mL; (b) Sistemas pouco eficientes: aqueles com densidades de 10 a 10^3 protozoários / mL; (c) Sistemas eficientes: aqueles com mais ou 10^3 protozoários / mL.

Segundo Bedgoni (1991), a razão entre a densidade de ciliados predadores de flocos e ciliados fixos está associada à eficiência do tratamento por lodos ativados. Quando a razão é maior ou igual a 0,5, um efluente de melhor qualidade é obtido.

Madoni (1994) correlacionou condições operacionais e os protozoários encontrados nos tanques de aeração de 44 ETE por lodos ativados, após 20 anos de estudos, definindo grupos positivos e negativos relacionados à eficiência depurativa dos sistemas. O autor agrupou os ciliados rastejantes, ciliados sésseis e as tecamebas como positivos e os pequenos flagelados, os ciliados livres natantes, *Vorticella microstoma* e *Opercularia* spp. como negativos. A partir deste estudo, o mesmo autor desenvolveu uma matriz de correlação para obtenção do Índice Biótico do Lodo (IBL) relacionado às características do sistema. A determinação do IBL baseia-se em relações entre os grupos positivos e os negativos, considerando-se a densidade e o número de unidades taxonômicas presentes no reator. A concentração de pequenos flagelados constitui um parâmetro de grande interferência no cálculo do índice. Os valores do IBL correspondem a uma das quatro classes definidas para classificação das características do lodo e da qualidade do efluente (Tabela 4).

Tabela 4. Conversão do Índice Biológico do Lodo (IBL) em quatro classes de qualidade e respectivas características do sistema

Valor do IBL	Classe	Características
8 – 10	I	Sistema bem colonizado com excelente atividade biológica e ótimo desempenho.
6 – 7	II	Lodo estável e bem colonizado, atividade biológica em declínio e bom desempenho.
4 – 5	III	Insuficiente depuração biológica no tanque de aeração e desempenho mediano.
0 – 3	IV	Fraca depuração biológica no tanque de aeração e baixa desempenho.

Fonte: Madoni, 1994.

De acordo com Jenkins et al (1993), Madoni (1994) e Figueiredo et al (1997), um bom desempenho do sistema está diretamente relacionado às espécies dominantes no processo. No Brasil, a maioria dos sistemas de tratamento de esgotos é monitorada e controlada pelas análises físicas e químicas. A observação microscópica ainda é um instrumento raro, geralmente realizada em curtos períodos de tempo e seus resultados são, na grande maioria, subutilizados (BENTO et al., 2005).

Stott e colaboradores (2001), avaliando sistemas biológicos de tratamento de esgoto, verificaram que oocistos de *Cryptosporidium parvum* foram eficientemente ingeridos por protozoários de vida livre. Os maiores índices de ingestão foram observados com *Tetmemena mytilus* e *Paramecium caudatum* que preferencialmente alimentam-se na superfície associados aos flocos biológicos e em suspensão, respectivamente. Estes resultados indicam que a predação por protozoários pode ser um importante fator na remoção de oocistos de afluentes de esgoto.

Devido à grande resistência dos cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. durante o tratamento do esgoto, alterações no desempenho do sistema podem resultar na diminuição da remoção destes protozoários. Dessa forma, evidencia-se a importância de mais

estudos sobre condições operacionais do sistema de tratamento de esgoto e a microfauna do lodo ativado e, por consequência entender os fatores que podem alterar/diminuir a remoção destes parasitos. Contribuindo, assim, para redução do impacto dos efluentes gerados pela ETE no meio ambiente e na saúde pública.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a remoção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. e avaliar a microfauna do sistema combinado aeróbio/ anaeróbio de dois sistemas de tratamento de esgoto.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência de remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., em uma ETE do município de Campinas que utiliza sistema combinado: reator anaeróbio de fluxo ascendente seguido de lodo ativado.

- Avaliar a eficiência de remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., em experimento em escala de bancada utilizando sistema combinado: filtro anaeróbio seguido de biofiltro aerado submerso.

- Analisar a correlação entre as condições operacionais dos sistemas estudados e a eficiência de remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nos diferentes períodos de coleta.

- Realizar a caracterização molecular para identificação dos genótipos/espécies de *Giardia* e *Cryptosporidium*, a partir dos cistos e oocistos recuperados das amostras de lodo da ETE Piçarrão e do sistema em escala de bancada.

- Realizar levantamento de espécies e estudo quantitativo das populações de protozoários de vida livre que prevalecem em sistema de lodo ativado e em biofiltro aerado submerso.

- Avaliar a influência das condições operacionais (parâmetros físicos e químicos) sobre a estrutura da microfauna dos dois sistemas estudados.

- Avaliar a capacidade de protozoários ciliados de vida livre componentes da microfauna em predação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização dos locais de estudo

4.1.2 Estação de Tratamento de Esgoto Piçarrão

A Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Piçarrão do município de Campinas, SP, está localizada na Bacia Hidrográfica do rio Capivari (com gestão do Comitê das Bacias PCJ); a ETE Piçarrão atende aproximadamente 200 mil habitantes, o que corresponde a 19% da população urbana de Campinas. Esta estação recebe apenas esgoto doméstico que é tratado em nível secundário (sem etapa de desinfecção) e o efluente tratado é lançado no ribeirão do Piçarrão (SANASA, 2012).

O ribeirão do Piçarrão, também conhecido como córrego do Piçarrão, é um curso d'água da cidade de Campinas, cujos afluentes localizam-se no interior da cidade, até desaguar no rio Capivari. Sua nascente localiza-se próxima ao Cemitério da Saudade atravessando uma área altamente urbanizada em seu alto e médio cursos, para depois passar por áreas de urbanização mais recente nas partes mais próximas à foz. Na área do Piçarrão estão 23 bairros, dentre eles, Swift, Vila Marieta, Parque Prado, São Bernardo, Vila Teixeira, Campos Elíseos e Jardim Florence e vivem cerca de 200.000 habitantes. A ETE Piçarrão contribui para o tratamento de 23% do esgoto de Campinas.

O sistema de tratamento adotado na ETE Piçarrão (Figura 2) é de Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente (RAFA) seguido de Lodos Ativado Convencional. É constituída pelas seguintes unidades: -Estação elevatória de esgoto bruto, com duas grades grosseiras mecanizadas; -Tratamento preliminar composto por duas grades finas mecanizadas, - uma calha Parshall para a

medição de vazão do esgoto bruto e duas caixas de areia mecanizadas; - 32 reatores (quatro módulos de oito reatores), com sistema de queima de gases e quatro sistemas de controle de odores; - Sistema de Lodos Ativados, formado por três tanques de aeração com ar difuso, casa de sopradores que fornece ar comprimido aos tanques de aeração, - três flotores, - quatro elevatórias de recirculação de lodo, - casa de saturadores para fornecer a mistura (água e ar), polímero para os flotores, e - uma elevatória de lodo excedente; - Sistema de pós-aeração formado por uma calha Parshall para a medição da vazão do efluente final, seguido de - uma escada hidráulica para a aeração do efluente que posteriormente é lançado no córrego Piçarrão; - Casa de desidratação para desidratar o lodo excedente produzido pela ETE, antes de seu envio para a disposição final (SANASA, 2012).

O córrego Piçarrão que recebe o efluente da ETE deságua no rio Capivari que é de grande importância para Campinas, pois esse rio abastece 82 bairros do município, que abrigam cerca de 90 mil pessoas (SANASA, 2012).

4.1.3 Sistema combinado de tratamento de esgoto em escala de bancada.

Para os experimentos em escala de bancada foi utilizado um sistema já existente, construído por Foco (2010), no Laboratório de Protótipos Aplicados ao Tratamento de Águas e Efluentes (LABPRO) em parceria com o Laboratório de Saneamento (LABSAN) da Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo (FEC), ambos pertencentes ao Departamento de Saneamento e Ambiente (DSA) /FEC/UNICAMP.

O sistema construído visava à remoção de nitrogênio total, por meio da recirculação do efluente nitrificado em sistema aeróbio (FOCO, 2010) e incluía dois reatores de leito fixo: filtro

anaeróbio (FA) seguido por biofiltro aeróbio submerso (BAS), ambos com fluxo ascendente, e decantador (DEC).

Os reatores foram confeccionados com barriletes de PVC com altura de 0,40 m e diâmetros de 0,4 e 0,3 m, conferindo volume útil de 32,6 e 17,6 L, respectivamente para o FA e BAS. Ambos os reatores utilizaram eletroduto corrugado de PVC como meio suporte, com 25,4 mm de diâmetro, 15,0 mm de comprimento e índice de vazios de $93,2 \pm 0,28\%$. Os reatores apresentavam fundo falso para melhor distribuição do afluente e suporte ao material de preenchimento, e no caso do BAS a fixação da membrana difusora de microbolhas de ar em seu interior, conectado a um compressor de ar, com vazão e pressão reguladas por rotâmetro e filtro regulador (FOCO, 2010) (Figura 1).

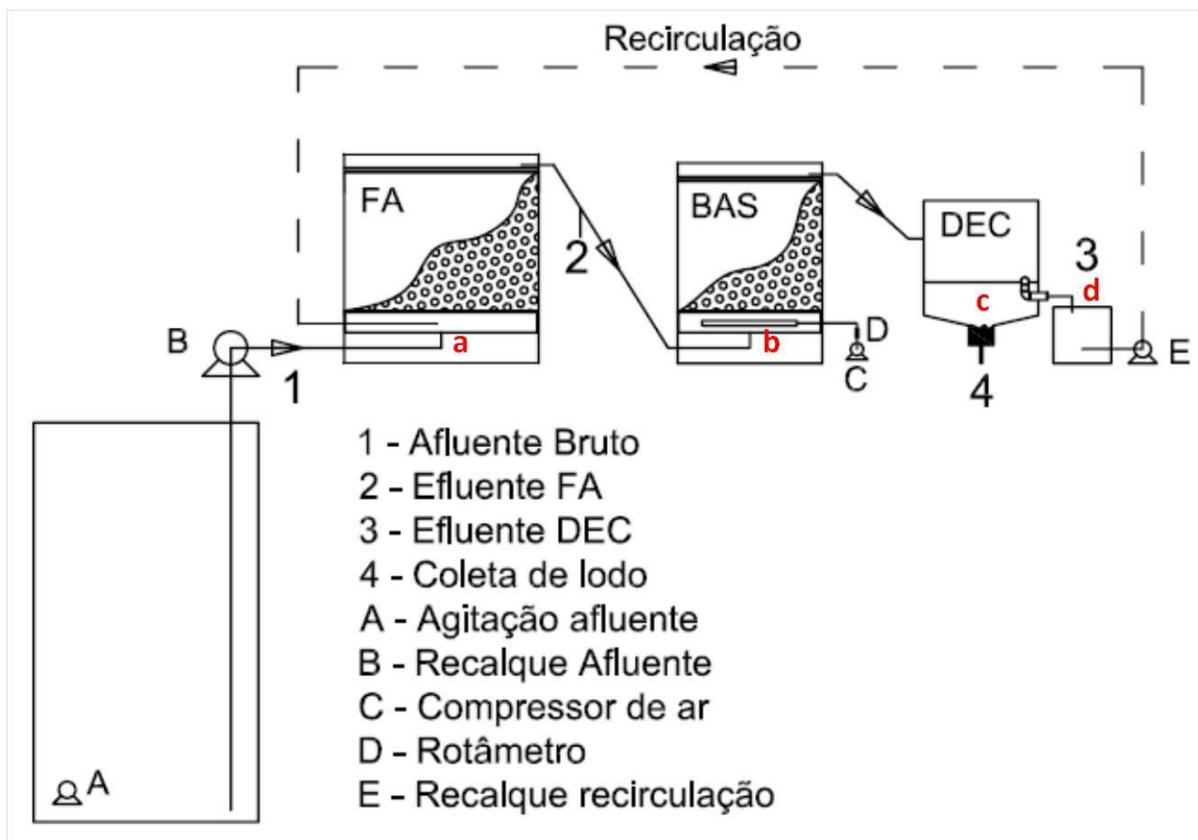


Figura 1. Esquema espacial do sistema combinado em escala de bancada: filtro anaeróbio (FA) seguido de biofiltro aerado submerso (BAS), com os respectivos pontos de amostragem para as análises parasitológicas (a = lodo do FA, b = lodo do BAS, c = lodo do decantador - DEC, d = efluente tratado) (adaptado de FOCO, 2010).

Neste sistema, a maior parte dos flocos biológicos permanece aderida a um meio suporte, presente no biofiltro aeróbio submerso (BAS), e parte dos flocos encontram-se nos espaços entre o meio suporte.

O esgoto sanitário empregado no sistema provinha de uma região da Cidade Universitária Zeferino Vaz, onde estão situados hospital, bancos, restaurantes, uma creche e uma escola, na qual circulam aproximadamente 10 mil pessoas diariamente.

O esgoto afluente era recalcado, a partir de uma caixa de passagem da rede de coleta e transporte localizada no terreno do Laboratório de Protótipos Aplicados ao Tratamento de Águas

e Efluentes (LABPRO), para um sistema de caixas de distribuição o que conferia qualidades comparáveis a um pré-tratamento.

O equilíbrio dinâmico do sistema foi atingido após 38 dias de operação. A partir deste momento, operou-se o sistema em seis etapas apresentadas na Tabela 5. Primeiramente, estudou-se o início de operação do sistema combinado (SC), visando verificar comportamento do sistema com relação aos aspectos operacionais, principalmente em relação às variáveis que indicavam a formação de uma biomassa ativa no filtro anaeróbio (FA). Posteriormente, avaliou-se a capacidade do sistema em degradar matéria orgânica e converter nitrogênio amoniacal em nitrito e nitrato. Por último, o sistema foi operado sem e com recirculação de efluente nitrificado do BAS, para o início do sistema (entrada do FA), visando promover a desnitrificação e consequente remoção de nitrogênio, onde se pretendia utilizar como fonte de carbono para este processo os ácidos orgânicos voláteis de fácil degradação (AOV) presentes no reator anaeróbio.

Tabela 5. Características operacionais de cada uma das etapas de operação do sistema em escala de bancada.

Etapa	Tempo de operação (dias)	Período de operação (dias)	Q (L/h)	R (q/Q)	TDH (h)		
					FA	BAS	SC
1	83	208 a 291	3,62	-	9,0	4,9	13,9
2	60	292 a 352	2,70	-	12,1	6,5	18,6
3	56	353 a 409	2,70	0,5	12,1	6,5	18,6
4	84	416 a 500		0,5	15	8,1	23,2
5	84	507 a 591	2,17	1,0	15	8,1	23,2
6	70	598 a 668		1,5	15	8,1	23,2

Q = vazão; q = vazão de recirculação; R = taxa de recirculação; TDH = tempo de detenção hidráulica.

4.2 Investigação da presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e avaliação da remoção de cistos e oocistos.

Para avaliação da eficiência de remoção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na ETE Piçarrão, as amostras foram colhidas de acordo com o tempo de detenção hidráulica da ETE de aproximadamente 22 horas. Assim, a primeira amostra (P1) trata-se do esgoto bruto que chegava à ETE ao meio dia (1 L); a segunda amostra, o efluente do RAFA (P2a) (5 L), o qual era coletado a 1 hora da manhã ao mesmo tempo em que era realizada a coleta do lodo do RAFA (P2b) (1 L). A terceira amostra, o lodo recirculado do tanque de aeração (P3) (1 L) que era coletado às 10 horas da manhã e em seguida era realizada a tomada do efluente tratado (P4) (5 L). O lodo condicionado (P5) é uma mistura do lodo excedente do tratamento anaeróbio somado ao lodo excedente do tratamento aeróbio digerido. Assim, o lodo condicionado analisado (1 L) era resultado de vários descartes de lodo excedente do sistema não correspondendo ao esgoto de um único dia (Figura 2). As análises foram realizadas mensalmente durante um período de 24 meses.

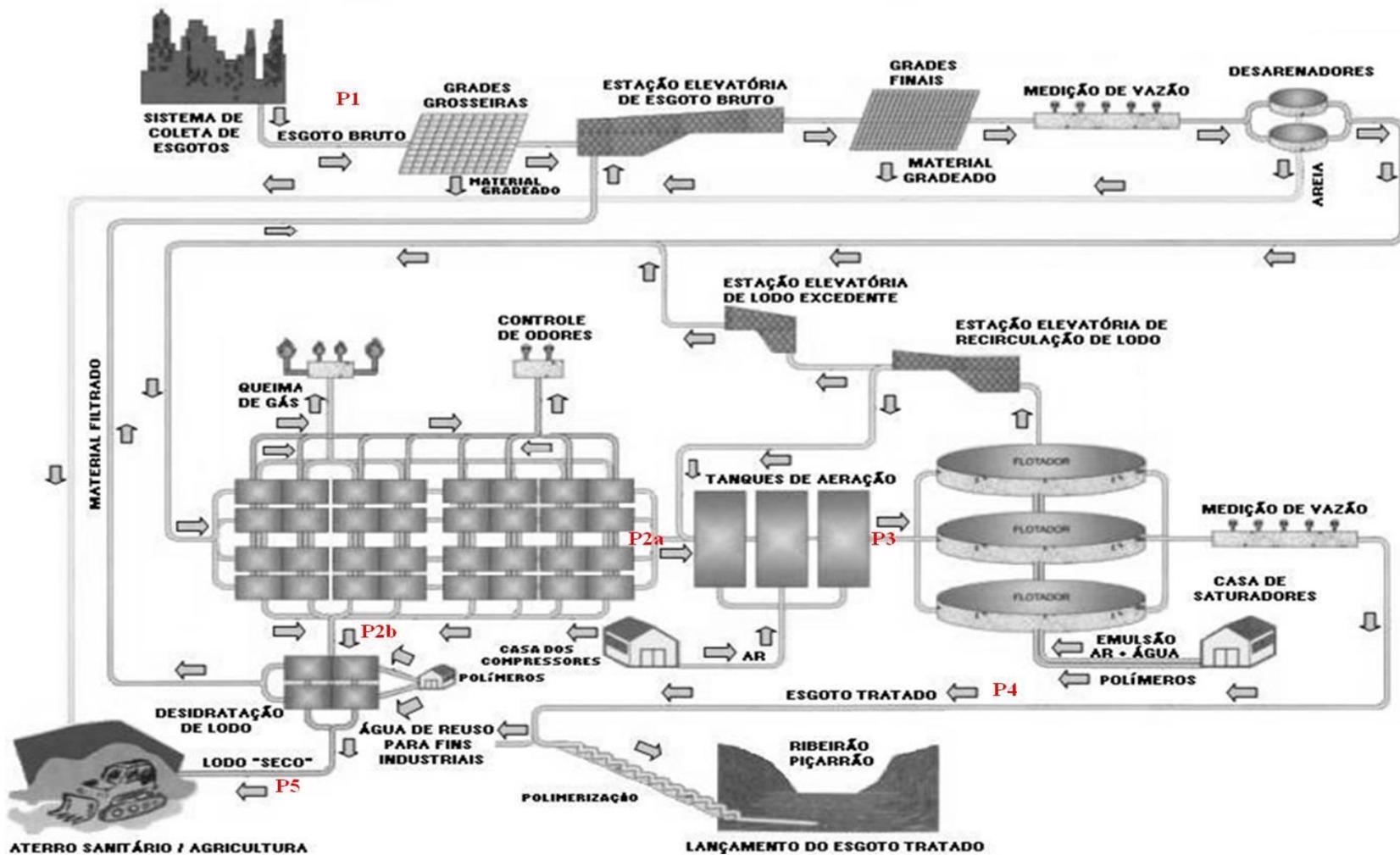


Figura 2. Esquema espacial da ETE Piçarrão, com os respectivos pontos de amostragem: P1 = esgoto bruto; P2a = efluente RAFA; P2b = lodo RAFA; P3 = lodo do tanque de aeração; P4 = efluente tratado; P5 = lodo condicionado (fonte: SANASA)

As amostras permaneciam refrigeradas na ETE até serem transportadas, no mesmo dia após a coleta da última amostra, para o Laboratório de Protozoologia do Instituto de Biologia, UNICAMP em caixas térmicas refrigeradas para a realização das análises parasitológicas.

Para a pesquisa de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., as amostras de esgoto bruto, lodo do RAFA, lodo recirculado do tratamento aeróbio (lodos ativados) e lodo condicionado foram concentradas de acordo com protocolo modificado de Robertson et al. (2000) e adaptado por Cantusio Neto et al. (2006). Em tubos de centrífuga de 15 mL foram colocados 5 mL de amostra previamente filtrada em peneira de 1 mm² e completado com 10 mL de solução de eluição contendo Tween 80 a 0,1% (1:3). A seguir, foram centrifugados a 1.500 x g durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento final transferido para microtubos e mantido a 4°C por até 72 horas até confecção da lâmina de imunofluorescência.

As amostras de efluente tratado e efluente do RAFA foram concentradas conforme protocolo modificado de Franco et al. (2001). As amostras foram previamente filtradas em papel filtro para remoção das partículas maiores, em seguida, filtradas em membranas de ésteres de celulose com 47 mm de diâmetro e porosidade de 3 µm (Milipore®), através de um sistema de filtração com bomba e porta filtro (Gelman®). Após a filtração as membranas foram cuidadosamente retiradas e colocadas em placas plásticas estéreis para realizar a recuperação de cistos e oocistos se estiverem presentes na amostra. A superfície das membranas foi raspada por 20 minutos com alça plástica seguida de lavagens manuais com solução de Tween 80 a 0,1 %. O líquido resultante das lavagens foi concentrado por meio de centrifugação (1.050 x g, 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado em água destilada e centrifugado novamente. O precipitado foi armazenado a 4°C por até 72 horas até confecção da lâmina de

imunofluorescência.

A pesquisa dos cistos e oocistos nas amostras concentradas foi realizada através da reação de imunofluorescência direta (RID) conforme as instruções do fabricante do Kit diagnóstico (Merifluor® - Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio). Para a confirmação morfológica dos cistos e oocistos foi utilizado o corante vital DAPI na diluição 1:2500 nas mesmas amostras submetidas a RID e a observação por meio do contraste interferencial diferencial (DIC). A visualização da RID foi feita através de microscópio de epifluorescência com filtro de excitação de 450 a 490 nm e filtro de barreira de 520 nm e a visualização dos protozoários marcados com DAPI com filtro de excitação 365 a 400 nm e um filtro de barreira de 395 nm.

Após a enumeração dos cistos e oocistos presentes nas amostras, o cálculo da estimativa do número de cistos e oocistos / L para cada amostra foi feita com base na fórmula:

$$X = \frac{n}{K} \times \frac{S}{A}$$

X: concentração de oocistos ou cistos / L

n: número de oocistos ou cistos visualizados na lâmina

K: volume de sedimento analisado (μ L)

S: volume do sedimento obtido (μ L)

A: volume filtrado da amostra (L)

Para o estudo da remoção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no sistema combinado, em escala de bancada, foram realizadas análises durante 20 meses em amostras de lodo coletadas do fundo falso do Filtro Anaeróbio, Biofiltro Aerado Submerso, Decantador e amostra de efluente tratado. As amostras de lodo foram processadas de acordo com

protocolo modificado de Robertson et al. (2000) e adaptado por Cantusio Neto et al. (2006) conforme já descrito anteriormente. As amostras de efluente foram concentradas conforme protocolo modificado de Franco et al. (2001).

4.3 Análises físicas e químicas

As amostras para as análises físicas e químicas da ETE Piçarrão colhidas no mesmo dia das coletas para as análises parasitológicas e foram realizadas pela Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento de Campinas, SP (SANASA). Os seguintes parâmetros foram avaliados: pH, Temperatura, Oxigênio Dissolvido, Turbidez, Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅), Demanda Química de oxigênio (DQO), Fosfato Total, Nitrogênio Kjeldahl Total, Nitrogênio Nitrito (N-NO₂), Nitrogênio Nitrato (N-NO₃), Óleos e Graxas, Alcalinidade Total, Sólidos Totais, Sólidos Totais Fixos, Sólidos Totais Voláteis, Sólidos Dissolvidos Totais, Sólidos Dissolvidos Fixos, Sólidos Dissolvidos Voláteis, Sólidos Suspensos Totais, Sólidos Suspensos Fixos, Sólidos Suspensos Voláteis, Sólidos Sedimentáveis, Sulfato e Sulfeto. As análises parasitológicas e físicas e químicas foram realizadas mensalmente durante um período de 24 meses.

As análises físicas e químicas do sistema combinado em escala de bancada foram realizadas no Laboratório de Saneamento (LABSAN) e os seguintes parâmetros foram analisados: pH, Temperatura, Oxigênio Dissolvido, Alcalinidade Parcial, Ácidos Orgânicos Voláteis, Alcalinidade Total, Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅), Demanda Química de oxigênio (DQO), Nitrogênio Kjeldahl Total, Nitrogênio Amoniacal, Nitrogênio Nitrato, Nitrogênio Nitrito, Sólidos Suspensos Totais, Sólidos Suspensos Fixos e Sólidos Suspensos Voláteis. As análises foram realizadas conforme o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th* (APHA, et al., 1998). Para a análise da alcalinidade foi utilizado o

método analítico descrito por Ripley et al. (1986) e para a análise de ácidos orgânicos voláteis a proposta por Dilallo (1961).

4.4 Caracterização molecular de *Giardia* e *Cryptosporidium*

4.4.1 *Giardia* spp.

A caracterização molecular de *Giardia* spp. foi efetuada em todas as amostras positivas, por meio da RID, após a etapa da centrifugação em solução de Tween 80 a 0,1%. Para a ETE Piçarrão utilizou-se amostras positivas do lodo do RAFA (P2b) e para o sistema de tratamento combinado em escala de bancada utilizou-se amostras positivas do filtro anaeróbio (FA). As análises moleculares foram realizadas em parceria com o laboratório de Análise Genética e Molecular, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP.

Extração do DNA genômico

A extração do material genético do protozoário foi conduzida mediante utilização de kit comercial (kit ZR Fungal/Bacterial DNA Kit – Zymo Research[®]) de acordo com as instruções do fabricante. Ao final da extração, aproximadamente 100 µl de DNA foram obtidos e prontamente armazenados a -20 °C.

Caracterização Molecular baseado nas Assembleias Genéticas Através de Fragmento de 530pb do Gene *tpi*

Para a identificação da assembleia genética presente em cada amostra, foi realizada *nested*-PCR de forma a aumentar o número de cópias amplificadas conforme Sulaiman et al. (2003).

Para a primeira PCR foram utilizados os iniciadores AL3543 (5'-AAATIATGCCTGCTCGTCCG-3') e AL3546 (5'-CAAACCTTITCCGCAAACC-3') que amplificam um fragmento de 605pb.

Para a segunda PCR, foram utilizados os iniciadores AL3544 (5'-CCCTTCATCGGIGGTAACCTT-3') e AL3545 (5'-GTGGCCACCACICCCGTGCC-3') que amplificam uma região de 530pb do gene *tpi*. Em cada reação, foram utilizados 1x PCR *Buffer* (Invitrogen), 5pmol de cada *primer*, 3mM MgCl₂, 0,2mM dNTP's, 5 unidades de Taq Polymerase Platinum (Invitrogen) e 2µl de DNA molde. O volume final de reação foi 25µl. As reações foram realizadas em um termociclador MJ PTC 100 – MJ Research INC® e as condições de amplificação foram 96°C por 2 min sendo seguido por 36 ciclos de 96°C por 20s, 59°C por 20s e 72°C por 30s. A extensão final foi realizada sob 72°C por 7 minutos.

Os produtos amplificados da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 3,0% (UltraPure Agarose - Invitrogen®) com aplicação de 3µl de DNA, corado com brometo de etídeo e visualizados por luz UV usando fotodocumentador Gene Genius Bio Imaging System Syngene.

Após a confirmação das bandas em gel de agarose, os produtos de amplificação das amostras positivas foram purificados com o kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE® Health care, UK). Após a purificação, foi realizada a reação de sequenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit® v.3.1 (Applied Biosystems). Os produtos da reação de sequenciamento foram novamente purificados e em seguida foram sequenciados em um sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems). Cada amostra foi sequenciada em duplicata, utilizando os iniciadores direto e reverso. As sequências foram editadas utilizando o software Phred-Phrap (EWING et al, 1998) a partir de um servidor local. Nesse software, as quatro fitas foram utilizadas para gerar a sequência consenso.

Foram obtidas sequências de referências no Genbank (tabela 6) de cada uma das sete assembleias genéticas de *Giardia duodenalis*, bem como sequências de outras espécies de *Giardia*. As amostras foram alinhadas com o software Clustal X (THOMPSON et al, 1994) através de alinhamento global.

Tabela 6. Sequências de referência utilizadas para o gene *tpi* obtidas do Genbank

	Referência GenBank
<i>G. duodenalis</i> - Assembleia AI	L02120.1
<i>G. duodenalis</i> - Assembleia AII	U57897.1
<i>G. duodenalis</i> - Assembleia AIII	DQ650648.1
<i>G. duodenalis</i> - Assembleia BIII	AY228628.1
<i>G. duodenalis</i> - Assembleia BIV	L02116.1
<i>G. duodenalis</i> - Assembleia C	AY228641.1
<i>G. duodenalis</i> - Assembleia D	DQ246216.1
<i>G. duodenalis</i> - Assembleia E	AY655705.1
<i>G. duodenalis</i> - Assembleia F	AF069558.1
<i>G. duodenalis</i> - Assembleia G	AF069562.1
<i>G. ardeae</i>	AF069564.1
<i>G. microti</i>	AY228649.1
<i>G. muris</i>	AF069565.1

A determinação do modelo de substituição de nucleotídeos foi implementada através do software *jModel test* (POSADA, 2001) utilizando os dados obtidos pelo sequenciamento dos fragmentos do gene *tpi*, bem como suas sequências de referências. Foi realizada análise filogenética com o software MEGA v5.05 para caracterização e identificação dos genótipos.

4.4.2 *Cryptosporidium* spp.

Todas as amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. foram caracterizadas molecularmente. As análises foram realizadas com e sem separação imunomagnética (IMS) previamente à extração do DNA genômico. A purificação por separação

imunomagnética (IMS) foi realizada para a remoção de partículas e eventual presença de inibidores nas amostras analisadas. O procedimento de IMS foi realizado de acordo com as instruções do fabricante utilizando-se o kit Dynabeads anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* (DynaL® Biotech Oslo, Norway).

As amostras 1, 2, 3 e 4 da ETE Piçarrão, 5 e 6 do sistema em escala de bancada tratando esgoto hospitalar, após a concentração prévia por centrifugação, foram subdivididas em duas alíquotas: a primeira foi previamente purificada por meio da separação imunomagnética, e as amostras 1a, 2a, 3a, 4a, 5a e 6a foram concentradas apenas por centrifugação.

Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico dos oocistos de *Cryptosporidium* foi utilizado o kit comercial *QIAamp DNA Stool Mini*® (Qiagen, Germany) de acordo com as instruções do fabricante com modificações no tempo de aquecimento com tampão de lise, realizado a 95°C por 10 min. para todas as amostras. Os produtos das extrações foram armazenados em freezer -20°C quando a PCR não era realizada em seguida da extração.

Amplificação do DNA pela reação em Cadeia pela Polimerase Dupla (Nestled-PCR)

Todo procedimento foi realizado em fluxo para evitar contaminação e com reagentes novos. Para a detecção molecular da presença de *Cryptosporidium* spp. nas amostras ambientais foram realizadas amplificações do gene da região *18S rRNA* comum a todas as espécies. Na primeira reação de PCR foram utilizados os iniciadores externos, SCL1- direto e o

CPB-DIAGR – reverso descritos por COUPE et al. 2005, amplificando um fragmento de aproximadamente 1035 pares de bases.

Para a segunda etapa da PCR utilizou-se o produto amplificado com diluições na razão 1:10, 1:100 e 1:1000 visando melhorar a concentração do material amplificado e o preparo do material para o sequenciamento direto das amostras positivas para presença de *Cryptosporidium* spp. Foram utilizados os seguintes iniciadores internos: 826 *SSU* rRNA direto e reverso descritos por XIAO et al. (2000) amplificando um fragmento de 826pb aproximadamente.

Os iniciadores utilizados na reação de *nested*-PCR estão representados na Tabela 7.

Tabela 7. Lista de iniciadores empregados para amplificação do fragmento 18S rRNA de *Cryptosporidium*.

Primers	Sequência	Posição	Banda
SCL1F	5'- CTG.GTT.GAT.CCT.GCC.AGT.AG - 3'	4 - 23	~1035 pb (COUPEET al., 2005)
CPB-DIAGR	5'- TAA.GGT.GCT.GAA.GGA.GTA.AGG - 3'	1016-1036	
SSU F	5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG -3'	171 - 196	~826 - 864 bp (XIAO et al., 2000)
SSU R	5'- AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A - 3'	1006- 985	

A PCR foi realizada em cinco réplicas para cada amostra, padronizada com volume final de 25 µL cada, contendo: 5µl de DNA, 12,5 µl de água ultra pura Milli Q q.s.p, 5µl de tampão 5X (contendo 1,5 mM de MgCl₂), 1,0 µl de polivinilpirrolidona (PVP) 1%, 0,2 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Fermentas), 0,3 µM de cada iniciador (*Bioneer Oligo Synthesis Report*) e 1,25U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega).

As reações foram incubadas em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf®), como segue: 1 ciclo para desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 40 ciclos compostos de desnaturação a 94°C por 45 segundos; emparelhamento a 60°C por 45 segundos; extensão a 72°C por 90 segundos e finalmente 1 ciclo para extensão final 72°C por 10 minutos. Após a reação, as amostras eram mantidas a 4°C até serem retiradas do termociclador.

Os produtos da primeira reação de PCR (as cinco réplicas) foram então transferidos para um único tubo novo e para a segunda etapa da PCR utilizou-se 2 µL do produto amplificado com os seguintes iniciadores internos: 826 *SSU* direto e reverso descritos por XIAO et al. (2000) amplificando um fragmento de 826pb.

Para esta reação foi realizada uma mistura de PCR (“master mix”) com volume final de 25 µl contendo 2 µl de produto amplificado (amplicon), água ultra pura Milli Q q.s.p, 5µl de tampão 5X (contendo 1,5 mM de MgCl₂), 0,2 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,3 µM de cada iniciador, 1,25 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega).

As condições para amplificação final do produto são as mesmas da anterior, à exceção da desnaturação a 94°C por 30 segundos e emparelhamento a 58°C por 45 segundos. Os produtos da segunda reação de PCR (*Nested*) foram purificados com o kit Ilustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE® Health care, UK).

Eletroforese em gel de agarose

A cada tubo contendo o produto amplificado foi adicionado 5 µl de tampão carregador de amostra (glicerina + azul de bromofenol). Dez microlitros desta mistura foram aplicados em cada poço do gel de agarose 1,2% (Amersham Biosciences) corado com 5,0 µl de Brometo de etídio e imerso em Tampão Tris – Acetato - EDTA (TAE) 1X. Dois microlitros de marcador de peso

molecular (100bp Plus MassRuler™ DNA Ladder, Ferrmentas) foram utilizados. A corrida foi padronizada em uma hora a 6 v/cm.

O gel foi visualizado em fonte de luz ultravioleta de 302 nm em transiluminador e fotodocumentado. A imagem foi capturada através do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e o software Labworks (UVP).

Sequenciamento

As amostras foram enviadas à empresa *Genomic Engenharia Molecular*, para o sequenciamento que resultou em sequências perfeitamente utilizáveis. As sequências obtidas nas amostras 1a, 2a, 3a, 4a, 5a e 6a, positivas para o fragmento 826pb, foram alinhadas e submetidas ao sistema BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*) para comparação com sequências homólogas disponíveis de *Cryptosporidium* no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

A Análise Filogenética foi realizada através do programa Mega 5 (http://www.megasoftware.net/m_test_reliab.html). O histórico evolutivo foi inferido utilizando o método *Neighbor-Joining* (SAITOU e NEI, 1987). A árvore ideal foi representada com a soma do comprimento do ramo = 0.08495092. A porcentagem de árvores replicadas em que os táxons associados ficaram no mesmo *cluster* no teste de *bootstrap* (1000 réplicas) está demonstrada próxima aos ramos (FELSENSTEIN, 1989). A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de ramificação nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método da Máxima Verossimilhança (TAMURA, 2011) e estão em unidades do número de substituições de bases por sítio. A análise envolveu 24 sequências de nucleotídeos. Todas as posições que contêm *gaps* e dados faltantes foram eliminadas. Houve um total de 723 posições no conjunto de

dados final. As análises evolutivas foram realizadas pelo software MEGA 5 (TAMURA, 2011). As análises moleculares foram realizadas em parceria com a Dra. Maria Helena Matté (Faculdade de Saúde Pública, USP).

4.5 Avaliação da microfauna

Para as análises quantitativas e qualitativas da microfauna do lodo ativado foram coletadas amostras de 50 mL do líquido sob aeração do biofiltro aerado submerso do sistema em escala de bancada e 1000 mL dos dois tanques de aeração da ETE Piçarrão.

A partir destas amostras foi realizado: (i) a quantificação dos organismos *in vivo* no dia da coleta, (ii) a fixação dos protozoários ciliados e (iii) o cultivo dos ciliados para posterior realização de técnicas ciliatológicas de identificação.

A análise quantitativa dos micrometazoários e dos protozoários foi realizada em câmara de Sedgwick-Rafter utilizando microscópio ótico no aumento de 200 X (CETESB, 2009). Esta câmara tem formato retangular (50 x 20 mm), com 1 mm de profundidade, área de 1000 mm², volume útil de 1 mL e com 1000 subdivisões, cada uma com área de 1 mm². Após a homogeneização da amostra, uma alíquota de 1 mL de lodo ativado foi diluída (1:4) em água envasada e, com auxílio de uma pipeta, 1 mL dessa diluição foi utilizado para preencher lentamente a câmara de quantificação. A contagem foi feita em 100 campos, distribuídos aleatoriamente na câmara.

Para o cálculo do número de microrganismos / mL foi aplicada a fórmula:

$$\text{Número de microrganismos / mL} = \frac{C \times 1.000 \text{ mm}^3 / \text{mL} \times \text{fator de diluição}}{A \times D \times F}$$

Onde,

C = número de microrganismos contados; A = área de um campo em mm²;

D = profundidade da câmara; F = número de campos contados

Para as análises qualitativas, alíquotas das amostras foram (i) analisadas *in vivo* em placas de Petri sob microscópio estereoscópico, onde os espécimes foram triados e observados em microscopia de contraste interferencial diferencial (DIC), possibilitando a identificação preliminar e, (ii) distribuídas em placas de Petri, onde foram mantidas em culturas simples, em temperatura ambiente, adicionando-se grãos de arroz integral macerados para promover o crescimento de populações bacterianas que servem de alimento inicial para os ciliados. O cultivo maximiza o número populacional das espécies, possibilitando a realização de técnicas de microscopia óptica empregadas na identificação das espécies (FOISSNER et al., 2002).

Os organismos foram triados das culturas sob microscópio estereoscópico Stereo Discovery.V8 Zeiss com o uso de micropipetas de fabricação própria, isolados em lâminas para serem observados *in vivo* por meio da microscopia óptica de contraste interferencial diferencial (DIC). Essa técnica possibilita evidenciar características de importante valor taxonômico e que normalmente se perdem ou alteram-se após a fixação do material tais como: coloração do citoplasma e grânulos corticais, extrussoma, cristas e sulcos ectoplasmáticos, morfologia e posicionamento do(s) vacúolo(s) contrátil (eis), comprimento dos cílios e das membranas

ondulantes, das membranelas adorais e dos elementos da ciliatura somática (BERGER, 1999; FOISSNER et al., 2002).

Aspectos morfológicos dos protozoários ciliados *in vivo* foram observados e fotodocumentados por meio de câmera digital científica colorida, modelo AxioCam MRC – Zeiss, acoplada ao microscópio Axio Imager. A observação dos ciliados *in vivo* é de grande importância taxonômica na classificação dos gêneros e espécies (FOISSNER e BERGER, 1996).

Os protozoários ciliados foram triados a partir das amostras frescas ou das culturas, isolados em “*embryo dish*” para fixação em Boiun aquoso e, posteriormente, os ciliados foram impregnados com proteínato de prata segundo o protocolo proposto por Dieckmann (1995).

Para identificação dos protozoários ciliados foram realizadas medições e observados aspectos detalhados do córtex, da infraciliatura e do aparelho nuclear evidenciados pelo protargol e as informações foram comparadas com guias de identificação (BERGER, 1999, 2006, 2011; FOISSNER et al., 1991, 1992, 1994, 1995, 2002; LYNN & SMALL, 2002; SERRANO et al., 2008), além de literatura complementar. Os micrometazoários foram identificados conforme as características morfológicas descritas por Jenkins et al. (1993) e Patterson (1996). Os cálculos da frequência, abundância mínima, média e máxima foram realizados conforme Bush et al. (1997). O cálculo do Índice Biótico do Lodo foi realizado conforme Madoni (1994).

4.6 Avaliação do potencial predatório de ciliados componentes da microfauna.

Para o experimento de indicação do potencial predatório foram isoladas espécies de ciliados ocorrentes no dia da coleta e aquelas espécies crípticas que se mantiveram em condições de cultivo. Os protozoários ciliados mais frequentes no lodo ativado foram isolados e mantidos em meio de cultivo preparado em tubos de ensaio de 150 mm, contendo ágar a 2%, inclinado, um

grão de arroz integral estéril e 10 mL de uma suspensão bacteriana de *Enterobacter aerogenes*. Os protozoários inoculados nos tubos de cultivo foram monitorados, através da observação em microscópio estereoscópico, durante os dias subsequentes para se avaliar o crescimento dos mesmos. Algumas espécies de ciliados não se mantiveram em culturas puras, e estas foram mantidas em culturas mistas, contendo várias espécies de outros protozoários e micrometazoários.

As espécies testadas foram *Aspidisca cicada*, *Blepharisma sinuosum*, *Epistilys plicatilis*, *Euplotes aediculatus*, *Gastronauta aloisi*, *Sterkiella cavicola* e *Vorticella convallaria*. Estas espécies foram escolhidas, pois foram as mais frequentes ao longo do estudo, se mantiveram bem em condições de cultivo, são espécies bacterívoras e suspensívoras e vivem associadas ao floco de lodo. Estas duas últimas características proporcionariam maior chance de contato entre os ciliados e os cistos e oocistos que tendem a ficar associados ao floco de lodo ativado.

Para a realização dos experimentos foram isolados 10 espécimes de cada espécie de protozoários ciliados presentes em amostras recém colhidas do lodo ativado ou mantidos em culturas e, cistos e oocistos previamente marcados com o anticorpo monoclonal ligado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), enumerados e preparados à densidade final de $1 \text{ a } 3 \times 10^6$ oocistos ou cistos/ml conforme STOTT et al. (2001).

Inicialmente os cistos e oocistos foram marcados com anticorpo monoclonal do Kit Merifluor. Uma suspensão concentrada de cistos e oocistos com aproximadamente 10.000 cistos e oocistos / mL foi centrifugada durante 10 minutos a $1050 \times g$ e o sobrenadante foi descartado. Ao microtubo contendo aproximadamente 10.000 cistos e oocistos (100 μL) foram adicionadas 4 gotas do anticorpo do kit MeriFluor®. A amostra permaneceu incubando por 30 minutos na

ausência de luz (envolto em papel alumínio). Após este período, foram adicionados 500 µl de tampão fosfato salino (PBS) e a amostra foi agitada vigorosamente por 10 segundos. Posteriormente foi centrifugada durante 10 minutos a 1050 x g. O sobrenadante foi desprezado e repetiu-se a lavagem dos cistos e oocistos por mais 3 vezes. Ao final a amostra foi ressuspensa em 500 µl solução PBS e os cistos e oocistos foram enumerados.

Após a marcação foram adicionados 5 µL da suspensão de cistos e oocistos (equivalente a 3.000 cistos e oocistos) em uma lâmina de imunofluorescência. Na mesma lâmina foram colocados 10 espécimes de ciliados previamente triados e mantidos em “*embryo dish*” contendo apenas água mineral por cerca de 30 minutos antes da incubação com os cistos e oocistos. A lâmina foi coberta com lamínula e vaselina nas extremidades para evitar a compressão dos ciliados e, mantida em placa de Petri coberta com papel alumínio para evitar a exposição à luz a fim de evitar a perda da fluorescência.

Após cinco minutos a lâmina foi levada ao microscópio de epifluorescência para visualização dos cistos e oocistos, e utilizando o campo claro concomitantemente foi possível observar, fotografar e filmar durante os tempos de exposição o comportamento dos protozoários ciliados frente a formas patogênicas dos protozoários parasitos. O tempo máximo de exposição dos protozoários ciliados aos cistos e oocistos foi de 60 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7 Análise estatística

Para a análise da existência de correlação entre as espécies de protozoários que compõe a microfauna, a presença de *Giardia* e os dados físicos e químicos das amostras estudadas foi aplicado o teste de correlação de Pearson (r) utilizando o programa SPSS 16.0 versão *free* com a prévia transformação logarítmica dos dados (SOKAL & ROHLF, 1995). As correlações foram classificadas conforme Santos (2007) (Tabela 8):

Tabela 8. Classificação das correlações de Pearson.

Coeficiente de Correlação	Significado da Correlação
$r = 1$	Perfeita Positiva
$0,8 \leq r < 1$	Forte Positiva
$0,5 \leq r < 0,8$	Moderada Positiva
$0,1 \leq r < 0,5$	Fraca Positiva
$0 \leq r < 0,1$	Ínfima Positiva
0	Nula
$-0,1 < r \leq 0$	Ínfima Negativa
$-0,5 < r \leq -0,1$	Fraca negativa
$-0,8 < r \leq -0,5$	Moderada negativa
$-1 < r \leq -0,8$	Forte Negativa
$r = -1$	Perfeita Negativa

A possibilidade de variação na ocorrência de *Giardia* spp. nos diferentes trimestres estudados foi avaliada pelo teste ANOVA com o teste de comparação de médias de Duncan com a prévia transformação logarítmica dos dados (SOKAL & ROHLF, 1995). Somente valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Para realização dos testes ANOVA foi utilizado o programa SAS.

5. RESULTADOS

5.1 Investigação da presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e avaliação da remoção de cistos e oocistos.

5.1.1 Estação de Tratamento de Esgoto Piçarrão

As análises realizadas (Tabela 9) indicaram altas concentrações de cistos de *Giardia* spp. no esgoto bruto com uma média de 98.333 cistos / L; lodo do RAFA (281.167 cistos / L); lodo do tanque de aeração (123.667 cistos / L) e lodo condicionado (274.667 cistos / L). Já o efluente do RAFA (193 cistos / L) e efluente tratado (65 cistos / L) apresentaram concentrações menores em relação aos demais pontos.

O sistema apresentou eficiências de remoção de cistos que variaram de 99,8 a 100%.

Tabela 9. Estimativa do número de cistos/L de *Giardia* spp. detectados nas diferentes etapas de tratamento da ETE Piçarrão.

Meses	Pontos de coleta						% de remoção
	P1	P2a	P2b	P3	P4	P5	
abr/10	40.000	500	48.000	20.000	80	NR**	99,8
mai/10	40.000	100	60.000	20.000	33	NR	99,9
jun/10	40.000	150	120.000	40.000	ND*	NR	100
jul/10	40.000	100	240.000	80.000	50	NR	99,9
ago/10	200.000	200	160.000	128.000	100	NR	100
set/10	160.000	200	440.000	240.000	100	NR	99,9
out/10	120.000	400	400.000	200.000	200	NR	99,8
nov/10	160.000	200	400.000	240.000	200	NR	99,9
dez/10	200.000	200	440.000	200.000	200	NR	99,9
jan/11	200.000	300	960.000	320.000	ND	720.000	100
fev/11	120.000	300	880.000	400.000	ND	320.000	100
mar/11	80.000	100	320.000	160.000	100	320.000	99,8
abr/11	80.000	100	200.000	40.000	ND	200.000	100
mai/11	160.000	100	400.000	40.000	ND	120.000	100
jun/11	120.000	200	200.000	120.000	ND	160.000	100
jul/11	40.000	100	80.000	160.000	100	160.000	99,8
ago/11	80.000	500	120.000	80.000	200	80.000	99,8
set/11	80.000	100	120.000	80.000	100	120.000	99,9
out/11	80.000	100	160.000	40.000	ND	40.000	100
nov/11	120.000	200	240.000	80.000	100	200.000	99,9
dez/11	80.000	200	280.000	80.000	ND	160.000	100
jan/12	40.000	200	160.000	80.000	ND	320.000	100
fev/12	40.000	300	200.000	80.000	ND	880.000	100
mar/12	40.000	100	120.000	40.000	ND	320.000	100
média	98.333	193	281.167	123.667	65	274.667	100
#DP	56.542,9	106,9	238.508,2	99.157,6	74,7	233.662,4	

*ND = não detectado; **NR = não realizado; #Desvio Padrão da Média; P1 = esgoto bruto; P2a = efluente RAFA; P2b = lodo RAFA; P3 = lodo tanque de aeração; P4 efluente tratado; P5 = lodo condicionado.

As maiores concentrações de cistos de *Giardia* sp. foram, ao longo do período de estudo, observadas no lodo do RAFA (P2b) (Figura 3).

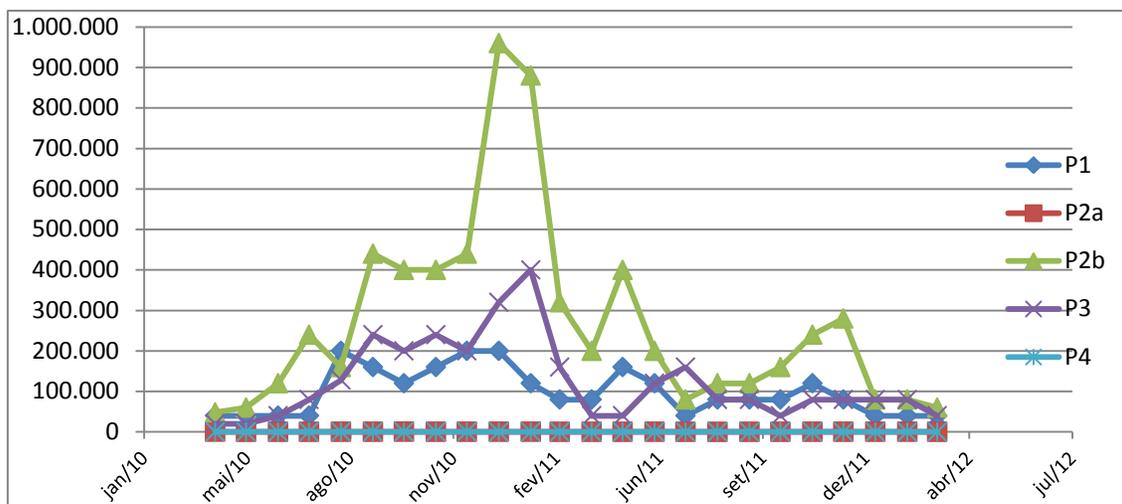


Figura 3. Gráfico da estimativa do número de cistos/L de *Giardia* spp. detectados nas diferentes etapas de tratamento da ETE Piçarrão. P1 = esgoto bruto; P2a = efluente RAFA; P2b = lodo RAFA; P3 = lodo tanque de aeração; P4 efluente tratado; P5 = lodo condicionado.

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados em 3 meses, dos 24 meses de análises, como segue: no mês de março 2011 no efluente do RAFA (100 oocistos /L) e no lodo RAFA (80.000 oocistos /L); no mês de agosto de 2011 no lodo condicionado (40.000 oocistos/L) e no mês de setembro de 2011 no lodo do RAFA (80.000 oocistos /L).

A Figura 4 apresenta cisto de *Giardia* spp. detectado no lodo do RAFA por meio da reação de imunofluorescência direta e com morfologia confirmada por microscopia de contraste de fase.

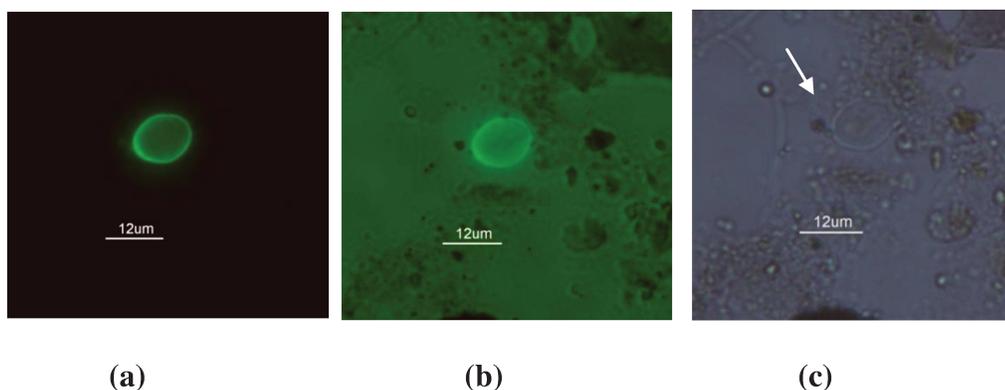


Figura 4. Cisto de *Giardia* spp. detectado no RAFA. (a) imunofluorescência (b) imunofluorescência e campo claro ao mesmo tempo (c) contraste de fase.

5.1.2 Sistema combinado em escala de bancada

A partir de outubro de 2009, após a construção e estabilização do sistema, todo excesso de lodo presente no fundo falso do filtro anaeróbio, biofiltro aeróbio submerso e do decantador passou a ser removido mensalmente. Parte deste lodo foi encaminhada ao Laboratório de Saneamento onde foram feitas as análises físicas e químicas. E outra parte foi processada no Laboratório de Protozoologia para a pesquisa de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. As análises foram realizadas mensalmente durante 20 meses.

Os resultados das análises realizadas mostram elevadas concentrações de cistos de *Giardia* spp. no filtro anaeróbio (FA) com média de 130.000 / L (Tabela 10), concentrações menores no biofiltro aerado submerso (BAS) com média de 44.000 / L e uma menor observação no lodo proveniente do decantador (DEC), onde apenas foram detectados cistos nos meses de março a julho de 2011 com média de 40.000 / L.

A remoção média no FA foi de $63,4 \pm 17,4$ %. A remoção no BAS foi de praticamente 100% durante todo o estudo. Porém, nos meses de março de 2011 a junho de 2011 o sistema de aeração apresentou problemas e o BAS ficou comprometido ocorrendo detecção de cistos de *Giardia* no decantador (Tabela 10). Assim, não houve remoção de cistos no sistema aeróbio nos meses de março e maio de 2011. Nos meses seguintes, o sistema voltou a operar normalmente e os cistos passaram a ser removidos pelo BAS.

Tabela 10. Estimativa do número de cistos/L de *Giardia* spp. presentes nas amostras de lodo coletadas no Filtro Anaeróbio (FA), Biofiltro Aerado Submerso (BAS), decantador (DEC) e efluente tratado (ET) no período de outubro de 2009 a outubro de 2011.

Mês	<i>Giardia</i> spp. cistos / L				Retenção FA %	Remoção sistema %
	FA	BAS	DEC	ET		
out/09	120.000	20.000	*ND	ND	83.3	100
nov/09	20.000	ND	ND	ND	100	100
jan/10	40.000	20.000	ND	ND	50	100
fev/10	60.000	20.000	ND	ND	66.7	100
mar/10	40.000	20.000	ND	ND	50	100
abr/10	60.000	20.000	ND	ND	66.7	100
mai/10	80.000	40.000	ND	ND	50	100
jun/10	80.000	20.000	ND	ND	75	100
jul/10	60.000	20.000	ND	ND	66.7	100
ago/10	80.000	80.000	ND	ND	75	100
jan/11	360.000	80.000	ND	ND	77.8	100
fev/11	280.000	40.000	ND	ND	85.7	100
mar/11	80.000	40.000	40.000	ND	50	50
abr/11	240.000	80.000	40.000	ND	66.7	83.3
mai/11	200.000	40.000	40.000	ND	80	80
jun/11	160.000	80.000	40.000	ND	50	75
jul/11	160.000	120.000	ND	ND	25	100
ago/11	120.000	40.000	ND	ND	66.7	100
set/11	200.000	80.000	ND	ND	60	100
out/11	160.000	80.000	ND	ND	50	100
média	130.000	49.474				
DP	89795,1	30817,3				

ND = Não detectado, DP=desvio padrão da média

As maiores concentrações de cistos de *Giardia* sp. foram, ao longo do período de estudo, observadas no lodo do FA (Figura 5).

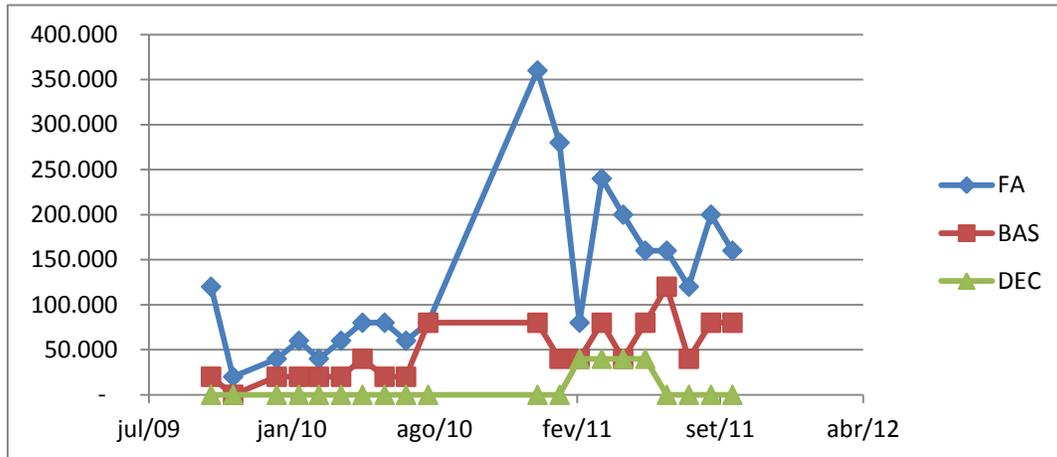


Figura 5. Gráfico da estimativa do número de cistos/L de *Giardia* spp. presentes nas amostras de lodo coletadas no Filtro Anaeróbio (FA), Biofiltro Aerado Submerso (BAS) e decantador (DEC) no período de outubro de 2009 a outubro de 2011.

Os oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados no mês de novembro/2009, no lodo do BAS, com estimativa de 20.000 oocistos / L e, em janeiro / 2010, no lodo do FA com estimativa de 40.000 oocistos / L.

Na Figura 6 estão apresentados cisto e oocisto detectados no BAS, por meio da reação de imunofluorescência direta.

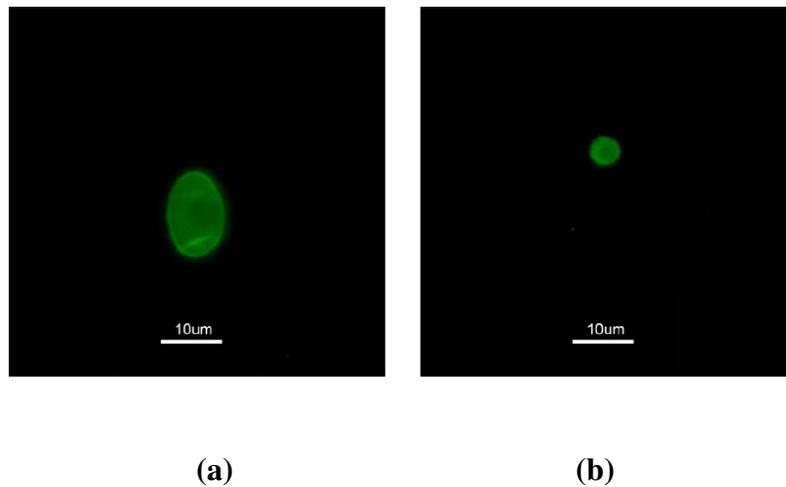


Figura 6. (a) Cisto de *Giardia* spp. e (b) oocisto de *Cryptosporidium* spp. detectados no lodo do biofiltro aerado submerso.

5.2 Análises físicas e químicas

Na Estação de Tratamento de Esgoto Piçarrão a caracterização do esgoto bruto (afluente), efluente do RAFA e efluente tratado foi realizada no período entre abril de 2010 a março de 2012 (Tabela 11).

No Sistema Combinado em Escala de Bancada a caracterização física e química do esgoto bruto afluente ao sistema, efluente do filtro anaeróbico e efluente do biofiltro aerado submerso foi realizada no período entre outubro de 2009 a outubro de 2011, sempre em paralelo com as análises de avaliação do sistema (Tabelas 12 a 17).

Tabela 11. Variáveis físicas e químicas da Estação de Tratamento de Esgoto Piçarrão determinados no período entre abril de 2010 a março de 2012 (média, desvio padrão, valores mínimo e máximo). *n = 24

	Esgoto bruto				Efluente RAFA				Efluente tratado			
	Média*	DP	Mínimo	máximo	Média*	DP	mínimo	máximo	Média*	DP	mínimo	máximo
pH	7.2	0.2	6.7	7.5	7.2	0.2	6.7	7.6	7.3	0.3	6.7	7.8
Cor	1818.5	371.9	963.0	2352.0	917.1	473.8	414.0	1978.0	139.1	43.5	63.0	251.0
Turbidez (NTU)	247.4	69.0	120.0	390.0	189.1	212.5	45.0	944.0	8.5	3.0	4.0	15.0
Alcalinidade Total (CaCO ₃ , mg/L)	246.8	40.9	132.0	308.0	317.5	38.1	232.0	368.0				
Fostato Total (PO ₄ ,mg/L)	13.9	49.6	1.1	307.0	6.8	1.4	3.7	10.6	4.5	1.5	1.1	8.2
DBO ₅ (O ₂ -mg/L)	275.2	80.2	113.0	550.0	102.7	54.9	42.0	248.0	30.1	8.3	16.0	47.0
DQO (O ₂ -mg/L)	483.9	116.0	97.0	650.0	268.0	98.9	130.0	440.0	58.9	15.8	38.0	100.0
Nitrogênio K. Total (N-mg/L)	62.0	32.0	2.0	166.0	69.0	29.2	27.5	154.0	47.7	24.3	8.6	107.0
Nitrogênio Nitrato (NO ₃ -mg/L)	2.6	1.7	0.1	8.9					8.0	7.1	0.8	25.1
Nitrogênio Nitrito (NO ₂ -mg/L)	1.7	9.6	0.0	56.0					0.7	0.4	0.1	2.3
Óleos e Graxas (mg/L)	56.9	46.4	1.9	177.0					29.1	34.8	1.0	186.0
Sólidos Totais (mg/L)	669.1	159.9	394.0	1128.0	532.0	116.0	318.0	704.0	424.0	85.5	276.0	646.0
Sólidos Totais Fixos (mg/L)	375.5	101.6	133.0	728.0	365.2	64.1	212.0	462.0	322.6	75.1	76.0	564.0
Sólidos Totais Voláteis (mg/L)	296.3	96.9	144.0	630.0	160.8	68.8	52.0	308.0	101.4	70.8	16.0	386.0
Sólidos Dissolvidos Totais (mg/L)	412.3	142.9	36.0	796.0	373.1	94.8	226.0	624.0	409.3	85.5	260.0	632.0
Sólidos Dissolvidos fixos (mg/L)	321.6	107.3	34.0	652.0					320.4	76.0	70.0	560.0
Sólidos Dissolvidos voláteis (mg/L)	95.9	85.3	0.0	338.0					90.5	72.0	5.0	380.0
Sólidos Suspensos Totais (mg/L)	257.8	80.7	92.0	472.0	157.2	95.3	38.0	377.0	14.7	7.5	6.0	40.0
Sólidos Suspensos Fixos (mg/L)	56.4	46.1	2.0	208.0	47.4	38.7	4.0	132.0	3.3	4.4	0.0	24.0
Sólidos Susp. Voláteis (mg/L)	206.8	76.0	64.0	492.0	109.8	59.9	28.0	246.0	11.3	6.1	4.0	38.0
Sólidos Sedimentáveis (mg/L)	4.3	1.7	1.5	8.5	4.2	4.3	1.0	17.0	3.0	0.0	3.0	3.0
Sulfato (SO ₄ ²⁻ mg/L)	60.1	22.2	0.1	112.0					46.2	15.0	16.0	95.0
Sulfeto (S-mg/L)	3.0	2.8	0.1	10.0	10.2	7.5	0.1	29.4	0.5	1.3	0.0	6.8

Tabela 12. Variáveis físicas e químicas do Sistema Combinado Anaeróbio-Aeróbio determinados no período entre fevereiro de 2010 a abril de 2010 (média, desvio padrão, valores mínimo e máximo). Etapa 1 – sem recirculação (Q=3,62 L/h)

	Esgoto bruto				Efluente FA				Efluente BAS			
	média	DP	Mínimo	máximo	média	DP	mínimo	máximo	média	DP	mínimo	máximo
pH	6,8	0,5	5,9	7,2	7,1	0,1	6,9	7,2	7,7	0,1	7,5	7,9
Temperatura (°C)	25,0	2,2	22,0	28,0	25,2	2,2	22,0	28,0	24,8	2,2	22,0	28,0
OD (mg O ₂ /L)	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7	1,3	1,5	5,0
Alcalinidade Parcial (CaCO ₃ .mg/L)	87,5	47,4	11,0	144,1	197,8	25,0	165,0	228,8	169,0	22,4	134,2	195,8
Alcalinidade Total (CaCO ₃ .mg/L)	233,9	33,1	187,0	281,6	298,8	36,5	250,8	353,1	226,2	20,5	198,0	253,0
Ácidos Orgânicos Voláteis (HAc/L- mg)	208,7	64,8	110,4	295,3	82,7	47,1	48,0	163,2	40,9	16,5	27,6	66,0
DBO ₅ (O ₂ .mg/L)	362,0	145,6	179,0	540,0	90,0	47,2	48,0	178,0	10,8	2,9	6,0	14,0
DQO (O ₂ .mg/L)	635,0	277,3	422,5	1140,0	211,3	62,3	142,5	292,5	58,3	21,0	32,5	87,5
Nitrogênio K. Total (N-mg/L)	66,1	5,9	59,2	75,9	70,4	7,5	59,1	80,6	57,8	7,3	53,0	72,5
Nitrogênio NH ₄ ⁺ (N-mg/L)	58,7	5,4	52,4	67,1	65,1	7,2	54,2	73,9	53,5	6,6	48,7	66,5
Nitrogênio Nitrato (NO ₃ .mg/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	6,4	3,9	3,7	9,2
Nitrogênio Nitrito (NO ₂ .mg/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,01	0,04	5,0	1,9	3,6	6,3
Sólidos Suspensos Totais (mg/L)	123,4	65,0	66,8	211,8	37,7	17,3	24,2	63,0	3,2	2,1	1,7	6,3
Sólidos Suspensos Fixos (mg/L)	8,2	6,3	0,8	14,4	2,8	1,7	1,2	4,9	0,4	0,2	0,2	0,6
Sólidos Susp. Voláteis (mg/L)	115,2	65,2	66,0	206,7	34,9	18,4	20,6	61,3	2,8	1,9	1,5	5,7

n = 6

Tabela 13. Variáveis físicas e químicas do Sistema Combinado Anaeróbio-Aeróbio determinados no período entre maio de 2010 a junho de 2010 (média, desvio padrão, valores mínimo e máximo). Etapa 2 – sem recirculação (Q=2,7 L/h)

	Esgoto bruto				Efluente FA				Efluente BAS			
	média	DP	Mínimo	máximo	média	DP	mínimo	máximo	média	DP	mínimo	máximo
pH	6,7	0,6	5,5	7,1	7,1	0,2	6,7	7,2	7,4	0,3	7,0	7,9
Temperatura (°C)	21,9	2,1	20,0	26,0	21,7	2,3	19,0	26,0	21,3	2,7	18,0	26,0
OD (mg O ₂ /L)	-	-	-	-	-	-	-	-	5,5	1,0	4,4	7,0
Alcalinidade Parcial (CaCO ₃ .mg/L)	78,9	39,1	0,0	114,4	199,3	20,1	162,8	220,0	97,9	63,2	28,6	206,8
Alcalinidade Total (CaCO ₃ .mg/L)	226,6	18,9	191,4	250,8	289,5	23,5	244,2	316,8	137,5	82,1	44,0	264,0
Ácidos Orgânicos Voláteis (HAc/L- mg)	201,5	111,5	72,0	464,0	65,5	27,0	25,2	99,6	35,0	10,5	19,2	49,2
DBO ₅ (O ₂ .mg/L)	467,0	112,2	328,0	612,9	85,4	31,9	54,0	150,3	15,0	3,4	11,0	21,3
DQO (O ₂ .mg/L)	865,7	154,2	690,0	1135,0	231,8	92,9	140,0	417,5	62,5	6,0	55,0	49,2
Nitrogênio K. Total (N-mg/L)	60,9	7,0	46,8	66,5	65,2	7,0	54,7	73,8	30,2	10,2	15,0	44,0
Nitrogênio NH ₄ ⁺ (N-mg/L)	55,3	6,3	42,5	60,4	60,7	6,3	51,1	69,0	30,1	13,4	13,6	54,2
Nitrogênio Nitrato (NO ₃ .mg/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,1	5,4	1,5	15,5
Nitrogênio Nitrito (NO ₂ .mg/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	18,2	11,8	4,6	33,4
Sólidos Suspensos Totais (mg/L)	124,7	55,9	55,7	191,1	28,2	11,4	18,2	42,0	4,8	3,1	2,4	9,1
Sólidos Suspensos Fixos (mg/L)	11,9	3,4	8,2	15,2	2,8	0,9	1,9	4,0	0,5	0,3	0,3	0,9
Sólidos Susp. Voláteis (mg/L)	112,8	52,8	47,6	175,9	25,5	10,6	16,3	38,4	4,2	2,9	2,0	8,2

N = 7

Tabela 14. Variáveis físicas e químicas do Sistema Combinado Anaeróbio-Aeróbio determinados no período entre junho de 2010 a janeiro de 2011 (média, desvio padrão, valores mínimo e máximo). Etapa 3 – com recirculação ($Q=2,7$ L/h \Rightarrow $q/Q = 0,5$)

	Esgoto bruto				Efluente FA				Efluente BAS			
	média	DP	Mínimo	máximo	média	DP	mínimo	máximo	média	DP	mínimo	máximo
pH	6,8	0,4	6,3	7,3	7,1	0,3	6,5	7,4	6,9	0,6	6,1	7,8
Temperatura (°C)	21,8	1,8	20,0	25,0	21,5	1,9	19,0	25,0	20,8	2,2	18,0	25,0
OD (mg O ₂ /L)	-	-	-	-	-	-	-	-	6,1	0,7	5,0	7,0
Alcalinidade Parcial (CaCO ₃ .mg/L)	87,1	38,2	48,0	148,8	170,4	34,7	127,5	235,2	49,1	67,5	1,3	196,8
Alcalinidade Total (CaCO ₃ .mg/L)	228,8	26,6	189,6	255,0	255,4	46,2	208,8	336,0	74,7	80,1	8,0	249,6
Ácidos Orgânicos Voláteis (HAc/L- mg)	145,0	42,3	97,0	248,0	95,2	69,1	49,2	257,6	29,9	10,0	18,0	44,4
DBO ₅ (O ₂ .mg/L)	333,3	98,9	201,2	489,0	83,7	46,8	46,8	183,1	15,0	5,9	6,0	26,8
DQO (O ₂ .mg/L)	645,4	181,6	372,5	878,5	232,2	129,7	130,0	508,7	68,3	20,3	50,0	116,6
Nitrogênio K. Total (N-mg/L)	67,6	9,9	56,0	89,9	57,0	15,5	37,6	85,4	23,6	9,8	5,0	33,6
Nitrogênio NH ₄ ⁺ (N-mg/L)	55,3	7,4	46,7	70,0	50,9	13,3	33,6	74,0	18,2	7,3	4,0	27,6
Nitrogênio Nitrato (NO ₃ .mg/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,9	0,8	0,1	2,0	16,8	12,8	0,0	33,0
Nitrogênio Nitrito (NO ₂ .mg/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	1,3	1,7	0,0	4,0
Sólidos Suspensos Totais (mg/L)	104,3	29,1	57,1	145,0	33,2	12,0	17,6	54,0	12,8	12,0	2,3	34,0
Sólidos Suspensos Fixos (mg/L)	10,1	8,7	2,4	24,9	2,7	1,6	0,8	5,3	1,1	0,9	0,2	2,1
Sólidos Susp. Voláteis (mg/L)	94,2	24,5	54,7	120,1	30,5	11,5	16,8	51,0	11,8	11,3	2,2	32,0

N = 8

Tabela 15. Variáveis físicas e químicas do Sistema Combinado Anaeróbio-Aeróbio determinados no período entre janeiro de 2011 a abril de 2011 (média, desvio padrão, valores mínimo e máximo). Etapa 4 – com recirculação ($Q=2,17$ L/h \Rightarrow $q/Q = 1,0$)

	Esgoto bruto				Efluente FA				Efluente BAS			
	média	DP	Mínimo	máximo	média	DP	mínimo	máximo	média	DP	mínimo	máximo
pH	7,0	0,3	6,4	7,4	7,3	0,2	7,0	7,7	7,3	0,7	5,8	8,0
Temperatura (°C)	25,8	1,1	24,0	27,0	25,6	1,1	24,0	27,0	25,3	0,9	24,0	27,0
OD (mg O ₂ /L)	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	2,0	0,0	5,7
Alcalinidade Parcial (CaCO ₃ .mg/L)	139,0	57,6	45,0	225,0	214,1	69,6	108,0	303,0	185,2	123,7	0,0	293,0
Alcalinidade Total (CaCO ₃ .mg/L)	267,2	55,0	180,0	335,0	292,7	82,7	165,0	383,0	242,5	159,3	0,0	293,0
Ácidos Orgânicos Voláteis (HAc/L-mg)	201,5	111,5	72,0	464,0	43,0	11,9	29,0	70,0	36,4	9,3	23,0	47,0
DBO ₅ (O ₂ .mg/L)	245,7	44,8	170,7	319,9	50,3	15,6	36,7	89,3	21,4	4,2	13,8	25,8
DQO (O ₂ .mg/L)	571,3	104,2	397,0	744,0	139,7	43,3	102,0	248,0	93,1	18,4	60,0	112,0
Nitrogênio K. Total (N -mg/L)	75,1	15,4	52,4	97,6	66,2	23,9	29,1	95,2	60,4	33,7	9,9	92,1
Nitrogênio NH ₄ ⁺ (N-mg/L)	63,1	12,9	44,0	82,0	59,1	21,3	26,0	85,0	54,1	30,9	8,0	83,0
Nitrogênio Nitrato (NO ₃ .mg/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	1,2	0,9	0,0	3,0	4,8	7,9	0,0	23,0
Nitrogênio Nitrito (NO ₂ .mg/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,2	0,3	0,0	0,7

N = 10

Tabela 16. Variáveis físicas e químicas do Sistema Combinado Anaeróbio-Aeróbio determinados no período entre maio de 2011 a julho de 2011 (média, desvio padrão, valores mínimo e máximo). Etapa 5 – com recirculação ($Q=2,17$ L/h \Rightarrow $q/Q = 0,5$)

	Esgoto bruto				Efluente FA				Efluente BAS			
	média	DP	Mínimo	máximo	média	DP	mínimo	máximo	média	DP	mínimo	máximo
pH	7,3	0,2	7,0	7,5	7,4	0,2	7,2	7,7	7,1	0,7	6,2	8,0,0
Temperatura (°C)	21,5	1,1	20,0	24,0	21,2	1,1	20,0	23,0	20,7	1,2	19,0	23,0
OD (mg O ₂ /L)	-	-	-	-	-	-	-	-	5,1	1,0	4,2	7,0
Alcalinidade Parcial (CaCO ₃ .mg/L)	160,5	45,7	103,0	233,0	193,0	20,2	158,0	215,0	62,6	62,8	2,0	183,0
Alcalinidade Total (CaCO ₃ .mg/L)	268,3	57,6	207,0	373,0	253,5	28,1	209,0	293,0	83,5	77,2	7,0	229,0
Ácidos Orgânicos Voláteis (HAc/L- mg)	145,0	42,3	97,0	248,0	49,4	20,3	31,0	100,0	30,3	8,1	22,0	50,0
DBO ₅ (O ₂ .mg/L)	277,7	87,6	137,0	407,6	32,0	9,5	22,5	55,2	4,7	1,7	3,0	8,3
DQO (O ₂ .mg/L)	665,5	177,8	387,0	948,0	150,5	46,3	107,0	263,0	56,7	20,1	42,0	104,0
Nitrogênio K. Total (N-mg/L)	70,4	13,8	52,0	99,0	54,1	8,1	39,0	65,5	30,6	15,4	11,0	62,0
Nitrogênio NH ₄ ⁺ (N-mg/L)	56,8	9,1	47,0	70,0	48,0	6,4	35,0	58,0	25,6	12,9	9,0	50,0
Nitrogênio Nitrato (NO ₃ .mg/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	1,5	0,8	0,0	3,0	21,8	16,2	1,0	56,0
Nitrogênio Nitrito (NO ₂ .mg/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	6,4	9,8	0,1	29,5
Sólidos Suspensos Totais (mg/L)	152,8	62,1	83,0	210,0	21,5	9,8	14,0	36,0	3,8	1,3	2,0	5,0
Sólidos Suspensos Fixos (mg/L)	12,3	4,6	6,0	17,0	1,9	1,7	0,6	4,3	0,2	0,2	0,0	0,4
Sólidos Susp. Voláteis (mg/L)	140,3	57,7	77,0	195,0	20,0	8,2	14,0	32,0	4,0	0,8	3,0	5,0

N = 11

Tabela 17. Variáveis físicas e químicas do Sistema Combinado Anaeróbio-Aeróbio determinados no período entre agosto de 2011 a novembro de 2011 (média, desvio padrão, valores mínimo e máximo). Etapa 6 – com recirculação ($Q=2,17 \text{ L/h} \Rightarrow q/Q = 1,5$)

	Esgoto bruto				Efluente FA				Efluente BAS			
	média	DP	Mínimo	máximo	média	DP	mínimo	máximo	média	DP	mínimo	máximo
pH	7,5	0,2	7,3	7,9	7,6	0,1	7,3	7,8	6,7	0,5	6,0	7,4
Temperatura (°C)	23,8	1,2	22,0	26,0	23,2	1,3	21,0	25,5	22,6	1,4	20,0	25,0
OD (mg O ₂ /L)	-	-	-	-	-	-	-	-	5,5	0,5	4,6	6,4
Alcalinidade Parcial (CaCO ₃ .mg/L)	174,9	35,8	119,0	255,0	140,7	23,7	110,0	187,0	16,0	19,1	2,0	66,0
Alcalinidade Total (CaCO ₃ .mg/L)	286,4	38,6	227,0	361,0	183,8	28,0	145,0	240,0	24,9	23,9	7,0	88,0
Ácidos Orgânicos Voláteis (HAc/L- mg)	126,6	28,8	89,0	193,0	35,6	5,4	28,0	46,0	23,3	5,3	17,0	35,0
DBO ₅ (O ₂ .mg/L)	228,3	54,6	119,5	321,0	23,5	6,0	13,0	32,3	6,3	2,0	2,0	9,1
DQO (O ₂ .mg/L)	525,5	118,2	278,0	687,6	93,0	23,8	57,0	129,0	44,9	14,6	17,0	65,0
Nitrogênio K. Total (N-mg/L)	74,4	9,1	61,0	88,0	35,8	10,1	24,2	56,0	13,5	9,2	4,0	33,0
Nitrogênio NH ₄ ⁺ (N-mg/L)	65,3	7,8	54,0	78,0	31,3	9,4	21,0	50,0	10,7	9,1	1,0	33,0
Nitrogênio Nitrato (NO ₃ .mg/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	1,4	0,7	0,0	3,0	17,5	4,9	11,0	24,0
Nitrogênio Nitrito (NO ₂ .mg/L)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,1	0,0	0,4	0,2	0,1	0,1	0,4
Sólidos Suspensos Totais (mg/L)	114,3	57,1	35,0	272,0	15,7	2,3	12,0	21,0	6,4	5,0	2,0	18,0
Sólidos Suspensos Fixos (mg/L)	15,3	22,8	0,0	89,0	1,5	1,8	0,0	6,8	0,4	0,5	0,0	1,3
Sólidos Susp. Voláteis (mg/L)	101,8	33,8	32,0	183,0	15,3	5,0	7,0	28,0	6,4	4,6	2,0	17,0

N=15

5.3 Caracterização molecular das espécies de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

Todas as amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. por meio da reação de imunofluorescência também foram positivas pela PCR. Na figura 7 (A, B e C) estão apresentados os resultados obtidos com a diluição das amostras de lodo.

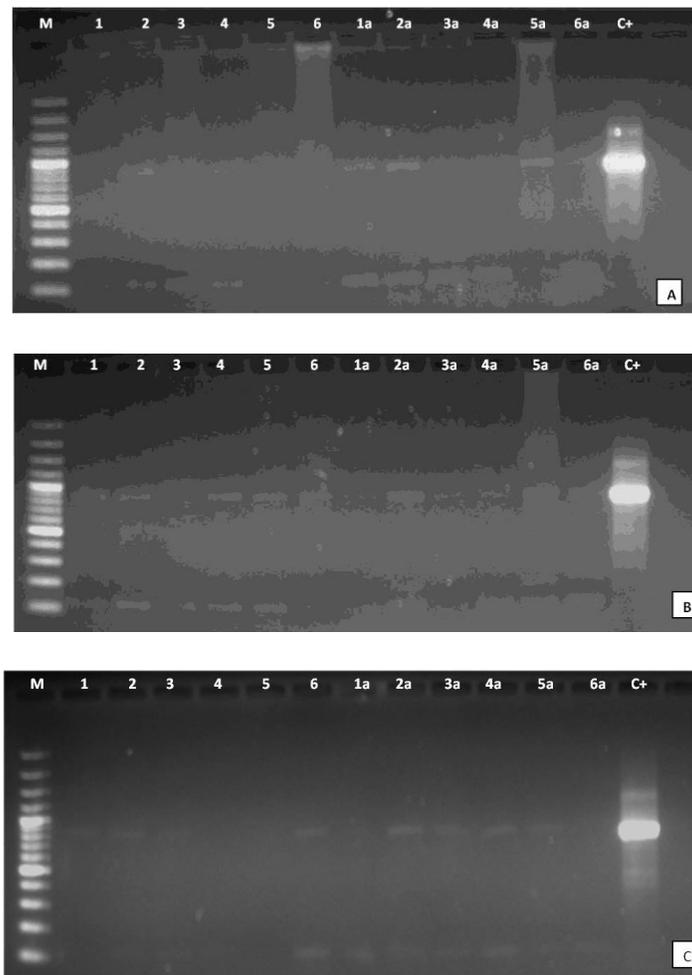


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos amplificados nas reações de *nested*-PCR para o fragmento de 826pb., após diluições das amostras. A - diluição 1:10, B diluição - 1:100 e C – diluição 1:1000. Linhas 1, 2, 3 e 4 = amostras positivas da ETE Piçarrão após centrifugação e IMS, 5 e 6 = esgoto hospitalar após centrifugação e IMS; Linhas 1a, 2a, 3a, 4a, 5a e 6a = amostras concentradas após centrifugação sem IMS.

Nas amostras sem a IMS e concentradas apenas por meio da centrifugação (1a, 2a, 3a, 4a, 5a, e 6a), o resultado da amplificação apresentou melhor concentração do material genético e possibilitou a genotipagem.

O sequenciamento das amostras resultou em perfis compatíveis com as espécies *C. hominis* e *C. parvum*, quando comparadas às sequências homólogas disponíveis no banco de dados GenBank (Tabela 18, Figura 8).

Tabela 18. Resultados da *Nested*-PCR e genotipagem das amostras de esgoto da ETE Piçarrão e Sistema em escala de bancada positivas para *Cryptosporidium* spp. por meio da RID.

Amostra	Origem	<i>Nested</i> PCR	Genótipo
1	ETE Piçarrão	+	<i>C. parvum</i>
2	ETE Piçarrão	+	<i>C. hominis</i>
3	ETE Piçarrão	+	<i>C. parvum</i>
4	ETE Piçarrão	+	<i>C. parvum</i>
5	Esgoto hospitalar	+	<i>C. hominis</i>
6	Esgoto hospitalar	+	<i>C. hominis</i>

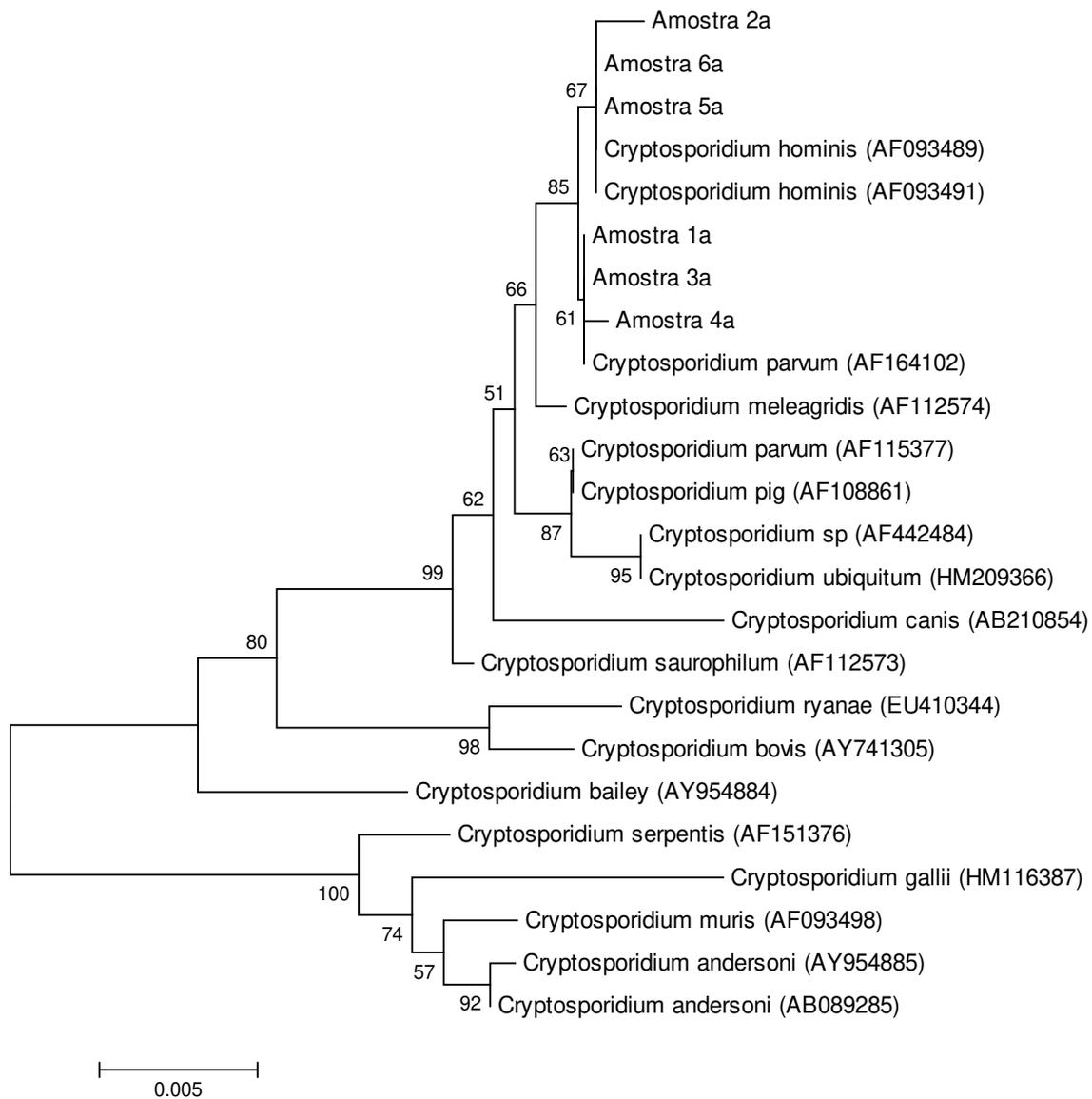


Figura 8. Posição filogenética de isolados de *Cryptosporidium* spp. de amostras de esgoto da ETE Piçarrão (1a, 2a, 3a e 4a) e hospitalar (5a e 6a), obtidas através do alinhamento de 24 seqüências de nucleotídeos com o emprego de *neighbour-joining* utilizando o modelo Tamura-Nei. Números nos ramos correspondem a valores de *bootstrap* de 1.000 réplicas (em porcentagem).

Todas as amostras positivas para *Giardia* spp. por meio da reação de imunofluorescência provenientes da ETE Piçarrão foram caracterizadas molecularmente e 75% (18/24) foram aferidas como positivas pela PCR para *Giardia duodenalis* (Figura 9) e puderam ser sequenciadas.

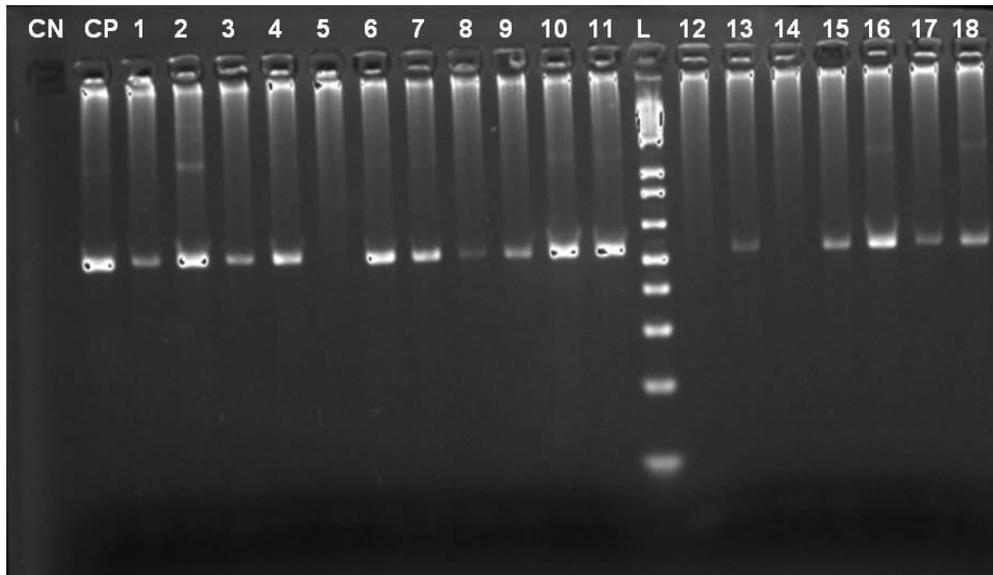


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 3% evidenciando as bandas de 530pb do gene *tpi* a partir de amplificação de amostras da ETE Piçarrão. L = *Ladder* 1kb plus (Invitrogen).

A análise realizada após o Critério de Informação de Akaike – AIC (Akaike, 1974), pela empresa Genomic Engenharia Molecular, indicou que o modelo de substituição de nucleotídeos mais indicado foi o de Tamura-Nei (TN93) com distribuição Gamma. A determinação dos genótipos das amostras foi realizada através dos métodos Máxima Verossimilhança e *Neighbor-joining*.

A Tabela 19 e a Figura 10 apresentam os resultados referentes aos genótipos encontrados nas amostras da ETE Piçarrão. A maior parte das amostras sequenciadas pertence à assembleia

AII (12 amostras), duas amostras foram identificadas como pertencentes à assembleia BIV e quatro amostras pertencentes à assembleia C.

Tabela 19. Resultados da PCR e genotipagem das amostras de esgoto da ETE Piçarrão positivas para *Giardia* spp. por meio da RID.

Amostra	Nº.	Origem	PCR - <i>Giardia duodenalis</i>	Assembleia
1	10J	ETE Piçarrão	+	C
2	-	ETE Piçarrão	-	-
3	13J	ETE Piçarrão	+	AII
4	14J	ETE Piçarrão	+	AII
5	15J	ETE Piçarrão	+	AII
6	17J	ETE Piçarrão	+	AII
7	16J	ETE Piçarrão	+	C
8	18J	ETE Piçarrão	+	AII
9	19J	ETE Piçarrão	+	AII
10	21J	ETE Piçarrão	+	AII
11	20J	ETE Piçarrão	+	C
12	25J	ETE Piçarrão	+	AII
13	26J	ETE Piçarrão	+	AII
14	27J	ETE Piçarrão	+	AII
15	28J	ETE Piçarrão	+	BIV
16	29J	ETE Piçarrão	+	BIV
17	30J	ETE Piçarrão	+	AII
18	-	ETE Piçarrão	-	-
19	-	ETE Piçarrão	-	-
20	36J	ETE Piçarrão	+	C
21	37J	ETE Piçarrão	+	AII
22	-	ETE Piçarrão	-	-
23	-	ETE Piçarrão	-	-
24	-	ETE Piçarrão	-	-

- = amostras não aplicaram

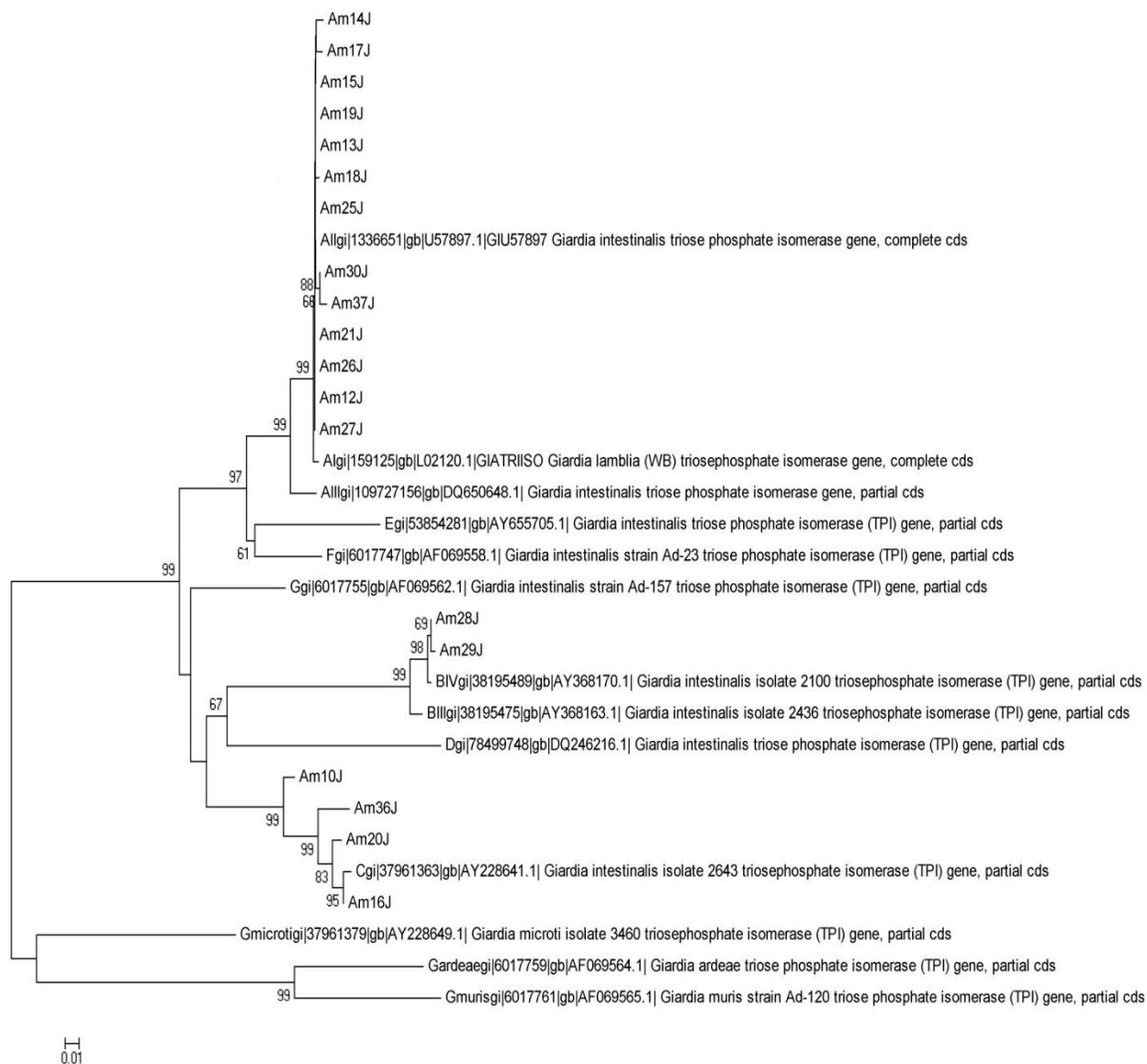


Figura 10. Posição filogenética de isolados de *Giardia duodenalis* de amostras de esgoto da ETE Piçarrão, obtidas através do alinhamento de 530 nucleotídeos da região codificante do gene *tpi* com o emprego de *neighbour-joining* utilizando o modelo Tamura-Nei e distribuição Gamma. Números nos ramos correspondem a valores de *bootstrap* de 10.000 reamostragens (em porcentagem).

A Tabela 20 e a Figura 11 apresentam os resultados referentes aos genótipos encontrados nas amostras do sistema em escala de bancada tratando esgoto hospitalar. A maior parte das amostras sequenciadas foi identificada como pertencentes à assembleia A (7 amostras), três amostras foram identificadas como pertencentes à assembleia B e uma amostra pertencentes à assembleia C.

Tabela 20. Resultados da PCR e genotipagem das amostras de esgoto hospitalar positivas para *Giardia* spp. por meio da RID.

Amostra	Nº.	Origem	PCR - <i>Giardia duodenalis</i>	Assembleia
1	01J	Esgoto hospitalar	+	B
2	02J	Esgoto hospitalar	+	A
3	03J	Esgoto hospitalar	+	C
4	04J	Esgoto hospitalar	+	AII
5	-	Esgoto hospitalar	-	-
6	-	Esgoto hospitalar	-	-
7	07J	Esgoto hospitalar	+	AII
8	08J	Esgoto hospitalar	+	BIV
9	22J	Esgoto hospitalar	+	B
10	23J	Esgoto hospitalar	+	AII
11	-	Esgoto hospitalar	-	-
12	31J	Esgoto hospitalar	+	AII
13	33J	Esgoto hospitalar	+	AII
14	35J	Esgoto hospitalar	+	AII
15	-	Esgoto hospitalar	-	-

- = amostras não aplicaram

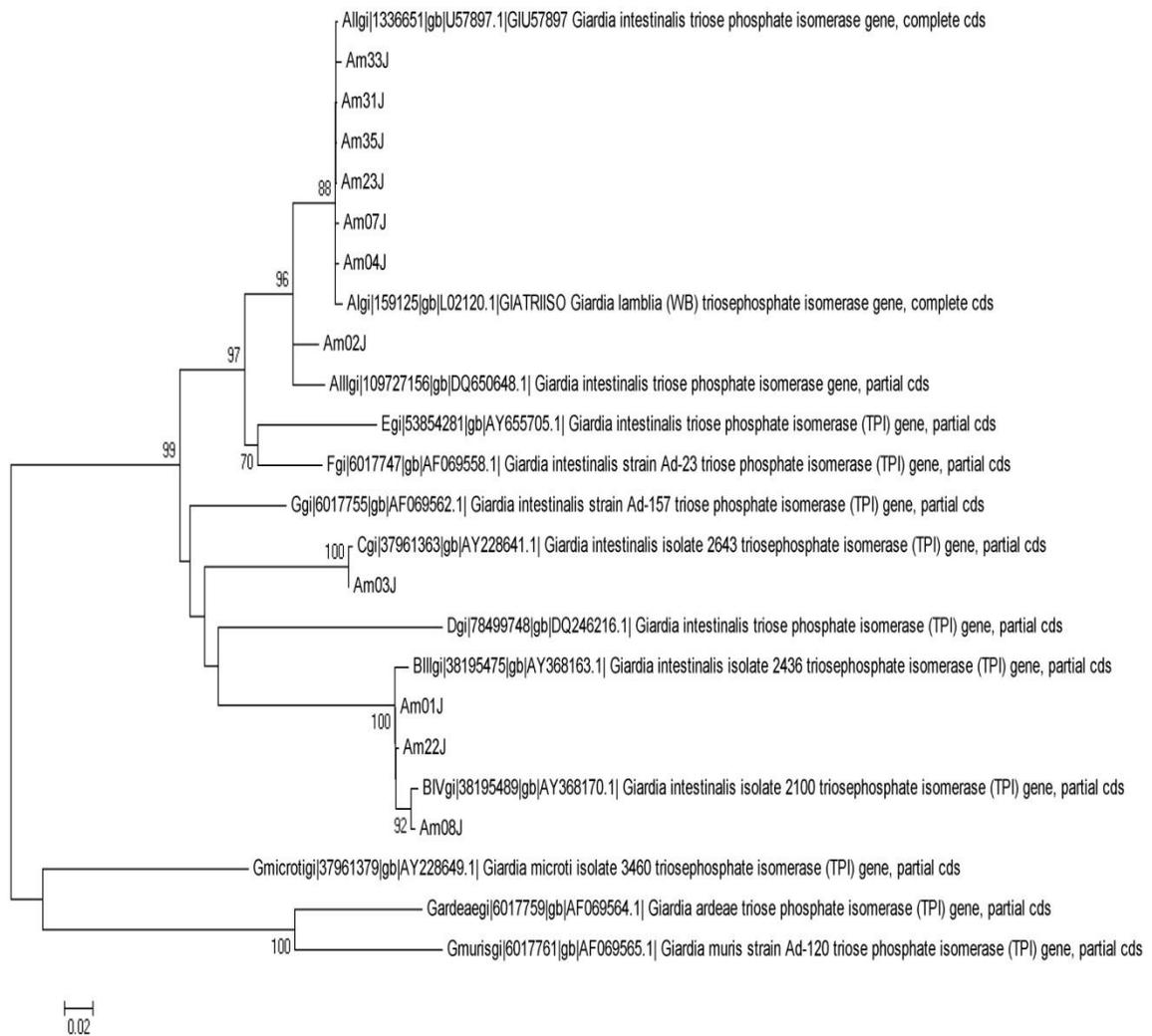


Figura 11. Posição filogenética de isolados de *Giardia duodenalis* de amostras de esgoto hospitalar, obtidas através do alinhamento de 530 nucleotídeos da região codificante do gene *tpi* com o emprego de *neighbour-joining* utilizando o modelo Tamura-Nei e distribuição Gamma. Números nos ramos correspondem a valores de *bootstrap* de 10.000 reamostragens (em porcentagem).

5.4 Avaliação da microfauna

5.4.1 Estação de Tratamento de Esgoto Piçarrão

Dentre os grupos que compõem a microfauna do lodo ativado da ETE Piçarrão, os protozoários ciliados bacterívoros foram os mais frequentes durante as observações (Tabela 21, Figura 12) apresentando frequência de ocorrência de 62,5% em relação à comunidade, seguido pelas tecamebas (16,8%), flagelados (9,4%), amebas nuas (4,1%), rotíferos (3,9%), ciliados predadores (3,0%), nematóides (0,1%) e anelídeos (0,1%).

Tabela 21. Frequência relativa e abundância dos grupos componentes da microfauna presente no lodo ativado da ETE Piçarrão, no período de abril de 2010 a março de 2012.

Grupo	Frequência relativa (%)	Abundância Média (indivíduos / mL)
Ciliados bacterívoros	62,5	4974,1
Ciliados carnívoros	3,0	242,2
Amebas nuas	4,1	327,8
Tecamebas	16,8	1337,6
Flagelados	9,4	750,8
Rotíferos	3,9	314,2
Nematóides	0,1	5,8
Anelídeos	0,1	3,2

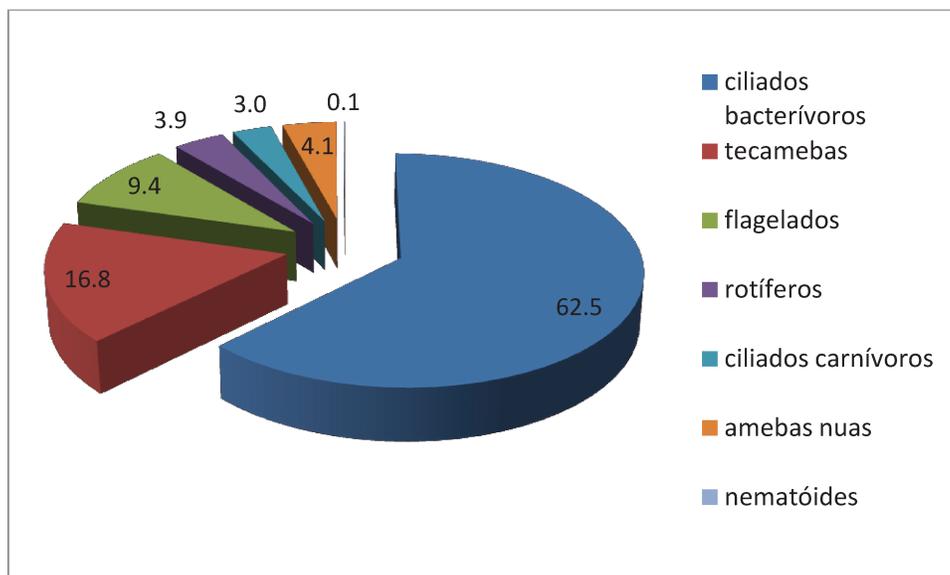


Figura 12. Frequência relativa dos grupos da microfauna observado no tanque de aeração da ETE Piçarrão.

Dentre os ciliados bacterívoros observados (Tabela 22), os sésseis foram os mais abundantes, e incluíram *Vorticella* spp., *Epistylis plicatilis*, *Carchesium* sp. e *Opercularia* sp.; seguido pelos ciliados rastejantes, que incluíram *Gastronauta aloisi*, *Chilodonella uncinata*, *Drepanomonas revoluta*, *Aspidisca cicada*, *Euplotes aediculatus* e *Acineta uncinata*; e ciliados livres natantes, que incluíram *Paramecium aurelia* e *Metopus* sp. Dentre os ciliados carnívoros, que são aquelas espécies predadoras de outros ciliados, foram observados os livres natantes *Litonotus* sp., *Trachelius* sp., *Loxophylum* sp. e *Dileptus* sp. e os ciliados sésseis *Podophrya* sp., *Discophrya* sp., *Tokophrya* sp. e *Sphaerophrya* sp. e *Acineta* sp.. As tecamebas observadas foram *Arcella hemisphaerica* e *Euglypha* sp., sendo a primeira mais abundante. Os flagelados incluíram *Peranema* sp. e *Chilomonas* sp. Os espécimes de rotíferos observados incluíram *Epiphanes* sp., *Rotaria* sp., *Philodina* sp. e *Lecane* sp. Os espécimes de nematóides observados foram *Rhabditis* sp.

Quanto à frequência dos protozoários ciliados no lodo ativado ao longo do presente estudo, três espécies bacterívoras rastejantes foram mais frequentes, sendo estas *Aspidisca cicada* (94,7%), *Gastronauta aloisi* (86,8%) e *Acineria uncianta* (84,2%), seguido por duas espécies bacterívoras sésseis, sendo *Vorticella* spp. (94,7%) e *Epistylis plicatilis* (84,2%), conforme apresentado na Tabela 22.

Entre os ciliados carnívoros livre natantes, quatro espécies foram registradas, sendo *Litonotus* sp. a espécie com maior frequência e abundância média. Esses ciliados apresentam associado a ciliatura somática próxima a abertura oral a presença de extrusomas do tipo toxicistos, que são utilizados na captura de suas presas.

Os ciliados carnívoros sésseis são representados por organismos da ordem Suctoria, cujas formas vegetativas são sésseis, sem ciliatura, mas com tentáculos providos de toxicistos, que são utilizados na captura e predação de outros protozoários. As espécies de ciliados suctoriais registradas e seus percentuais de ocorrência foram *Tokophrya* sp. (50,0%), *Podophrya fixa* (42,1%), *Discophrya* sp. (15,8%), *Sphaerophrya* sp. (2,6%) e *Acineta* sp. (2,6 %) (Tabela 22).

Entre os demais componentes da microfauna, os protozoários amebóides, representado por tecamebas (*Arcella hemisphaerica* e *Euglypha* sp.) e amebas nuas, seguido pelo protozoário flagelado do gênero *Peranema*, apresentaram as seguintes frequências: 100%, 57,9%, 63,2% e 57,9%, respectivamente. Rotifera foi o grupo de micrometazoário mais frequente nas amostras de lodo ativado ao longo do estudo, sendo a espécie mais representativa *Lecane* sp. (81,6%).

Tabela 22. Frequência e abundância de protozoários e micrometazoários do lodo ativado da ETE Piçarrão observadas no dia da coleta em amostras de lodo ativado durante os meses de abril de 2010 a março de 2012.

Grupo	Táxon	Frequência (%)	Abundância (no./mL)		
			Mínima	Média	Máxima
Ciliados Bacterívoros					
Livre Natante	<i>Paramecium aurelia</i>	2,6	0	3,5	133
	<i>Metopus</i> sp.	5,3	0	3,2	80
Rastejantes	<i>Gastronauta aloisi</i>	86,8	0	466,6	2833
	<i>Chilodonella uncinata</i>	7,9	0	5,3	120
	<i>Drepanomonas revoluta</i>	5,3	0	8,4	160
	<i>Aspidisca cicada</i>	97,4	0	1132,6	3400
	<i>Euplotes aediculatus</i>	13,2	0	7,4	120
	<i>Acinera uncinata</i>	84,2	0	542,1	1760
	Séssil	<i>Vorticella</i> spp.	94,7	0	2071,5
<i>Epistylis plicatilis</i>		84,2	0	692,8	2930
<i>Carchesium</i> sp.		5,3	0	11,6	360
<i>Opercularia</i> sp.		18,4	0	42,5	560
Ciliados Carnívoros					
Livre Natante	<i>Litonotus</i> sp.	36,8	0	66,8	560
	<i>Trachelius</i> sp.	2,6	0	8	160
	<i>Loxophylum</i> sp.	15,8	0	43,2	680
	<i>Dileptus</i> sp.	7,9	0	3,2	40
Séssil	<i>Podophrya fixa</i>	42,1	0	48,1	400
	<i>Discophrya</i> sp.	15,8	0	9,5	120
	<i>Tokophrya</i> sp.	50,0	0	63	333
	<i>Sphaerophrya</i> sp.	2,6	0	2,1	80
	<i>Acineta</i> sp.	2,6	0	2,1	80
Amebas					
Tecamebas	<i>Arcella hemisphaerica</i>	100	120	1174,4	4400
	<i>Euglypha</i> sp.	57,9	0	169	520
Amebas Nuas		63,2	0	327,8	2960
Flagelados	<i>Peranema</i> sp.	57,9	0	169	520
	<i>Chilomonas</i> sp.	34,2	0	418,6	4000
Rotíferos	<i>Epiphanes</i> sp.	7,9	0	10,7	200
	<i>Rotaria</i> sp.	15,8	0	21,1	400
	<i>Philodina</i> sp.	44,7	0	53,8	400
	<i>Lecane</i> sp.	81,6	0	228,6	760
Nematóides	<i>Rhabditis</i> sp.	10,5	0	5,8	100
Anelídeos		5,3	0	2,1	40

Ao longo do período de estudo *Vorticella* spp., *Arcella hemisphaerica*, *Aspidisca cicada* e *Epistylis plicatilis* foram os protozoários com maiores médias de abundância no lodo ativado da ETE Piçarrão (Figura 13).

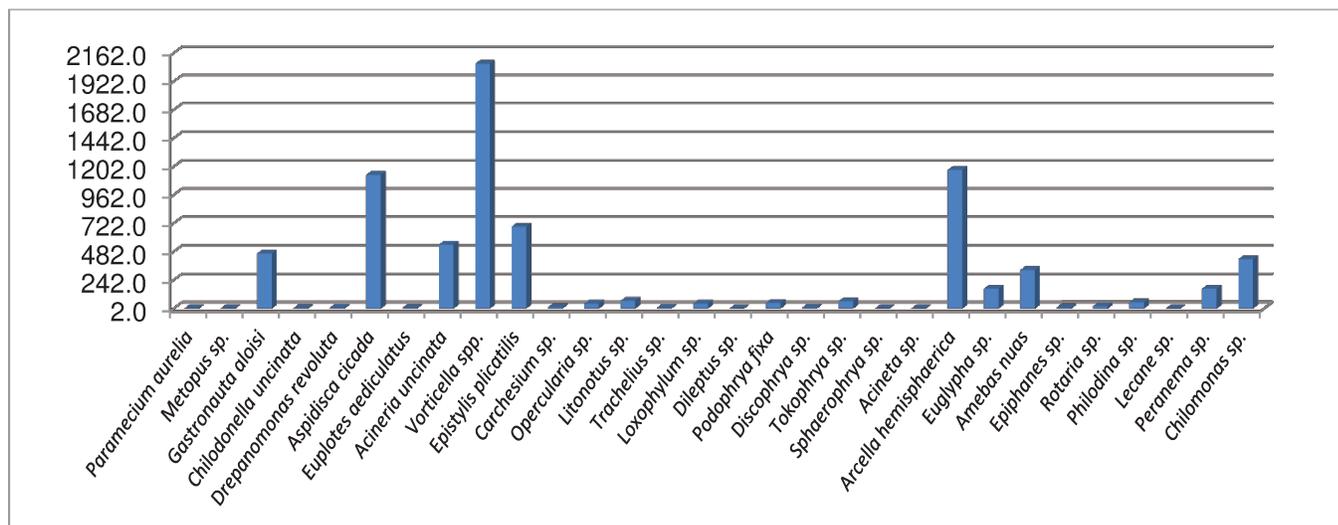


Figura 13. Média dos organismos / mL detectados nas amostras frescas de lodo ativado nos tanques de aeração durante os meses de abril de 2010 a março de 2012.

A análise das culturas de ciliados revelou outras espécies presentes no tanque de aeração, porém não detectadas no dia da coleta. Algumas espécies de ciliados, dependendo das condições físicas e químicas do sistema, permanecem encistadas e em condições favoráveis, desencistam, nutrem-se e iniciam a reprodução. Além das espécies observadas no dia da coleta, também foram observados apenas nas culturas, as seguintes espécies: *Blepharisma sinuosum*, *Bakuella* sp., *Deviata* sp., *Gastrostyla* sp., *Oxytricha granulifera*, *Oxytricha* sp., *Tetmemena pustulata*, *Sterkiella cavicola*, *Didinium nasutum*, *Perispira* sp., *Colpidium* sp.

Entre as espécies de protozoários ciliados registradas na ETE Piçarrão, 25 foram encontradas em amostras frescas de lodo ativado analisadas no dia da coleta, sendo que a maioria

destes se manteve também em condições de cultivo. As demais espécies não estavam na forma ativa nas amostras recém colhidas de lodo ativado, não sendo observadas durante as análises qualitativas e quantitativas da microfauna do lodo ativado. Essas espécies encontraram condições favoráveis nas culturas, deixando a forma de cisto e se tornaram ativas. No total, somando as espécies do dia da coleta e as espécies que ocorreram apenas no cultivo, foram identificadas 36 espécies de protozoários no lodo ativado da ETE Piçarrão. As espécies de ciliados estão distribuídas nas classes Heterotrichea, Spirotrichea, Litostomatea, Phyllopharyngea, Nassophorea, Colpodea e Oligohymenophorea, sendo classificadas segundo Lynn & Small (2008) e estão listadas na Tabela 23.

A microfauna da ETE Piçarrão registrada no presente estudo está representada nas figuras 14 a 21.

Tabela 23. Levantamento das espécies de protozoários ciliados encontradas na ETE Piçarrão. + = ocorrência do ciliado; *registro em amostras frescas analisadas no dia da coleta; **registro em culturas preparadas a partir de alíquotas de lodo ativado.

CLASSE	Espécies de protozoários ciliados	Lodo Ativado	
		Dia da coleta*	Cultura**
HETEROTRICHEA	<i>Blepharisma sinuosum</i>		+
	<i>Metopus</i> sp.	+	+
CLASSE SPIROTRICHEA	<i>Aspidisca cicada</i>	+	+
	<i>Aspidisca</i> sp.	+	
	<i>Bakuella</i> sp.		+
	<i>Deviata</i> sp.		+
	<i>Euplotes aediculatus</i>	+	+
	<i>Gastrostyla</i> sp.		+
	<i>Oxytricha granulifera</i>		+
	<i>Oxytricha</i> sp.		+
	<i>Tetmemena pustulata</i>		+
	<i>Sterkiella cavicola</i>		+
LITOSTOMATEA	<i>Acinertia uncinata</i>	+	+
	<i>Didinium nasutum</i>		+
	<i>Litonotus</i> sp.	+	+
	<i>Loxophyllum</i> sp.	+	
	<i>Perispira</i> sp.		+
	<i>Trachelius</i> sp.	+	+
	<i>Dileptus</i> sp.	+	+
PHYLLOPHARYNGEA	<i>Acineta</i> sp.	+	
	<i>Chilodonella uncinata</i>	+	
	<i>Discophrya</i> sp.	+	+
	<i>Gastronauta aloisi</i>	+	+
	<i>Metacineta mystacina</i>	+	
	<i>Podophrya fixa</i>	+	
	<i>Tokophrya quadripartita</i>	+	
	<i>Sphaerophrya</i> sp.	+	+
NASSOPHOREA	<i>Drepanomonas revoluta</i>	+	
COLPODEA	<i>Colpoda cucullus</i>	+	
OLIGOHYMENOPHOREA	<i>Paramecium aurelia</i>	+	+
	<i>Colpidium</i> sp.		+
	<i>Opercularia</i> sp.	+	+
	<i>Epistylis plicatilis</i>	+	+
	<i>Carchesium polypinum</i>	+	+
	<i>Vorticella infusionum</i>	+	+
	<i>Vorticella convallaria</i>	+	+
	TOTAL		25

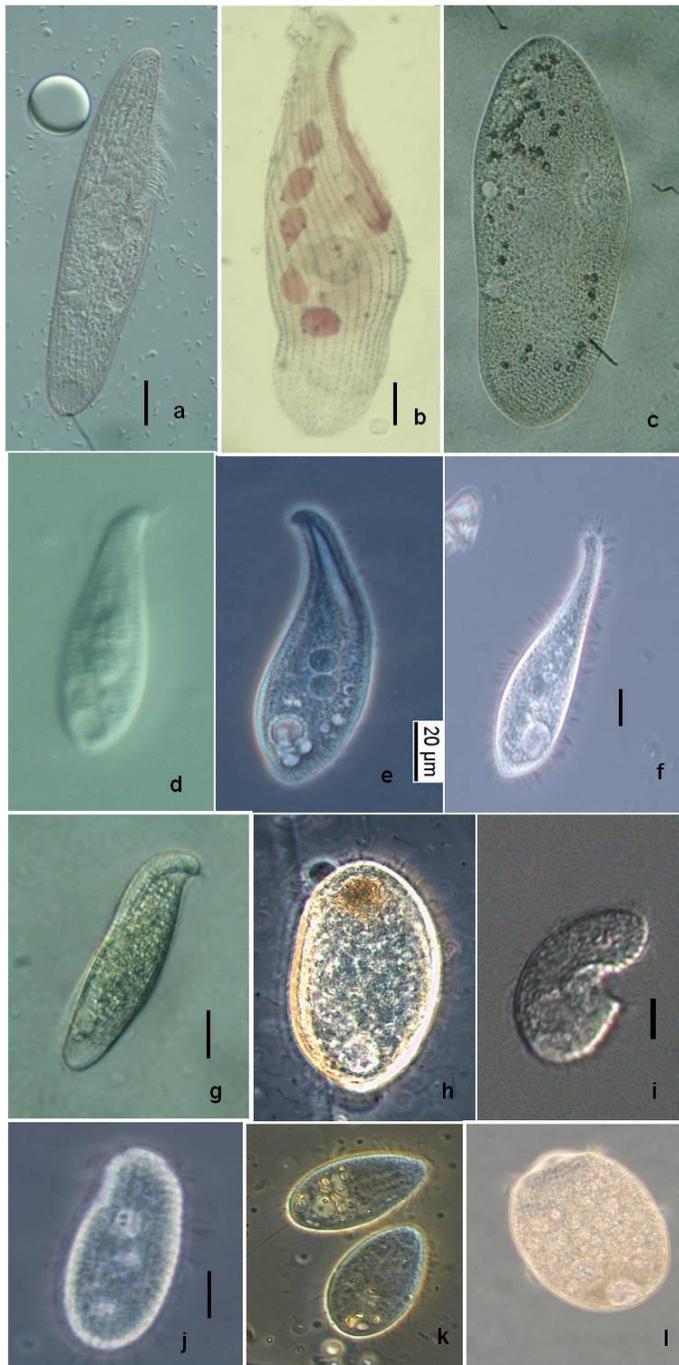


Figura 14. Fotomicrografias de protozoários ciliados livre natantes presentes no lodo ativado da ETE Piçarrão. a–b: *Blepharisma sinuosum*; c: *Paramecium aurelia*; d: *Acinertia uncinata*; e: *Loxophyllum* sp.; f: *Litonotus* sp.; g: *Metopus* sp.; h: *Perispira* sp.; i: *Colpoda cucullus*; j: *Colpidium* sp.; k: *Uronema nigricans*; l: *Didinium nasutum*; b: fotomicrografia de *B. sinuosum* impregnado pelo protargol. Barra = 10 µm.



Figura 15. Fotomicrografias de protozoários bacterívoros rastejantes presentes no lodo ativado da ETE Piçarrão. a–c: *Gastronauta aloisi*; d–e: *Chilodonella uncinata*; f: *Drepanomonas revoluta*; g–h: *Aspidisca cicada*; i–k: *Euplotes aediculatus*. c, h, k = ciliados impregnados pelo protargol. Barra= 50 µm.

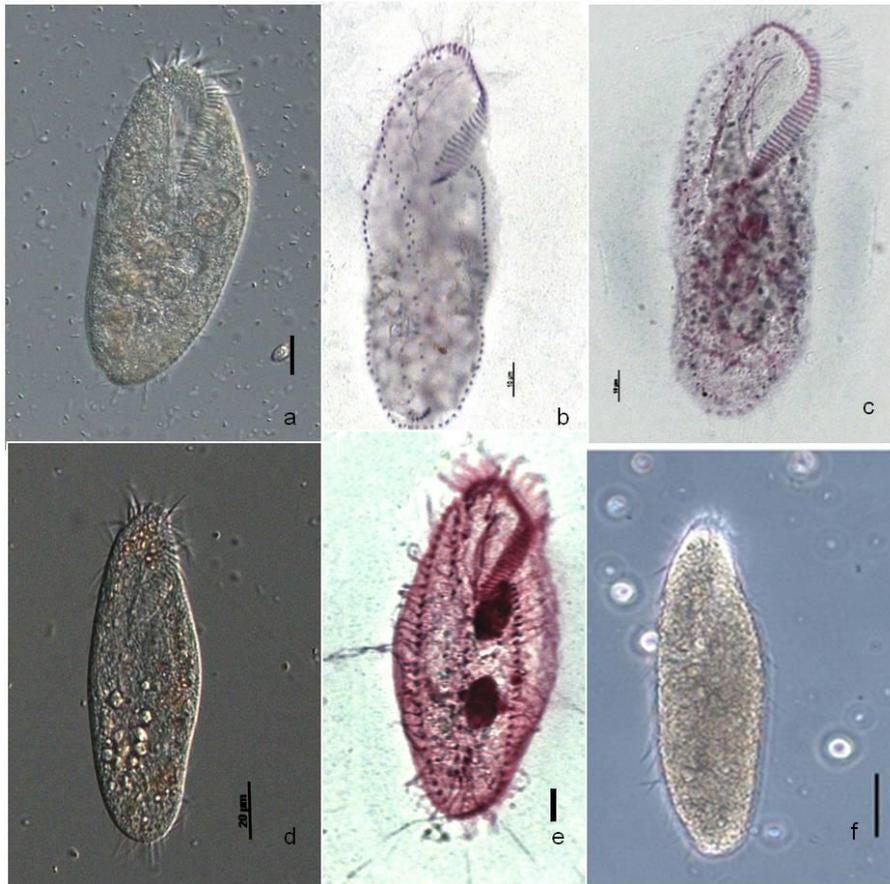


Figura 16. Protozoários ciliados rastejantes presentes no lodo ativado da ETE - Piçarrão. a-c: *Bakuella* sp.; b-c: fotomicrografia de espécimes impregnados pela prata, evidenciando padrão de ciliatura somática ventral e ciliatura oral; d-e: *Gastrostyla* sp. *in vivo* (d), impregnado pela prata (e) evidenciando ciliatura oral, ciliatura somática ventral e aparato nuclear; f: Fotomicrografia em contraste de fase de *Deviata* sp. *in vivo*. Barra = 10 µm.

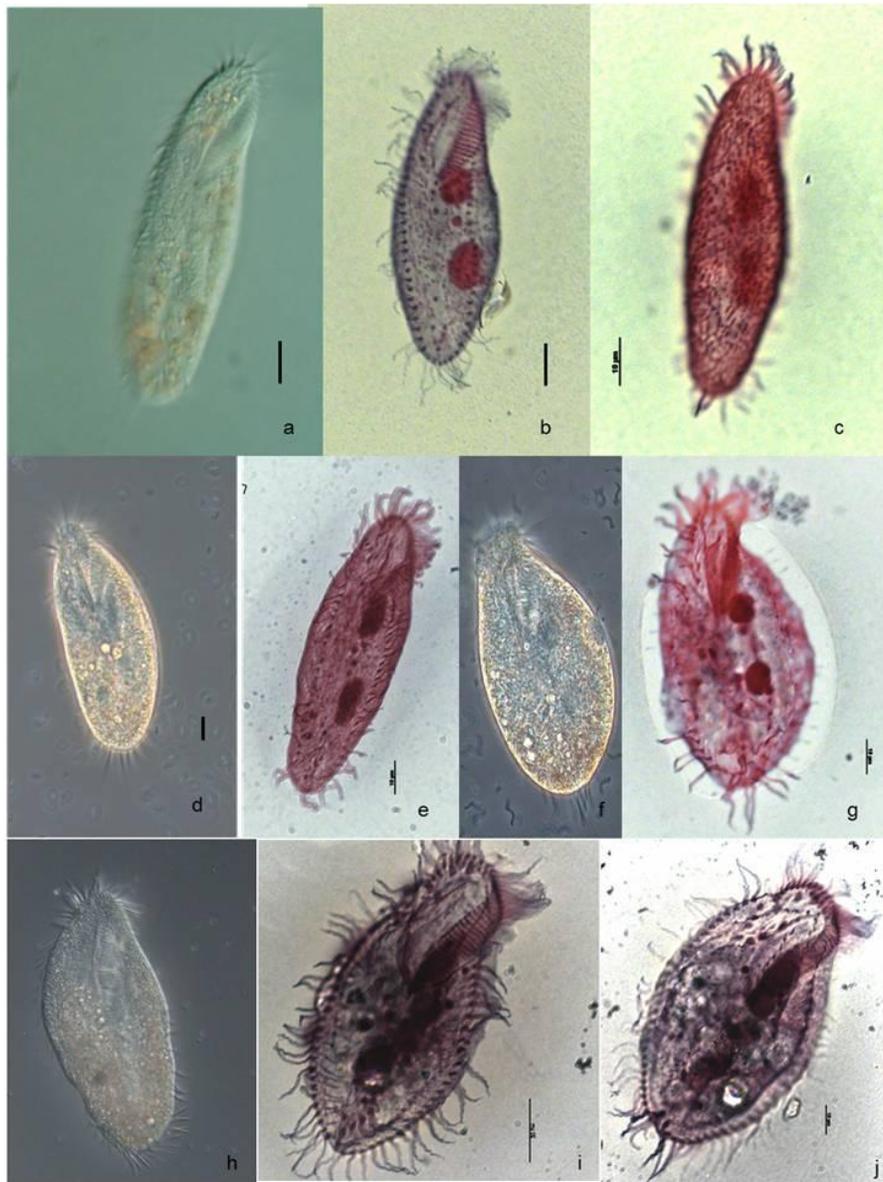


Figura 17. Protozoários ciliados rastejantes presentes no lodo ativado da ETE Piçarrão. a–c: Fotomicrografias de *Oxytricha granulifera*; a: Ciliado *in vivo*; b: Fotomicrografia de espécime impregnado pelo protargol, evidenciando ciliatura oral, somática (ventral) e aparato nuclear; c: face dorsal evidenciando grânulos corticais; d–e: Fotomicrografias de *Oxytricha* sp. f–g: Fotomicrografia de *Tetmemena pustulata* *in vivo* (f) e impregnado pela prata (g), evidenciando ciliatura oral, ciliatura somática ventral e aparato nuclear; h–j: Fotomicrografias de *Sterkiella cavicola* *in vivo* (h) e espécimes impregnados pela prata (i–j) respectivamente. Barra = 10 μm .



Figura 18. Fotomicrografias de protozoários ciliados sésseis *in vivo* em contraste de fase e contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC), presentes no lodo ativado da ETE Piçarrão. a–b: *Vorticella infusionum*; c: *Vorticella convallaria*; d: Colônia de *Epistylis plicatilis*; e: Colônia de *Carchesium polypinum*. b = ciliado impregnado pelo protargol; Barra = 20 µm.

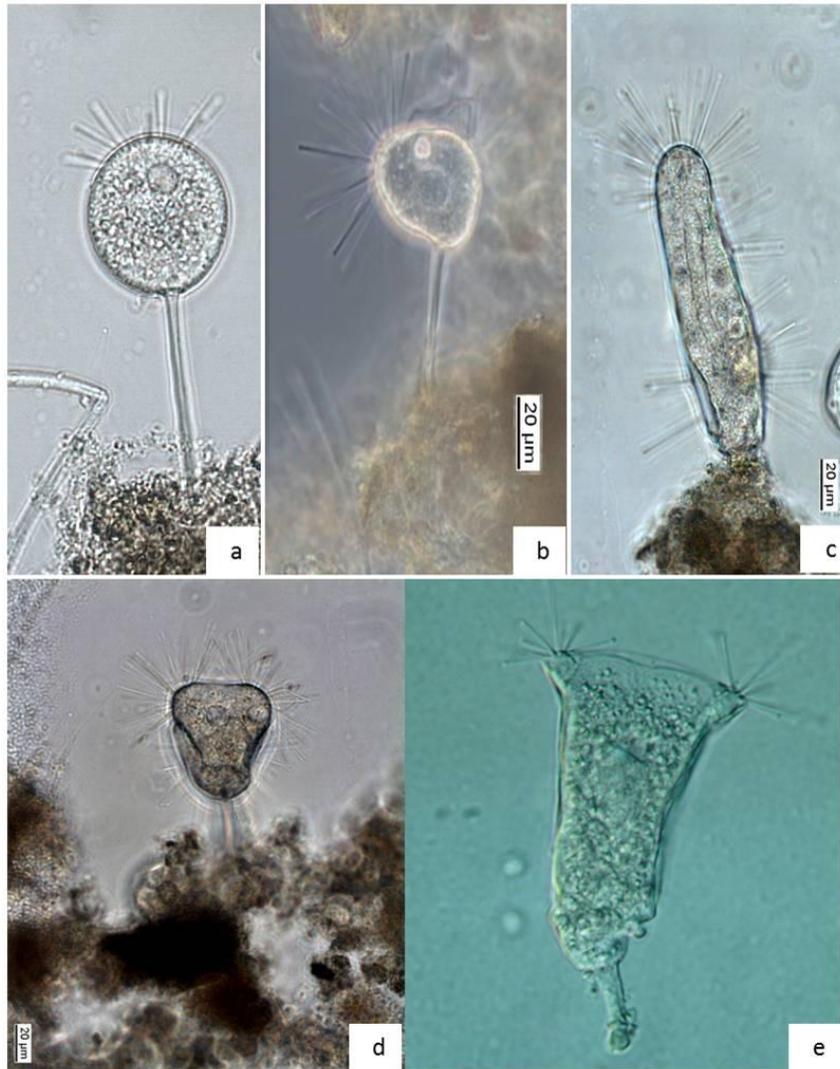


Figura 19. Fotomicrografias em contraste de fase e contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC) de protozoários ciliados predadores sésseis *in vivo*, presentes no lodo ativado da ETE - Piçarrão. a–b: *Podophrya fixa*; c: *Discophrya* sp.; d: *Tokophrya quadripartita*; e: *Acineta* sp. Barra = 20 µm.



Figura 20. Fotomicrografias em contraste de fase de protozoários flagelados e ameboides *in vivo*, presentes no lodo ativado da ETE - Piçarrão. a: Protozoário flagelado *Peranema sp.*; b: *Chilomonas sp.*; c-d: Amebas nuas; e: Tecameba *Arcella hemisphaerica*; f: Tecameba *Euglypha sp.* Barra = 20 µm.



Figura 21. Fotomicrografias em contraste de fase de fase de micrometazoários *in vivo*, presentes no lodo ativado da ETE - Piçarrão. a-c: Rotifera; d: Gastrotricha.

O número total de ciliados e de flagelados, os grupos dominantes em cada coleta, o Índice Biótico do Lodo (IBL) (Tabela 4) bem como a classe do lodo por coleta na ETE Piçarrão estão demonstrados na Tabela 24. Com relação às classes conforme a qualidade do lodo fornecida pelo IBL, em 54% das coletas o lodo apresentou classe I e em 46 % das coletas foi classe II.

Tabela 24. Densidade média de protozoários e classificação do lodo ativado da ETE Piçarrão ao longo do período de coleta.

Amostra	Total Protozoa (n/ml)	Ciliados bacterívoros livre natantes	Ciliados sésseis	Ciliados rastejantes	Tecamebas	Flagelados	Grupo dominante*	Ciliados Rastejantes + sésseis e/ou tecamebas (n/L)	Número total de táxon	Pequenos flagelados (n/ml)	IBL	Classe/Qualidade
1	5400		1100	2600	1500	100	CR	$\geq 10^6$	9	<10	9	I
2	15730		7330	3200	3600	1600	CS	$\geq 10^6$	7	>10	6	II
3	7201		3600	1067	1867	400	CS	$\geq 10^6$	7	>10	6	II
4	8398	133	3600	2533	1465	667	CS	$\geq 10^6$	7	>10	6	II
5	8666		2533	5333	667	0	CR	$\geq 10^6$	7	<10	6	II
6	8999		2000	4833	1333	333	CR	$\geq 10^6$	8	>10	7	II
7	12800		5800	2800	4200	0	CS	$\geq 10^6$	7	<10	9	I
8	13000		7000	4600	1000	400	CS	$\geq 10^6$	8	>10	7	II
9	13800		3600	400	5200	4000	TA	$\geq 10^6$	9	>10	7	II
10	7999		333	2333	3333	1833	TA	$\geq 10^6$	7	>10	6	II
11	5999		4000	1166	500	333	CS	$\geq 10^6$	6	<10	8	I
12	5550		1500	2850	1100	0	CR	$\geq 10^6$	9	<10	9	I
13	2220		450	930	600	150	CR	$\geq 10^6$	10	<10	9	I
14	4080		1840	880	320	880	CS	$\geq 10^6$	10	>10	7	II
15	5520		2240	800	1600	440	CS	$\geq 10^6$	13	<10	10	I
16	8680		3960	2560	480	1520	CS	$\geq 10^6$	10	>10	7	II
17	4600		1480	2760	120	240	CR	$\geq 10^6$	7	<10	8	I
18	10560		3160	6320	1040	0	CS	$\geq 10^6$	6	<10	8	I
19	4720		1960	1240	760	200	CS	$\geq 10^6$	10	>10	7	II
20	5720		1120	3080	400	200	CR	$\geq 10^6$	11	>10	8	I
21	11000		5400	2520	2560	440	CS	$\geq 10^6$	10	<10	9	I
22	5560		3720	1080	560	80	CS	$\geq 10^6$	12	<10	10	I
23	4200		80	1600	1160	960	CR	$\geq 10^6$	10	>10	7	II
24	4800	80	1920	400	440	1920	CS + FL	$\geq 10^6$	10	>10	7	II

*CS=Ciliado Sésil, CR=Ciliado Rastejante, TA=Tecameba, FL=Flagelados

5.4.2 Sistema combinado em escala de bancada

A análise da microfauna foi realizada a partir da observação dos organismos presentes no material colhido nos interstícios do meio suporte do biofiltro aerado submerso durante o período de estudo. A microfauna foi quantificada e classificada de acordo com os grupos funcionais.

Dentre os componentes da microfauna, os zooflagelados foi o grupo mais frequente (46,2%) durante as análises e apresentaram uma abundância média de 2486,2 / mL, seguido pelos ciliados bacterívoros que apresentaram uma frequência de 27,6% e abundância média de 1485,2 /mL, rotíferos que apresentaram uma frequência de 16,7 % e abundância média de 897,0 / mL, tecamebas com frequência de 3,6% e abundância de 130,2 /mL, ciliados carnívoros com frequência de 2,8% e abundância média de 152,5/mL, nematóides com 2,4% de frequência e abundância média de 130,7 / mL, amebas nuas com 0,5% de frequência e abundância média de 26,0 / mL e os anelídeos com frequência de 0,2% e abundância de 13,0 / mL (Tabela 25, Figura 22).

Tabela 25. Frequência relativa e abundância dos grupos componentes da microfauna presente no biofiltro aeróbio submerso, no período de outubro de 2009 a outubro de 2011.

Grupo	Frequência Relativa (%)	Abundância Média (indivíduos/ml)
Ciliados bacterívoros	27,6	1485,2
Ciliados carnívoros	2,8	152,5
Amebas nuas	0,5	26,0
Tecamebas	3,6	130,2
Flagelados	46,2	2486,2
Rotíferos	16,7	897,0
Nematóides	2,4	130,7
Anelídeos	0,2	13,0

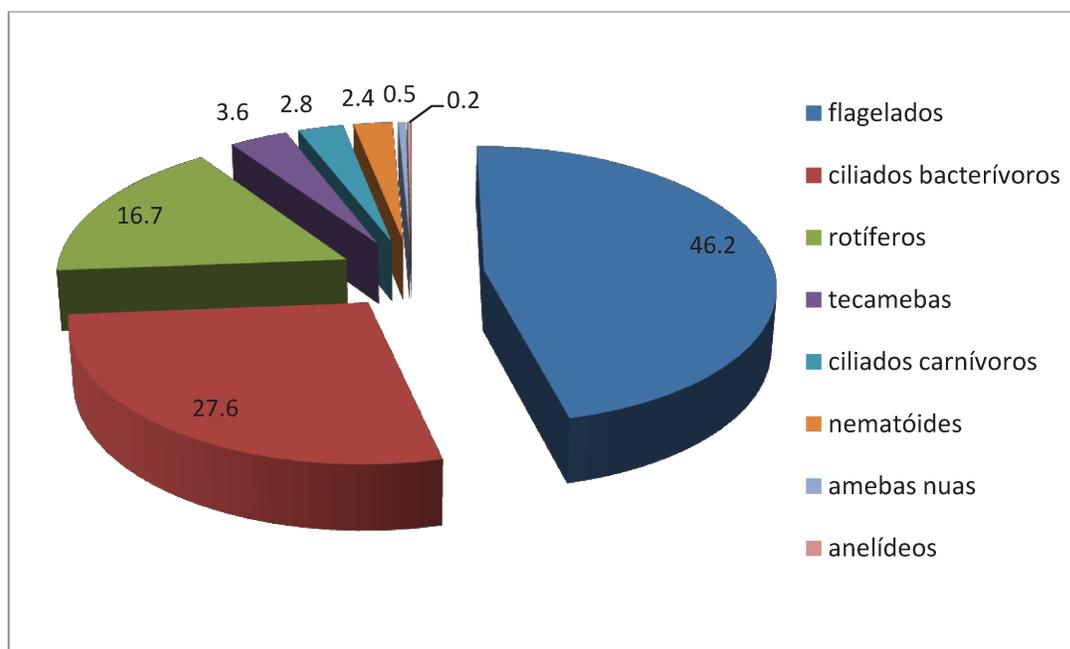


Figura 22. Frequência relativa dos grupos da microfauna presentes no biofiltro aeróbio submerso, no período de outubro de 2009 a outubro de 2011.

Dentre os ciliados bacterívoros observados, os livres natantes foram os mais abundantes, e incluíram *Paramecium aurelia*, *Metopus* sp., *Colpidium* sp., *Halteria grandinela* seguido pelos

sésseis que incluíram *Vorticella* spp. e *Epistylis plicatilis*; ciliados rastejantes, que incluíram *Sterkiella cavicola*, *Chilodonella uncinata*, *Aspidisca cicada*, *Euplotes aediculatus* e ciliados hipotriquídeos não identificados na análise quantitativa. Os ciliados carnívoros observados incluíram o livre natante *Spathidium seppelti foissneri* que foi o mais abundante, seguido pelo ciliado séssil *Podophrya fixa*. As tecamebas observadas foram *Arcella hemisphaerica*, *Centrophyxis* sp. e *Euglypha* sp., sendo a primeira mais abundante. Os espécimes de rotíferos observados foram *Rotaria* sp. Os espécimes de nematóides observados foram *Rhabditis* sp. (Tabela 26).

Tabela 26. Média dos organismos / mL detectados no biofiltro aerado submerso durante os meses de outubro de 2009 a outubro de 2011.

Classificação	Táxon	Frequência (%)	Abundância (no./mL)		
			Mínima	Média	Máxima
Ciliados Bacterívoros					
Livre Natante	<i>Paramecium aurelia</i>	94,2	0	605,7	2670
	<i>Colpidium</i> sp.	20,3	0	78,2	2000
	<i>Metopus</i> sp.	21,7	0	13,6	330
	<i>Halteria grandinella</i>	1,4	0	0,1	10
Rastejante	<i>Chilodonella uncinata</i>	27,5	0	99,0	1000
	<i>Euplotes aediculatus</i>	2,9	0	7,2	267
	<i>Aspidisca cicada</i>	24,6	0	20,8	267
	<i>Sterkiella cavicola</i>	2,9	0	0,6	20
	Hipotrichida	23,2	0	46,1	630
Séssil	<i>Vorticella</i> spp.	60,9	0	560,8	8500
	<i>Epistylis</i> sp.	15,9	0	52,9	1410
Ciliados Carnívoros					
Livre Natante	<i>Spathidium seppelti foissneri</i>	42,0	0	134,7	1800
	Séssil <i>Podophrya fixa</i>	20,3	0	17,9	167
Amebas Nuas		23,2	0	26,0	250
Tecamebas	<i>Arcella hemisphaerica</i>	20,3	0	7,7	141
	<i>Centropyxis</i> sp.	42,0	0	122,5	2859
	<i>Euglypha</i> sp.	30,4	0	65,8	2400
Flagelados		69,6	0	2486,2	100000
Rotíferos	<i>Rotaria</i> sp.	81,2	0	897,0	4667
Nematóides	<i>Rhabditis</i> sp.	40,6	0	130,7	1667
Anelídeos	<i>Aeolosoma</i> sp.	5,8	0	13,0	400

Ao longo do período de estudo *Vorticella* spp., *Paramecium caudatum*, pequenos flagelados, rotíferos e *Aeolosoma* sp. foram os organismos componentes da microfauna com as maiores médias de abundância no lodo do biofiltro aerado submerso (Figura 23).

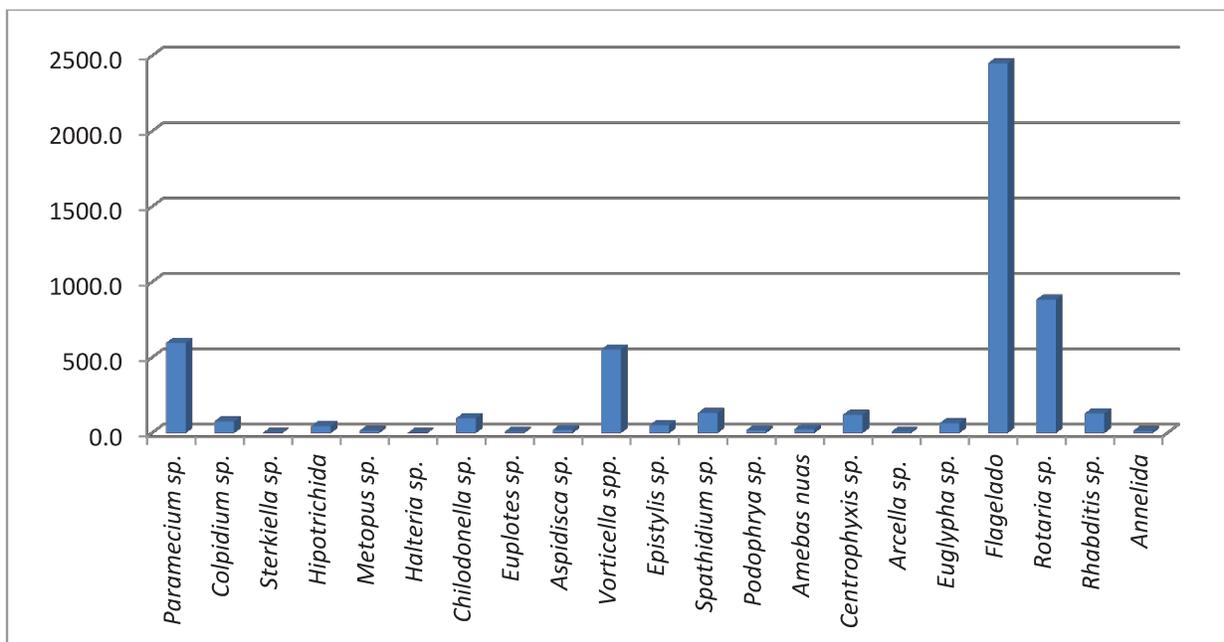


Figura 23. Média dos organismos / mL detectados no biofiltro aerado submerso durante os meses de outubro de 2009 a outubro de 2011.

Entre as espécies de protozoários ciliados registradas no biofiltro aerado, 13 foram encontradas em amostras frescas de lodo analisadas no dia da coleta, sendo que a maioria destes se manteve também em condições de cultivo. Nas culturas, além das espécies observadas no dia da coleta, também foram observados: *Oxytricha* sp., *Tetmemena pustulata*.

A microfauna do biofiltro aerado submerso registrada no presente estudo está representada nas figuras 24, 25 e 26.

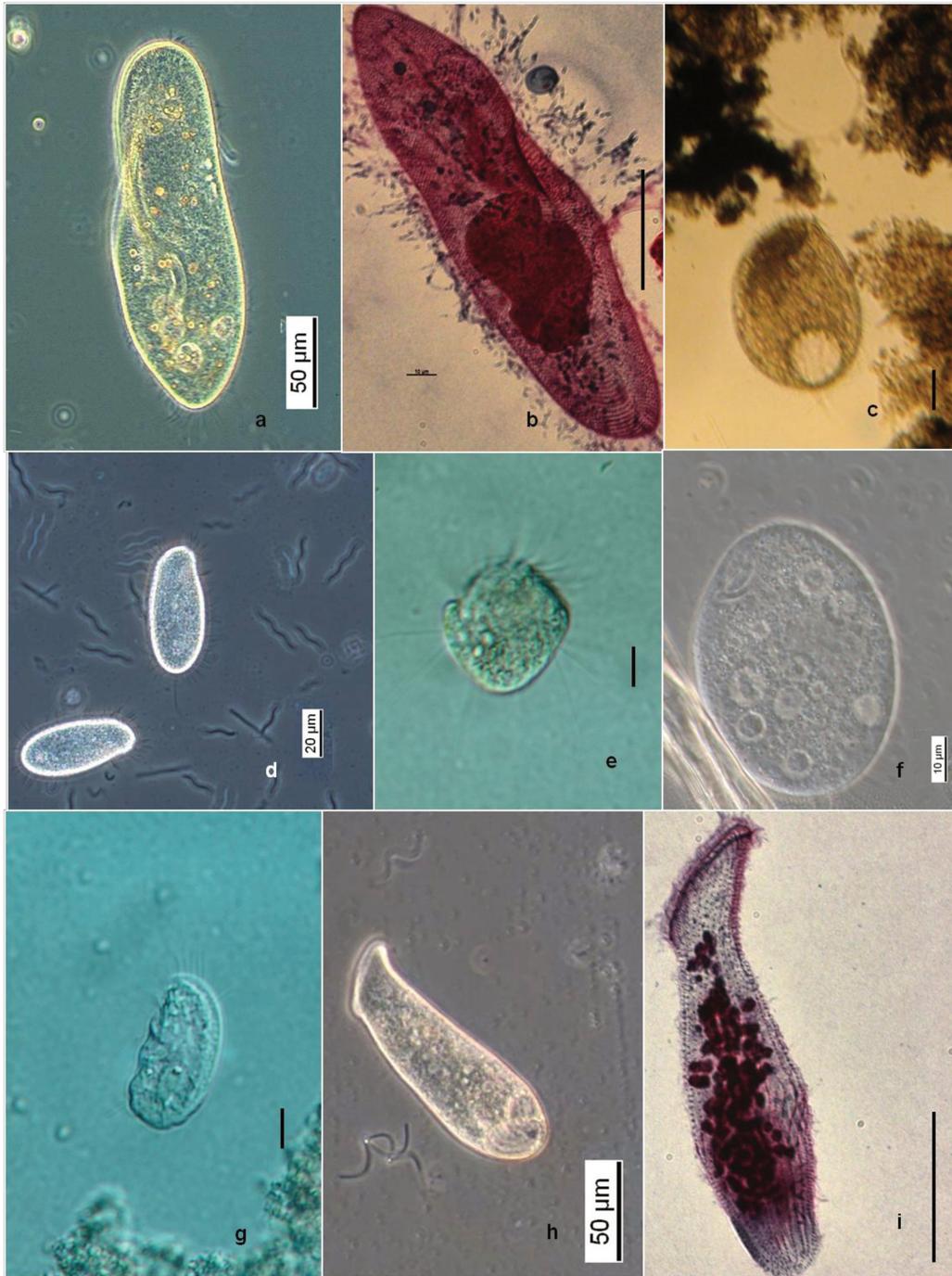


Figura 24. Fotomicrografias de protozoários ciliados livre natantes presentes no biofiltro aerado submerso. a-b *Paramecium aurelia*; c: *Metopus* sp.; d: *Colpidium* sp.; e: *Halteria grandinella*; f: *Glaucoma* sp.; g: *Drepanomonas revoluta.*; h-i: *Spathidium seppelti foissneri*; b, i: espécimes após impregnação pelo protargol. b, i: Barra = 50 µm; c, e, g: Barra = 10 µm



Figura 25. Fotomicrografias de protozoários ciliados rastejantes presentes no biofiltro aerado submerso a: *Chilodonella uncinata*.; b-c: *Acineria uncinata*; d: *Sterkiella cavicola*; e-f: *Euplotes aediculatus*.; g-i: *Aspidisca cicada*; j: *Oxytricha* sp.; k-l: *Tetmemena pustulata*; f, i, l: impregnação pelo protargol. b: Barra = 10 µm; f: Barra = 50 µm

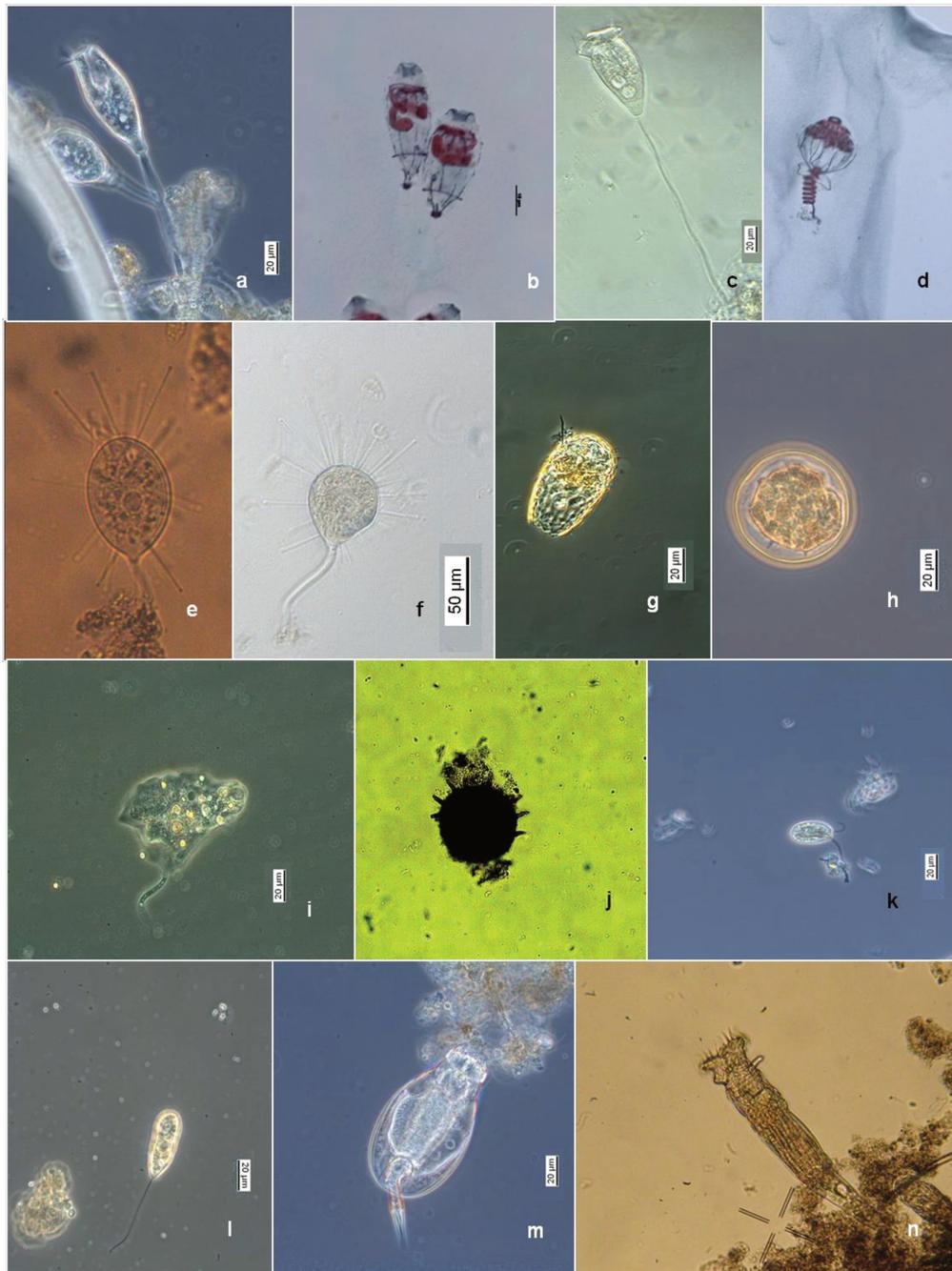


Figura 26. a-f: Fotomicrografias de protozoários ciliados sésseis presentes no biofiltro aerado submerso a-b: *Epistylis plicatilis*; c-d: *Vorticella* sp.; e-f: *Podophrya fixa*.; g-j: Fotomicrografia de amebas g: *Euglypha* sp.; h: *Arcella hemisphaerica*; i: ameba nua; j: *Centropyxis* sp.; k-l: Fotomicrografia de protozoários flagelados k-*Entosiphon* sp.; l: *Peranema* sp.; m: *Lecane* sp.; n: *Rotaria* sp.; b, d: Ciliados impregnados pelo protargol.

O número total de ciliados e flagelados, os grupos dominantes em cada coleta, o Índice Biótico do Lodo (IBL) bem como a classe do lodo por coleta no sistema em escala de bancada estão demonstrados na Tabela 27. Com relação às classes conforme a qualidade do lodo fornecida pelo IBL (Tabela 4), em 78,6 % das coletas o lodo apresentou classe IV, em 12,9 % das coletas foi classe II e em 8,6% foi classe I. Os ciliados livre natantes e os flagelados foram predominantes ao longo das coletas.

Tabela 27. Número total de protozoários ciliados e flagelados, grupos dominantes, Índice Biótico do Lodo (IBL) e classe do lodo por coleta no sistema em escala de bancada.

Amostra	Total Protozoa (n/ml)	Ciliados bacterívoros livre natantes	Ciliados sésseis	Ciliados rastejantes	Tecamebas	Flagelados	Grupo dominante*	Densidade (n/L)	Número total de táxon	Pequenos flagelados (n/ml)	IBL	Classe/Qualidade
1	1600	1000	600	0	0	0	CLN	<10 ⁶	2	<10	1	IV
2	166	100	0	33	0	33	CLN	<10 ⁶	4	>10	0	IV
3	3500	2500	0	0	0	1000	CLN	<10 ⁶	3	>10	0	IV
4	334	334	0	0	0	0	CLN	<10 ⁶	2	<10	1	IV
5	3166	2333	0	833	0	0	CLN	<10 ⁶	3	<10	1	IV
6	3000	2000	0	1000	0	0	CLN	<10 ⁶	3	<10	1	IV
7	1500	1500	0	0	0	0	CLN	<10 ⁶	3	<10	1	IV
8	1000	1000	0	0	0	0	CLN	<10 ⁶	2	<10	1	IV
9	2167	1667	333	167	0	0	CLN	<10 ⁶	3	<10	1	IV
10	501	334	0	0	0	167	CLN	<10 ⁶	3	>10	0	IV
11	1666	1166	333	167	0	0	CLN	<10 ⁶	4	<10	1	IV
12	333	333	0	0	0	0	CLN	<10 ⁶	1	<10	1	IV
13	1532	766	533	233	0	0	CLN	<10 ⁶	4	<10	1	IV
14	1567	400	800	0	0	367	CS	<10 ⁶	4	>10	3	IV
15	2366	0	1233	0	0	1133	CLN	<10 ⁶	3	>10	0	IV
16	2200	333	1400	267	0	200	CLN	<10 ⁶	4	>10	0	IV
17	4832	333	1333	0	167	2999	FL	<10 ⁶	4	>10	0	IV
18	3000	300	700	100	0	1900	FL	<10 ⁶	4	>10	0	IV
19	1632	200	167	366	0	899	FL	<10 ⁶	6	>10	1	IV
20	2133	533	1467	133	0	0	CS	<10 ⁶	3	<10	5	III
21	2400	533	600	600	0	667	FL	<10 ⁶	4	>10	0	IV
22	2000	133	1200	534	0	133	CS	<10 ⁶	6	>10	6	II
23	1233	400	267	566	0	0	CLN	<10 ⁶	4	<10	1	IV
24	15600	133	3067	133	0	12267	CS	<10 ⁶	4	>10	3	IV
25	8834	67	367	33	0	8367	FL	<10 ⁶	4	>10	0	IV
26	100834	667	0	167	0	100000	FL	<10 ⁶	3	>10	0	IV
27	12333	2500	8500	1000	0	333	CS	<10 ⁶	4	>10	3	IV
28	6667	833	5000	667	0	167	CS	<10 ⁶	4	>10	3	IV
29	4400	2200	1000	700	0	500	CLN	<10 ⁶	4	>10	0	IV
30	9800	133	6667	167	0	2833	CS	<10 ⁶	4	>10	3	IV
31	2333	333	267	233	0	1500	FL	<10 ⁶	5	>10	1	IV
32	1133	200	133	200	267	333	FL	<10 ⁶	7	>10	1	IV
33	2467	0	0	0	2467	0	TA	<10 ⁶	2	<10	6	II
34	180	0	20	20	140	0	TA	<10 ⁶	3	<10	6	II
35	620	160	0	60	320	80	TA	<10 ⁶	5	>10	5	III

Tabela 27: Continuação

Amostra	Total Protozoa (n/ml)	Ciliados bacterívoros livre natantes	Ciliados sésseis	Ciliados rastejantes	Tecamebas	Flagelados	Grupo dominante*	Densidade (n/L)	Número total de táxon	Pequenos flagelados (n/ml)	IBL	Classe/Qualidade
36	1360	480	0	0	760	120	TA	<10 ⁶	4	>10	4	III
37	3423	0	0	0	3423	0	TA	<10 ⁶	3	<10	6	II
38	1480	200	0	0	1200	80	TA	<10 ⁶	5	>10	5	III
39	1640	300	0	0	1340	0	TA	<10 ⁶	3	<10	6	II
40	440	100	0	0	280	60	TA	<10 ⁶	4	>10	4	III
41	5860	640	0	0	120	5.100	FL	<10 ⁶	4	>10	0	IV
42	280	0	0	0	260	20	TA	<10 ⁶	4	>10	4	III
43	580	60	0	0	320	200	TA	<10 ⁶	5	>10	5	III
44	620	420	40	40	120	0	CLN	<10 ⁶	6	<10	2	IV
45	1940	1420	220	0	280	20	CLN	<10 ⁶	6	>10	0	IV
46	240	70	0	30	40	100	CLN	<10 ⁶	7	>10	0	IV
47	180	60	0	20	100	0	TA	<10 ⁶	5	<10	7	II
48	60	40	0	0	20	0	CLN	<10 ⁶	2	<10	1	IV
49	500	240	60	60	140	0	CLN	<10 ⁶	7	<10	2	IV
50	960	560	240	80	0	80	CLN	<10 ⁶	5	>10	0	IV
51	1520	800	400	20	140	160	CLN	<10 ⁶	5	>10	0	IV
52	620	40	280	40	40	220	CS	<10 ⁶	5	>10	5	III
53	2260	160	820	60	0	1220	CS	<10 ⁶	4	>10	4	III
54	300	120	20	80	0	80	CLN	<10 ⁶	5	>10	0	IV
55	560	560	0	0	0	0	CLN	<10 ⁶	2	<10	1	IV
56	960	900	0	0	60	0	CLN	<10 ⁶	3	<10	1	IV
57	860	340	20	40	0	460	FL	<10 ⁶	5	>10	1	IV
58	1620	240	60	240	0	1080	FL	<10 ⁶	5	>10	1	IV
59	3720	570	120	630	90	2310	FL	<10 ⁶	8	>10	2	IV
60	5430	270	1650	300	150	3060	FL	<10 ⁶	9	>10	2	IV
61	4440	1290	390	90	90	2580	FL	<10 ⁶	7	>10	1	IV
62	4830	840	60	30	180	3720	FL	<10 ⁶	7	>10	1	IV
63	4840	1320	360	20	200	2940	FL	<10 ⁶	7	>10	1	IV
64	2670	1170	270	150	210	870	CLN	<10 ⁶	7	>10	0	IV
65	2280	450	60	450	90	1230	FL	<10 ⁶	6	>10	1	IV
66	5100	2160	300	420	120	2100	CLN	<10 ⁶	7	>10	0	IV
67	7930	1710	390	150	60	5620	FL	<10 ⁶	8	>10	2	IV
68	4430	2760	330	90	150	1100	CLN	<10 ⁶	8	>10	1	IV
69	3660	2310	180	360	0	810	CLN	<10 ⁶	6	>10	0	IV
70	930	120	90	210	180	330	FL	<10 ⁶	6	>10	1	IV

*CS=Ciliado Sésseis, CR=Ciliado Rastejante, TA=Tecameba, FL=Flagelados

5.5 Avaliação do potencial predatório de espécies de ciliados componentes da microfauna.

Das espécies testadas ao longo do experimento, apenas os ciliados *Euplotes aediculatus* e *Sterkiella cavicola* demonstraram potencial predatório sobre oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. (Figura 27). Os organismos *Aspidisca cicada*, *Blepharisma sinuosum*, *Epistilys plicatilis*, *Gastronauta aloisi* e *Vorticella convallaria* não ingeriram cistos e oocistos, sendo apenas observada interação com essas formas patogênicas, ou seja, a ciliatura somática ou oral dos espécimes tocaram e/ou arrastaram os cistos e oocistos durante a sua movimentação, mas em nenhum momento foi observado a predação.

Quanto ao tempo de exposição dos ciliados às formas patogênicas, foi possível verificar que em um intervalo de tempo de 6 a 40 minutos ocorreu a ingestão de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por *E. aediculatus* e após 20 minutos foi observado espécimes ingerindo cistos de *Giardia* spp. Nos experimentos foi possível observar e quantificar cerca de 1 a 6 oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de 1 a 2 cistos de *Giardia* spp. ingeridos por espécimes de *E. aediculatus*. Em apenas um espécime de *Sterkiella cavicola* foi verificado a predação de cisto de *Giardia* spp. e isso ocorreu após 35 minutos de observação.

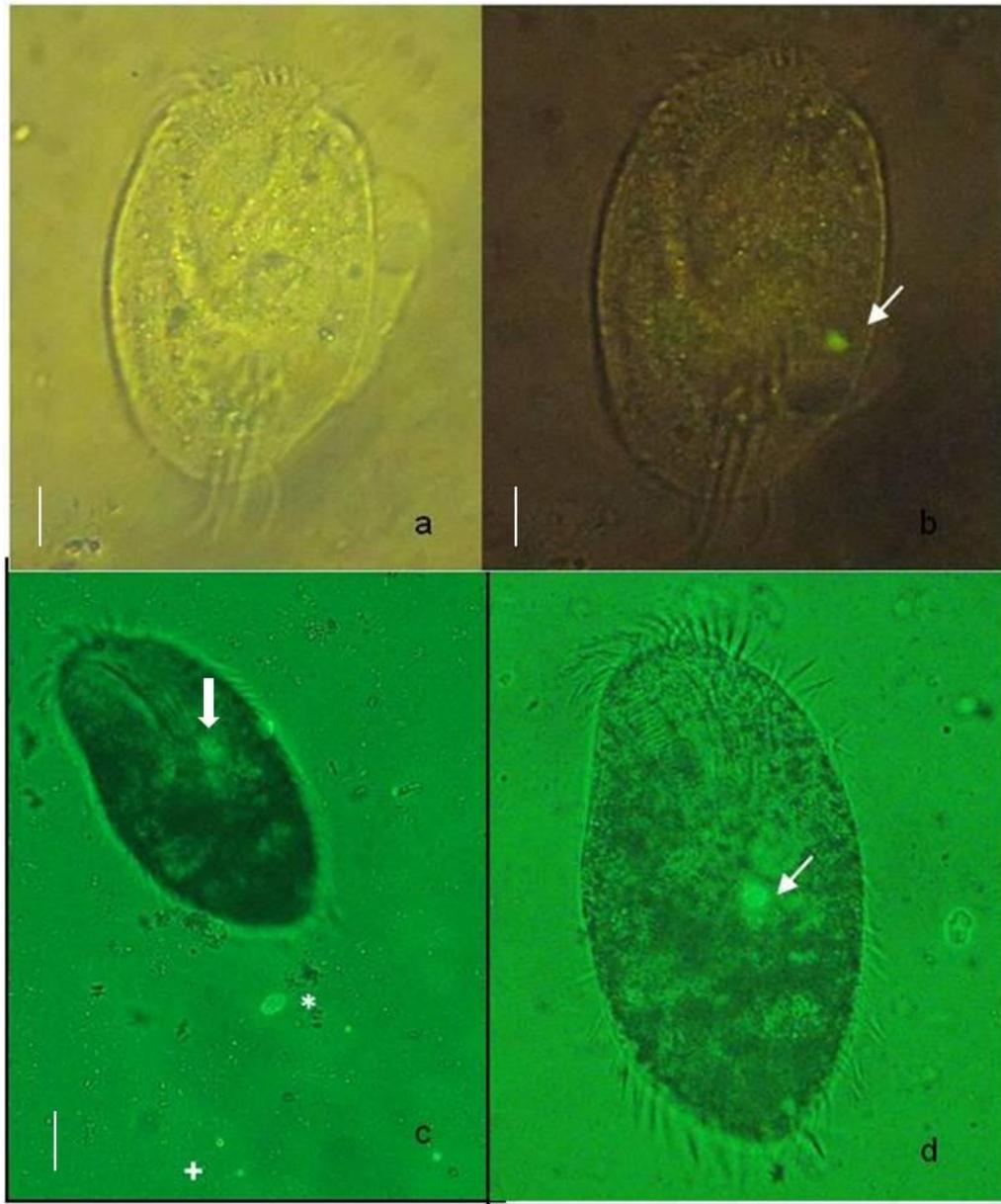


Figura 27. a) *Euplotes aediculatus* em campo claro; b) *E. aediculatus* em imunofluorescência e campo claro após predação de oocisto (seta); c) *Sterkiella cavicola* em imunofluorescência e campo claro após predação de um cisto (seta) e presença de (*) cistos e (+) oocistos próximos ao ciliado; d) *S. cavicola* em imunofluorescência e campo claro após predação de um cisto (seta). Barra = 20 μm

5.6 Análise estatística dos dados

5.6.1 Estação de Tratamento de Esgoto Piçarrão

Os diferentes períodos do estudo foram comparados por meio da Análise da Variância (ANOVA) em relação às concentrações de cistos de *Giardia* spp. detectados no esgoto bruto, sendo que foram observadas diferenças significativas entre os trimestres analisados (Tabela 28).

Tabela 28. Comparação múltipla de médias das densidades de cistos de *Giardia* spp. no Esgoto Bruto entre os trimestres do ano na ETE Piçarrão.

Trimestre	Média cistos / L	Média Log. (cistos / L)	n	Valor F	P	Agrupamento de Duncan*
T2/2010	40.000	10,5967	3	4,73	0,0048	C
T3/2010	133.333	11,5952	3			A,B
T4/2010	160.000	11,9614	3			A
T1/2011	133.333	11,7304	3			A,B
T2/2011	120.000	11,6560	3			A,B
T3/2011	66.667	11,0587	3			B,C
T4/2011	93.333	11,4249	3			A,B
T1/2012	40.000	10,5967	3			C

*Letras iguais não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de comparação múltipla de Duncan.
P= Probabilidade.

Quando comparadas as densidades de cistos detectados no esgoto bruto com os parâmetros físicos e químicos do esgoto bruto, apenas foram observadas correlações negativas significativas entre a densidade de cistos com a concentração de óleos e graxas ($r = -0,670$; $P = 0,001$; $n = 24$), surfactantes ($r = -0,495$; $P = 0,018$; $n = 24$) e sólidos suspensos totais ($r = -0,517$; $P = 0,023$; $n = 24$).

Para as densidades de cistos no efluente tratado e os dados físicos e químicos do mesmo foram observadas correlações positivas significativas com o pH ($r = 0,453$; $P = 0,026$; $n = 24$) e

turbidez ($r = 0,595$; $P = 0,002$; $n = 24$); e correlação negativa significativa com a concentração de óleos e graxas ($r = -0,414$; $P = 0,044$; $n = 24$).

Correlação positiva significativa foi observada entre a densidade de cistos e os ciliados carnívoros ($r = 0,547$; $P = 0,006$; $n = 24$) presentes no tanque de aeração.

Os resultados da correlação linear de Pearson (r) entre a densidade dos grupos de protozoários ciliados do tanque de aeração e os dados físicos e químicos do efluente do RAFA da ETE Piçarrão estão demonstrados na Tabela 29.

Tabela 29. Correlação linear de Pearson (r) entre a densidade dos grupos de protozoários ciliados do tanque de aeração e dados físicos e químicos do efluente do RAFA da ETE Piçarrão.

		Cor	DBO ₅	AOV	AT	AP	ST	SSV
Bacterívoro Séssil	r	0.223	0.458*	0.027	0.464*	0.495*	0.612*	0.569*
	P	0.373	0.047	0.899	0.041	0.014	0.048	0.015
	N	18	23	24	24	24	23	23
Bacterívoro Rastejante	r	0.704**	0.607*	-0.479*	0.603*	0.565*	-0.557*	-0.576*
	P	0.001	0.026	0.018	0.030	0.021	0.035	0.037
	N	18	23	24	24	24	23	23
Carnívoro Livre Natante	r	-0.053	0.787*	-0.198	-0.025	-0.272	-0.075	0.176
	P	0.835	0.047	0.354	0.906	0.198	0.735	0.421
	N	18	23	24	24	24	23	23
Carnívoro Séssil	r	0.623*	0.166	-0.027	-0.224	-0.183	-0.031	-0.032
	P	0.029	0.450	0.899	0.294	0.392	0.887	0.884
	N	18	23	24	24	24	23	23

**Correlação Significativa $p < 0,01$

*Correlação Significativa $p < 0,05$

AOV=Ácidos Orgânicos Voláteis, AT=Alcalinidade Total, AP=Alcalinidade Parcial, ST=Sólidos Totais,

SSV=Sólidos Suspensos Voláteis

Os resultados da correlação linear de Pearson (r) entre a densidade das espécies da microfauna do tanque de aeração e os dados físicos e químicos do efluente do RAFA da ETE Piçarrão estão demonstrados nas Tabelas 30 e 31.

Tabela 30. Correlação linear de Pearson (r) entre a densidade das espécies da microfauna do tanque de aeração e dados físicos e químicos do Efluente do RAFA da ETE Piçarrão.

		pH	Cor	AOV	AT	AP	DBO ₅	DQO
<i>Gastronauta aloisi</i>	r	0.272	0.572*	0.363	0.111	0.202	0.601**	0.184
	P	0.198	0.048	0.031	0.606	0.344	0.004	0.390
	N	24	18	24	24	24	23	24
<i>Acineria uncinata</i>	r	0.083	-0.119	-0.166	0.520*	0.349	0.153	0.078
	P	0.701	0.637	0.438	0.041	0.035	0.486	0.717
	N	24	18	24	24	24	23	24
<i>Aspidisca cicada</i>	r	0.067	0.622*	-0.456*	0.123	0.166	0.532*	0.321
	P	0.755	0.006	0.025	0.566	0.437	0.029	0.127
	N	24	18	24	24	24	23	24
<i>Vorticella spp.</i>	r	0.166	0.597*	0.068	0.415*	0.627*	0.638*	0.471*
	P	0.439	0.010	0.752	0.044	0.001	0.002	0.020
	N	24	18	24	24	24	23	24
<i>Arcella hemisphaerica</i>	r	0.445*	-0.304	-0.077	0.576*	0.066	0.521*	0.774*
	P	0.049	0.220	0.720	0.011	0.758	0.033	0.042
	N	24	18	24	24	24	23	24
<i>Euglypha sp.</i>	r	0.215	-0.141	0.263	0.543*	0.172	0.702*	0.685*
	P	0.312	0.576	0.214	0.001	0.422	0.027	0.039
	N	24	18	24	24	24	23	24
Pequenos Flagelados	r	-0.563*	0.155	0.076	-0.655*	-0.286	0.048	0.204
	P	0.039	0.539	0.724	0.039	0.175	0.827	0.338
	N	24	18	24	24	24	23	24
Rotifera	r	0.498*	0.245	-0.079	0.086	0.265	0.887*	0.547*
	P	0.013	0.327	0.714	0.691	0.211	0.037	0.037
	N	24	18	24	24	24	23	24

**Correlação Significativa $p < 0,01$

*Correlação Significativa $p < 0,05$

AOV=Ácidos Orgânicos Voláteis, AT=Alcalinidade Total, AP=Alcalinidade Parcial

Tabela 31. Correlação linear de Pearson (*r*) entre a densidade das espécies da microfauna do tanque de aeração e dados físicos e químicos do Efluente do RAFA da ETE Piçarrão. (Continuação da Tabela 30)

		ST	SDT	SST
<i>Gastronauta aloisi</i>	<i>r</i>	-0.429*	0.064	-0.196
	<i>P</i>	0.041	0.782	0.358
	N	23	21	24
<i>Acinergia uncinata</i>	<i>r</i>	0.117	-0.484*	-0.289
	<i>P</i>	0.595	0.026	0.171
	N	23	21	24
<i>Aspidisca cicada</i>	<i>r</i>	-0.635*	0.070	0.117
	<i>P</i>	0.027	0.763	0.585
	N	23	21	24
<i>Vorticella</i> spp.	<i>r</i>	0.517*	0.297	0.343
	<i>P</i>	0.048	0.192	0.100
	N	23	21	24
<i>Arcella hemisphaerica</i>	<i>r</i>	0.604*	0.109	-0.160
	<i>P</i>	0.035	0.637	0.455
	N	23	21	24
<i>Euglypha</i> sp.	<i>r</i>	0.527*	-0.082	-0.150
	<i>P</i>	0.016	0.723	0.483
	N	23	21	24
Rotifera	<i>r</i>	0.347	0.193	0.568*
	<i>P</i>	0.104	0.401	0.06
	N	23	21	24

**Correlação Significativa $p < 0,01$

*Correlação Significativa $p < 0,05$

ST= sólidos totais; SDT=sólidos dissolvidos totais; SST=sólidos suspensos totais

A densidade dos grupos de ciliados do tanque de aeração também foi comparada, por meio da correlação linear de Pearson, com os dados físicos e químicos do efluente tratado da ETE Piçarrão. Os resultados estão apresentados na Tabela 32.

Tabela 32. Correlação linear de Pearson (*r*) entre a densidade dos grupos de ciliados do tanque de aeração e dados físicos e químicos do Efluente Tratado da ETE Piçarrão.

		pH	cor	Turbidez	DBO ₅	NKT	ST
Bacterívoro Sésil	<i>r</i>	0,422*	-0,660*	0,257	-0,540*	0,015	-0,544*
	<i>P</i>	0,042	0,030	0,125	0,045	0,930	0,046
	<i>N</i>	37	37	37	37	37	37
Bacterívoro Rastejante	<i>r</i>	0,438*	-0,593*	-0,554*	-0,685*	-0,545**	0,082
	<i>P</i>	0,041	0,016	0,032	0,047	0,006	0,628
	<i>N</i>	37	37	37	37	37	37
Carnívoro Livre Natante	<i>r</i>	-0,022	0,111	-0,039	0,086	-0,168	-0,516*
	<i>P</i>	0,895	0,513	0,820	0,611	0,322	0,011
	<i>N</i>	37	37	37	37	37	37
Carnívoro Sésil	<i>r</i>	-0,180	-0,122	0,004	0,099	-0,040	-0,101
	<i>P</i>	0,286	0,473	0,983	0,559	0,814	0,552
	<i>N</i>	37	37	37	37	37	37

**Correlação Significativa $p < 0,01$

*Correlação Significativa $p < 0,05$

ST=Sólidos Totais, NKT= nitrogênio kjeldahl total

Os resultados da correlação linear de Pearson (*r*) entre a densidade das espécies da microfauna do tanque de aeração e os dados físicos e químicos do efluente tratado da ETE Piçarrão estão demonstrados nas Tabelas 33 e 34.

Tabela 33. Correlação linear de Pearson (r) entre a densidade das espécies da microfauna do tanque de aeração e dados físicos e químicos do Efluente Tratado da ETE Piçarrão.

		OD [#]	pH	cor	Turbidez	Fosfato Total	DBO ₅	DQO	NKT	Nitrato
<i>Gastronauta aloisi</i>	r	0.511*	0.240	-0.553*	-0.551*	0.141	-0.519*	-0.565**	-0.583**	-0.280
	P	0.022	0.159	0.035	0.036	0.418	0.027	0.000	0.000	0.098
	N	35	36	36	36	35	36	35	36	36
<i>Acineria uncinata</i>	r	0.529*	0.499*	0.259	0.110	-0.164	-0.775*	0.246	0.134	-0.063
	P	0.032	0.077	0.127	0.523	0.346	0.027	0.155	0.436	0.714
	N	35	36	36	36	35	36	35	36	36
<i>Aspidisca cicada</i>	r	0.479*	0.145	-0.645*	0.177	0.050	-0.424*	0.249	-0.659*	-0.533*
	P	0.030	0.399	0.039	0.302	0.776	0.016	0.149	0.033	0.047
	N	35	36	36	36	35	36	35	36	36
<i>Vorticella</i> spp.	r	0.618*	0.269	0.098	0.106	0.214	-0.555*	-0.501*	0.090	0.221
	P	0.02	0.113	0.569	0.538	0.217	0.075	0.002	0.600	0.196
	N	35	36	36	36	35	36	35	36	36
<i>Epistylis plicatilis</i>	r	0.599*	0.261	-0.548**	-0.520*	0.018	0.119	0.108	-0.127	-0.016
	P	0.033	0.124	0.006	0.011	0.916	0.489	0.538	0.462	0.926
	N	35	36	36	36	35	36	35	36	36
	N	35	36	36	36	35	36	35	36	36
<i>Arcella hemisphaerica</i>	r	0.558*	0.092	-0.639*	0.006	0.158	-0.453	-0.698	-0.716**	0.030
	P	0.040	0.595	0.038	0.973	0.364	0.137	0.255	0.009	0.864
	N	35	36	36	36	35	36	35	36	36
<i>Euglypha</i> sp.	r	0.116	-0.141	-0.570*	0.149	0.273	-0.091	-0.060	-0.557*	-0.261
	P	0.508	0.412	0.003	0.385	0.113	0.596	0.730	0.023	0.125
	N	35	36	36	36	35	36	35	36	36
Pequenos Flagelados	r	-0.715*	-0.415*	0.612*	-0.084	0.077	0.141	-0.223	0.535*	0.186
	P	0.038	0.039	0.048	0.625	0.659	0.411	0.198	0.039	0.278
	N	35	36	36	36	35	36	35	36	36
Rotifera	r	0.650*	0.155	0.113	0.112	-0.531*	0.203	0.141	0.049	0.210
	P	0.039	0.366	0.513	0.516	0.037	0.236	0.419	0.778	0.219
	N	35	36	36	36	35	36	35	36	36

**Correlação Significativa $p < 0,01$, *Correlação Significativa $p < 0,05$, [#]OD = Oxigênio Dissolvido do Tanque de Aeração. NKT= nitrogênio kjeldahl tota

Tabela 34. Correlação linear de Pearson (*r*) entre a densidade das espécies da microfauna do tanque de aeração e dados físicos e químicos do Efluente Tratado da ETE Piçarrão.

		ST	SDT	SST	Sulfato	Sulfeto
<i>Gastronauta aloisi</i>	r	-0.5131*	0.1109	-0.5227*	0.2149	-0.0375
	P	0.0445	0.5195	0.0183	0.2081	0.8279
	N	36	36	36	36	36
<i>Acineria uncinata</i>	r	-0.626*	0.263	0.670**	0.116	-0.086
	P	0.013	0.122	0.001	0.499	0.618
	N	36	36	36	36	36
<i>Vorticella</i> spp.	r	-0.629*	0.141	0.142	0.099	0.221
	P	0.045	0.411	0.408	0.567	0.195
	N	36	36	36	36	36
<i>Epistylis plicatilis</i>	r	-0.557*	-0.346	0.120	0.294	-0.062
	P	0.033	0.039	0.487	0.082	0.031
	N	36	36	36	36	36
<i>Euglypha</i> sp.	r	-0.614*	-0.146	0.063	0.085	-0.041*
	P	0.041	0.397	0.713	0.621	0.045
	N	36	36	36	36	36
Rotifera	r	-0.729*	-0.630*	-0.046	0.519*	-0.517*
	P	0.033	0.049	0.791	0.001	0.032
	N	36	36	36	36	36

**Correlação Significativa $p < 0,01$

*Correlação Significativa $p < 0,05$

ST=Sólidos Totais, SDT= Sólidos Dissolvidos Totais, SST=Sólidos Suspensos Totais

5.6.2 Sistema Combinado em Escala de Bancada

Os diferentes períodos do estudo foram comparados por meio da Análise da Variância (ANOVA) em relação às concentrações de cistos de *Giardia* spp. detectados no lodo do filtro anaeróbico, sendo que foram observadas diferenças significativas entre os trimestres analisados (Tabela 35).

Tabela 35. Comparação múltipla de médias das densidades de cistos de *Giardia* spp. no lodo do Filtro Anaeróbio, entre os trimestres estudados, do Sistema Combinado em Escala de Bancada.

Trimestre	Média cistos / L	Média log. (cistos / L)	n	Valor F	P	Agrupamento de Duncan*
T4/2009	53333,3	10,5008	3	5,40	0,0045	C
T1/2010	46666,7	10,7318	3			C
T2/2010	73333,3	11,1939	3			B,C
T3/2010	66666,7	11,0980	3			B,C
T1/2011	240000	12,2087	3			A
T2/2011	200000	12,1925	3			A
T3/2011	160000	11,9614	3			A,B

*Letras iguais não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de comparação múltipla de Duncan.
P= Probabilidade.

Quando comparadas as densidades de cistos detectados no filtro anaeróbio com os parâmetros físicos e químicos do esgoto bruto, apenas foi observada correlação positiva significativa entre a densidade de cistos com a concentração de sólidos suspensos totais ($r = 0,451$; $P = 0,037$; $n = 11$). Também houve correlação positiva significativa entre a densidade de cistos no lodo do filtro anaeróbio e a concentração de sólidos suspensos totais no mesmo ($r = 0,438$; $P = 0,022$; $n = 12$).

Para as densidades de cistos no lodo do biofiltro aerado submerso e os dados físicos e químicos do efluente do biofiltro aerado submerso foram observadas correlações positivas significativas com o pH ($r = 0,422$; $P = 0,040$; $n = 17$) e sólidos suspensos totais ($r = 0,630$; $P = 0,035$; $n = 12$).

A densidade dos grupos de ciliados do biofiltro aerado submerso foi comparada, por meio da correlação linear de Pearson, com os dados físicos e químicos do efluente do filtro anaeróbio, o qual alimenta o biofiltro aerado submerso. Os resultados estão apresentados na Tabela 36.

Tabela 36. Correlação linear de Pearson (*r*) entre a densidade dos grupos de ciliados do Biofiltro Aerado Submerso e dados físicos e químicos do Filtro Anaeróbio.

		AP	AT	AOV	DQO	DBO ₅	NTK	NH ₄	SST
Bacterívoros Sésseis	r	0.116	0.114	0.067	0.190	0.447*	0.533	0.550	0.533*
	P	0.506	0.513	0.702	0.273	0.007	0.431	0.631	0.083
	N	35	35	35	35	35	35	35	17
Bacterívoros Rastejantes	r	0.521*	0.594*	-0.512*	0.525*	0.060	0.720*	0.560*	-0.053
	P	0.001	0.000	0.02	0.014	0.734	0.083	0.001	0.840
	N	35	35	35	35	35	35	35	17
Bacterívoros Livre Natantes	r	0.338	0.378	0.613*	0.456**	0.672*	0.378	0.385	0.713**
	P	0.047	0.025	0.03	0.006	0.030	0.025	0.022	0.001
	N	35	35	35	35	35	35	35	17

**Correlação Significativa $p < 0,01$

*Correlação Significativa $p < 0,05$

AP=alcalinidade parcial; AT=alcalinidade total; AOV=ácidos orgânicos voláteis; NTK= nitrogênio kjeldahl total; SST=sólidos suspensos totais

Os resultados da correlação linear de Pearson (*r*) entre a densidade das espécies da microfauna do biofiltro aerado submerso e os dados físicos e químicos do efluente do filtro anaeróbio estão demonstrados nas Tabelas 37 e 38.

Tabela 37. Correlação linear de Pearson (*r*) entre a densidade das espécies da microfauna do Biofiltro Aerado Submerso e dados físicos e químicos do Filtro Anaeróbio.

		pH	Temp.	AP	AT	AOV	DQO
<i>Paramecium caudatum</i>	r	0.509	-0.530	0.293	0.330	-0.021	0.506*
	P	0.015	0.081	0.088	0.053	0.905	0.015
	N	35	35	35	35	35	35
<i>Epistylis</i> sp.	r	0.637*	0.120	-0.372	-0.425	-0.215	0.510*
	P	0.027	0.491	0.028	0.011	0.215	0.014
	N	35	35	35	35	35	35
<i>Vorticella</i> spp.	r	0.227	-0.496	0.520*	0.586**	0.133	0.534*
	P	0.191	0.002	0.012	0.003	0.445	0.028
	N	35	35	35	35	35	35
Hipotrichida	r	0.536*	-0.141	0.596**	0.537**	0.413	0.541**
	P	0.001	0.418	0.002	0.001	0.014	0.001
	N	35	35	35	35	35	35
<i>Podophrya</i> sp.	r	0.076	-0.133	0.500*	0.410*	-0.134	0.519*
	P	0.663	0.445	0.017	0.015	0.441	0.036
	N	35	35	35	35	35	35
<i>Spathidium seppelti foissneri</i>	r	0.247	-0.519*	0.635*	0.521*	0.530	0.115
	P	0.153	0.001	0.043	0.003	0.328	0.510
	N	35	35	35	35	35	35
<i>Euglypha</i> sp.	r	0.464*	-0.545*	0.151	0.233	0.099	0.195
	P	0.009	0.001	0.388	0.178	0.573	0.263
	N	35	35	35	35	35	35
<i>Arcella</i> sp.	r	0.176	0.198	0.737*	0.836*	-0.219	-0.187
	P	0.313	0.253	0.029	0.036	0.207	0.282
	N	35	35	35	35	35	35
<i>Centropyxis</i> sp.	r	-0.046	-0.382	0.257	0.631*	-0.086	-0.006
	P	0.792	0.024	0.135	0.067	0.624	0.973
	N	35	35	35	35	35	35
Flagelados	r	-0.529*	-0.079	-0.539*	-0.402	0.049	0,352
	P	0.010	0.652	0.046	0.017	0.778	0.055
	N	35	35	35	35	35	35
Rotifera	r	-0.120	-0.579**	0.758**	0.806**	0.019	0.533*
	P	0.491	0.004	0,001	0,001	0.914	0.047
	N	35	35	35	35	35	35

**Correlação Significativa $p < 0,01$ *Correlação Significativa $p < 0,05$

AP=alcalinidade parcial; AT=alcalinidade total; AOV=ácidos orgânicos voláteis

Tabela 38. Correlação linear de Pearson (*r*) entre a densidade das espécies da microfauna do Biofiltro Aerado Submerso e dados físicos e químicos do Filtro Anaeróbio.

		NTK	NH ₄	Nitrito	Nitrato	SST	SSV
<i>Paramecium caudatum</i>	<i>r</i>	0.433	0.534*	0.261	0.014	0.601*	-0.333
	<i>P</i>	0.053	0.047	0.130	0.937	0.011	0.191
	N	35	35	35	35	17	17
<i>Aspidisca</i> sp.	<i>r</i>	0.072	0.556*	0.582	0.533	-0.553*	-0.108
	<i>P</i>	0.683	0.750	0.224	0.051	0.040	0.680
	N	35	35	35	35	17	17
Hipotrichida	<i>r</i>	0.427	0.550**	0.405	0.059	-0.343	-0.208
	<i>P</i>	0.001	0.001	0.016	0.736	0.178	0.424
	N	35	35	35	35	17	17
<i>Vorticella</i> spp.	<i>r</i>	0.422	0.440	0.012	0.067	0.511*	0.569*
	<i>P</i>	0.012	0.008	0.947	0.702	0.016	0.048
	N	35	35	35	35	17	17
<i>Spathidium seppelti foissneri</i>	<i>r</i>	-0.001	-0.001	-0.194	0.441	0.504*	0.283
	<i>P</i>	0.994	0.994	0.264	0.008	0.039	0.270
	N	35	35	35	35	17	17
<i>Podophrya</i> sp.	<i>r</i>	0.422	0.422	-0.538*	0.081	0.070	0.001
	<i>P</i>	0.012	0.012	0.026	0.644	0.789	0.997
	N	35	35	35	35	17	17
<i>Arcella</i> sp.	<i>r</i>	0.736*	0.533**	-0.238	-0.151	-0.282	-0.411
	<i>P</i>	0.034	0.005	0.169	0.388	0.273	0.101
	N	35	35	35	35	17	17
<i>Centropyxis</i> sp.	<i>r</i>	-0.528*	0.282	0.153	0.079	-0.216	0.008
	<i>P</i>	0.011	0.101	0.381	0.651	0.406	0.975
	N	35	35	35	35	17	17
Flagelados	<i>r</i>	-0.533*	-0.334*	0.232	-0.016	0.516*	-0.425
	<i>P</i>	0.051	0.050	0.181	0.929	0.034	0.089
	N	35	35	35	35	17	17
Rotifera	<i>r</i>	0.809**	0.813**	0.212	0.084	-0.397	-0.278
	<i>P</i>	0.000	0.000	0.220	0.631	0.115	0.280
	N	35	35	35	35	17	17

**Correlação Significativa $p < 0,01$ *Correlação Significativa $p < 0,05$

NTK= nitrogênio kjeldahl total; SST=sólidos suspensos totais; SSV=sólidos suspensos voláteis

A densidade dos grupos de ciliados do biofiltro aerado submerso foi comparada, por meio da correlação linear de Pearson, com os dados físicos e químicos do efluente do biofiltro aerado submerso (efluente tratado do sistema). Os resultados estão apresentados na Tabela 39.

Tabela 39. Correlação linear de Pearson (r) entre a densidade dos grupos de ciliados do Biofiltro Aerado Submerso e dados físicos e químicos do Biofiltro Aerado Submerso (Efluente tratado).

		Temp.	OD	AP	AT	AOV	DQO	DBO	NTK	NH4	Nitrito
Bacterívoros Sésseis	r	-0.534**	0.509**	0.485*	0.494*	-0.405	-0.719**	-0.636**	-0.409	-0.412	0.339
	P	0.009	0.002	0.023	0.033	0.016	0,001	0.000	0.042	0.032	0.046
	N	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Bacterívoros Rastejantes	r	-0.260	0.713*	0.065	0.077	0.144	-0.591*	-0.502*	-0.553*	-0.542*	-0.590**
	P	0.132	0.047	0.710	0.659	0.409	0.031	0.025	0.046	0.010	0.002
	N	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Bacterívoros Livre Natantes	r	-0.307	0.652*	-0.384	-0.390	-0.370	-0.538**	-0.524**	-0.400	-0.403	-0.105
	P	0.072	0.001	0.023	0.020	0.029	0.001	0.001	0.017	0.016	0.547
	N	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35

**Correlação Significativa $p < 0,01$

*Correlação Significativa $p < 0.05$

AP=alcalinidade parcial; AT=alcalinidade total; AOV=ácidos orgânicos voláteis; NTK= nitrogênio kjeldahl total.

Os resultados da correlação linear de Pearson (r) entre a densidade das espécies da microfauna do biofiltro aerado submerso e os dados físicos e químicos do efluente do biofiltro aerado submerso estão demonstrados nas Tabelas 40 e 41.

Tabela 40. Correlação linear de Pearson (r) entre as espécies da microfauna do Biofiltro Aerado Submerso e dados físicos e químicos do Biofiltro Aerado Submerso.

		pH	Temp.	OD	AP	AT	AOV	DQO	DBO
<i>Paramecium caudatum</i>	r	-0.304	-0.263	0.547	-0.341	-0.347	0.319	-0.531**	-0.498**
	P	0.076	0.126	0.004	0.045	0.041	0.062	0.001	0.002
	N	35	35	35	35	35	35	35	35
Hipotrichida	r	-0.441	-0.161	0.566**	0.530*	0.528*	-0.586	-0.414	-0.423
	P	0.008	0.357	0.000	0.031	0.021	0.000	0.014	0.011
	N	35	35	35	35	35	35	35	35
<i>Epistylis</i> sp.	r	-0.363	-0.109	0.730*	-0.356	-0.355	0.432	-0.425	-0.530*
	P	0.032	0.534	0.020	0.036	0.037	0.009	0.011	0.008
	N	35	35	35	35	35	35	35	35
<i>Vorticella</i> spp.	r	-0.092	-0.535**	0.418	-0.380	-0.393	-0.233	-0.600	-0.570
	P	0.598	0.001	0.012	0.024	0.020	0.178	0.000	0.000
	N	35	35	35	35	35	35	35	35
<i>Spathidium seppelti foissneri</i>	r	-0.169	-0.508**	0.269	0.508*	0.511*	0.046	-0.005	-0.296
	P	0.331	0.002	0.118	0.036	0.024	0.794	0.977	0.084
	N	35	35	35	35	35	35	35	35
<i>Eugypha</i> sp.	r	-0.038	-0.573**	-0.440	0.277	0.286	0.309	-0.358	-0.511*
	P	0.828	0.000	0.008	0.107	0.096	0.071	0.035	0.002
	N	35	35	35	35	35	35	35	35
<i>Arcella</i> sp.	r	0.147	0.192	0.691*	0.582*	0.630*	0.160	0.332	0.270
	P	0.398	0.269	0.016	0.031	0.082	0.360	0.051	0.117
	N	35	35	35	35	35	35	35	35
<i>Centropyxis</i>	r	0.085	0.637*	-0.732	0.283	0.303	0.203	0.392	0.514*
	P	0.627	0.027	0.057	0.100	0.077	0.242	0.020	0.002
	N	35	35	35	35	35	35	35	35
Rotifera	r	-0.553*	-0.553*	0.667*	0.858*	0.866*	-0.623*	-0.840*	-0.836*
	P	0.001	0.031	0.020	0.042	0.033	0.012	0.026	0.031
	N	35	35	35	35	35	35	35	35
Nematoda	r	0.225	-0.538*	0.224	-0.111	-0.121	0.073	-0.252	-0.449*
	P	0.195	0.001	0.195	0.525	0.488	0.676	0.145	0.007
	N	35	35	35	35	35	35	35	35

**Correlação Significativa $p < 0,01$, *Correlação Significativa $p < 0,05$ AT=alcalinidade total, AP=alcalinidade parcial, AOV=ácidos orgânicos voláteis

Tabela 41. Correlação linear de Pearson (*r*) entre as espécies da microfauna do Biofiltro Aerado Submerso e dados físicos e químicos do Biofiltro Aerado Submerso.

		NTK	NH4	Nitrito	Nitrato	SST	SSV
<i>Paramecium caudatum</i>	<i>r</i>	-0.354	-0.357	-0.120	0.125	-0.582	-0.468
	<i>P</i>	0.037	0.035	0.494	0.475	0.050	0.058
	N	35	35	35	35	17	17
<i>Aspidisca</i> sp.	<i>r</i>	-0.053	-0.042	-0.159	-0.553*	0.134	0.123
	<i>P</i>	0.761	0.810	0.362	0.010	0.607	0.639
	N	35	35	35	35	17	17
Hipotrichida	<i>r</i>	-0.543*	-0.554*	0.006	0.364	0.349	0.310
	<i>P</i>	0.021	0.031	0.974	0.032	0.170	0.226
	N	35	35	35	35	17	17
<i>Vorticella</i> spp.	<i>r</i>	-0.398	-0.398	-0.297	-0.054	0.559*	0.127
	<i>P</i>	0.018	0.018	0.084	0.756	0.015	0.628
	N	35	35	35	35	17	17
<i>Arcella</i> sp.	<i>r</i>	-0.346	-0.337	0.575*	0.581*	0.293	0.228
	<i>P</i>	0.042	0.048	0.019	0.045	0.253	0.380
	N	35	35	35	35	17	17
Rotifera	<i>r</i>	-0.878*	-0.875*	-0.134	0.389	-0.034	-0.033
	<i>P</i>	0.000	0.000	0.443	0.021	0.896	0.901
	N	35	35	35	35	17	17

**Correlação Significativa $p < 0,01$

*Correlação Significativa $p < 0,05$

NTK= nitrogênio kjeldahl total, SSV=sólidos suspensos voláteis, SST=sólidos suspensos totais

6. DISCUSSÃO

Com o aumento da população humana, em nível global, tem ocorrido uma crescente escassez de reservas de água doce, principalmente aquelas de boa qualidade. Além disso, em algumas regiões, a diminuição da precipitação anual ou chuvas anuais muito intensas, nas quais a água é fracamente absorvida pelo solo também contribuiu para a escassez. Para resolver o problema da falta de água, tem sido proposto o emprego de efluente de esgoto tratado, quando apresenta baixo nível de contaminantes químicos e microbiológicos, para uso doméstico, industrial e fins agrícolas com alegação de que não representaria ameaça para a saúde humana (CACCIÒ et al., 2003; KUNKEL et al., 2013).

A importância de critérios microbiológicos e parasitológicos rígidos para o controle da contaminação de água de reuso tem sido enfatizada repetidamente. Nos países considerados desenvolvidos as doenças parasitárias mais comuns são causadas pelos protozoários dos gêneros *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e são transmitidos principalmente pela água (KARANIS et al., 2007; DUFOR et al., 2012; KOTHAVADE, 2012). Em países em desenvolvimento, principalmente na Ásia, África e América Latina, cerca de 200 milhões de pessoas apresentam a giardiose sintomática com aproximadamente 500.000 novos casos por ano (SAVIOLI et al., 2006; THOMPSON, 2009; THOMPSON e SMITH, 2011). Giardiose e criptosporidiose são também infecções comuns de animais domésticos e silvestres, os quais lançam um grande número de cistos e oocistos no ambiente (THOMPSON e MONIS, 2012). Estes cistos e oocistos são resistentes aos desinfetantes, na concentração utilizada em estações de tratamento de água para reduzir a contaminação bacteriana (FAYER et al., 2000a; SLIFKO et al., 2000).

As Estações de Tratamento de Esgoto tem um papel fundamental para redução da densidade de contaminantes tanto químicos quanto biológicos a partir do esgoto bruto. Porém, quando ocorrem alterações no desempenho do sistema, o efluente pode oferecer um grande risco para a população, principalmente, se à jusante estiver presente estações de tratamento de água.

6.1 Investigação da presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e avaliação da remoção de cistos e oocistos.

6.1.1 Estação de Tratamento de Esgoto Piçarrão

O sistema básico de tratamento adotado na ETE Piçarrão é de Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente (RAFA) seguido de Lodos Ativado Convencional. Este sistema é considerado mais eficiente se comparado aos sistemas convencionais que utilizam apenas o tratamento anaeróbio ou o tratamento aeróbio isoladamente, pois geram um volume menor de resíduos sólidos, são mais econômicos, produzem efluente de boa qualidade e, além disso, a combinação torna possível a remoção de nitrogênio e, algumas vezes, fósforo (ABREU e ZAIAT, 2008; CHERNICHARO, 2007).

O efluente tratado da ETE Piçarrão é lançado no ribeirão Piçarrão, o qual está classificado como classe 4, conforme Decreto 8468/77 – São Paulo. O mesmo faz parte da Bacia Hidrográfica do rio Capivari, que com exceção deste ribeirão, os demais corpos d'água estão classificados como classe 2.

Conforme o Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, Resolução no. 430/2011 para lançamento de efluentes em corpos d'água classe 4, o efluente da ETE Piçarrão,

durante o período estudado, foi considerado dentro dos limites da legislação, pois teve uma eficiência de remoção de DBO₅ de 89,07 ± 6, o efluente tratado apresentou uma DBO₅ média de 30,06 ± 8,25 mg O₂/ L e média de pH de 7,31 ± 0,30.

Muitos estudos têm identificado altos níveis de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em lodo tratado e lodo de esgoto sem tratamento (CHARLES et al., 2003; RIMHANEN-FINNE et al., 2004; BRIANESCO e BONADONNA, 2005; MONTEMAYOR et al., 2005; CANTUSIO-NETO et al., 2006; GRACZYK et al., 2007, 2008; CHENG et al., 2009). A presença destes protozoários em lodo resultante de um processo de tratamento de esgoto tem um impacto negativo direto sobre a saúde pública. Isto representa um fator de risco, pois se este resíduo não for disposto adequadamente em aterros sanitários, os protozoários podem ser levados através de escoamento superficial para mananciais utilizados para captação de água para ETA, recreação e para utilização na agricultura (CACCIÒ et al., 2003; RIMHANEN-FINNE et al., 2004; GALE, 2005; HUTCHISON et al., 2005).

O efluente tratado de ETE municipais, quando lançado em águas superficiais utilizadas para captação e tratamento para torná-la potável e, fins recreativos, também constitui um fator de risco à saúde quando a ETE não consegue remover de forma adequada estes protozoários (LUCY et al. 2008). Este risco para a saúde pública é de longa duração, pois os oocistos de *Cryptosporidium* e os cistos de *Giardia* spp. podem permanecer infectantes por vários meses no meio ambiente, a dose infectante para ambos é baixa (MEDEMA et al., 2006; NAUMOVA et al., 2007) e outros animais podem se infectar por meio dos mananciais contaminados mantendo o ciclo dos protozoários no ambiente (HUTCHISON et al., 2005).

SATO et al. (2013) pesquisaram *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. na água superficial usada para abastecimento público em quatro regiões do estado de São Paulo com alta densidade

populacional. Os autores observaram que a maioria das amostras que apresentaram positividade para *Cryptosporidium* spp. eram provenientes da região metropolitana de Campinas. Além disso, foram observadas as maiores densidades de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (6 / L) se comparadas às demais regiões estudadas.

Segundo Nasser et al. (2012), a contaminação das águas superficiais por *Giardia* spp., em nível mundial, varia de 26 a 43%, sendo que a concentração de cistos observada em diversos estudos realizados em diversos países variou 0,3 a 100 cistos / L. Com relação ao esgoto bruto, em 25 estudos realizados em 17 países com as mais diversas condições sócio econômicas, 21 (84,6%) apresentaram positividade para *Giardia* spp. com concentrações de cistos que variaram de 0,23 a 100.000 cistos / L (NASSER et al., 2012). Devido às altas taxas de contaminação do esgoto por *Giardia*, o descarte de esgoto não tratado em mananciais que são utilizados como fonte de água para abastecimento público e/ou a aplicação na agricultura podem ser responsáveis por surtos epidêmicos de giardiose colocando toda a população em risco.

As análises realizadas durante os 24 meses na ETE Piçarrão indicaram altas concentrações de cistos de *Giardia* spp. no esgoto bruto com uma média de 98.333 cistos / L. Entretanto, observou-se uma grande remoção de cistos pelo RAFA, sendo que o lodo do RAFA apresentou uma média de 281.167 cistos / L e o efluente do RAFA apresentou uma média de 193 cistos / L. Nota-se um acúmulo de cistos no lodo do RAFA, pois foram encontradas concentrações mais elevadas de cistos neste ponto, se comparado ao esgoto bruto. O efluente do RAFA abastece o tanque de aeração, porém observou-se uma concentração média de 123.667 cistos / L no lodo recirculado do tratamento aeróbio, demonstrando que também ocorre um acúmulo de cistos neste ponto.

A presença de óleos e graxas pode influenciar na detecção dos cistos no esgoto bruto, pois os mesmos apresentam certa hidrofobicidade na membrana cística tendendo a permanecer associados às partículas hidrofóbicas de gordura (HSU e HUANG, 2002). Durante as análises foi utilizada uma solução contendo Tween80® para facilitar a remoção dos cistos destas partículas, porém o resultado da análise da correlação indicou que o teor de óleos e graxas influenciou negativamente na detecção dos cistos no esgoto bruto mesmo utilizando a solução detergente. As amostras de esgoto bruto, após a concentração por meio da centrifugação em solução de eluição, muitas vezes apresentavam um sedimento bastante volumoso em relação ao sobrenadante dificultando a visualização do protozoário durante a análise da lâmina de RID. Tal dificuldade pode explicar a correlação negativa entre a densidade de cistos detectados no esgoto bruto e a concentração de sólidos suspensos totais no mesmo.

Quando correlacionadas as densidades de cistos com os parâmetros físicos e químicos do efluente tratado foram observadas correlações positivas com a turbidez e o pH e, também, foi observada correlação negativa com óleos e graxas. Segundo Cantusio Neto et al. (2010), características da amostra de água, tais como, sílica, presença de ácidos húmicos, bactérias, algas, metais, matéria orgânica em decomposição, bem como variações do pH e da turbidez, são fatores críticos que podem afetar negativamente a sensibilidade das diversas metodologias para detecção de cistos e oocistos.

No mês de janeiro de 2011 iniciou-se a análise do lodo condicionado de esgoto. As maiores concentrações médias de cistos foram observadas no lodo do RAFA e neste ponto (274.667 cistos / L) demonstrando que os cistos ficam retidos no lodo tanto do tratamento anaeróbio (RAFA) quanto do tratamento aeróbio e, após a centrifugação dos lodos excedentes e digeridos, os mesmos ficam concentrados no lodo condicionado.

Neste estudo foram observadas concentrações muito elevadas de cistos de *Giardia* spp., principalmente nas amostras de lodo do RAFA e do lodo condicionado, se comparado a outros estudos já realizados (BONATTI, 2007; CHENG et al., 2009).

Castro-Hermida et al. (2008) avaliaram a prevalência e as concentrações de *Cryptosporidium* spp. e *G. duodenalis* em 12 efluentes de ETE que são liberados em uma bacia hidrográfica da Galícia na Espanha onde há várias áreas de lazer, praias fluviais e áreas de bombeamento para estações de tratamento de água potável. Os autores detectaram cistos e oocistos em todas as amostras de afluente e efluente durante todo o ano de análise. A densidade de cistos de *G. duodenalis* no afluente variou de 89 a 8.305 / L e a densidade de oocistos de *Cryptosporidium* spp. variou de 6 a 350 / L. No efluente tratado as densidades foram de 2 a 390 oocistos / L e 79 a 2.469 cistos / L.

No caso da ETE Piçarrão avaliada, o efluente tratado apresentou baixas concentrações de cistos (média de 65 cistos / L), apresentando eficiência de remoção, que variou de 99,8 a 100% semelhante à observada em outros estudos (CASTRO-HERMIDA et al., 2008; CHENG et al., 2009).

Observou-se que a maior parte dos cistos foi removida por meio do lodo do RAFA, sendo que o lodo produzido pela ETE apresentou concentrações que variaram de 40.000 a 880.000 cistos / L.

Fu et al. (2010) avaliaram a remoção de cistos de *Giardia* spp. por meio de tratamento de esgoto por sistemas biológicos. Os autores observaram que a maior taxa de remoção ocorreu no tanque de oxidação ($2,6 \log_{10}$), seguido por tratamento anaeróbio-anóxico ($2,04 \log_{10}$) e lodo ativado convencional ($1,68 \log_{10}$). Cacciò et al. (2003) obtiveram resultados similares aos de Fu et al. (2010) quando avaliaram tanque de oxidação seguido de sedimentação e lodo ativado

convencional com 94,5% e 72,1 - 88% de remoção, respectivamente. Nasser et al. (2012) sugerem que o longo tempo de retenção do tanque de oxidação pode contribuir para a maior eficiência na remoção dos cistos.

O maior tempo de detenção hidráulica do sistema combinado anaeróbio/aeróbio da ETE Piçarrão pode ter contribuído para as altas taxas de remoção de cistos. A combinação de tratamento anaeróbio (RAFA) seguido de lodo ativado convencional apresenta um tempo de retenção do esgoto de 22 h. O tratamento utilizando somente lodo ativado convencional apresenta normalmente um tempo médio de retenção de 6 horas (SPERLING, 1996).

Lim et al. (2007) defendem a hipótese que o alto tempo de retenção do esgoto em lagoas e em tanques de aeração prolongada é o principal fator para remoção de *Giardia* spp. Os mesmos observaram que o emprego da aeração prolongada e um tempo de retenção de 8 a 24 horas resultou em 96% de remoção de cistos de *Giardia* spp.

Lonigro et al. (2006) observaram altas taxas de remoção de cistos (99,9%) quando avaliaram um sistema de tratamento de esgoto com ultrafiltração. Para a avaliação das amostras de efluente os pesquisadores utilizaram reação de imunofluorescência e *nested* PCR e observaram que algumas amostras estavam livres de cistos.

Vários estudos mostram que os cistos de *Giardia* spp. são muito prevalentes em amostras de esgoto em várias partes do mundo, o que pode refletir as taxas de infecção da população mundial (NASSER et al., 2012). Por consequência, a descarga de esgoto *in natura* ou a sua aplicação na agricultura contribui significativamente para a transmissão de *Giardia* spp. No Brasil, a presença de cistos de *Giardia* spp. já foi detectada em amostras de lodo de esgoto dispostas em leiras, mesmo após 90 dias de exposição à luz solar (BONATTI, 2007),

empregando-se o método de centrífugo-concentração seguida de clarificação com éter (SANTOS et al., 2004).

Ao longo dos 24 meses de estudo, apenas em três destes foram registrados a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de efluente do RAFA, lodo do RAFA e lodo condicionado da ETE Piçarrão. Em outros estudos, utilizando amostras ambientais, já realizados no Brasil (FRANCO et al., 2001; GREINERT et al., 2004; HACHICH et al., 2004; SANTOS et al., 2004; CANTUSIO-NETO et al., 2006; GUIGUET-LEAL, 2008; SATTO et al., 2013) e em outros, ao redor do mundo, (CACCIÒ et al., 2003; LIU et al., 2011; KISTEMANN et al., 2012; GALLAS-LINDEMANN et al., 2013) também se observa uma menor detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em relação a cistos de *Giardia* spp.

Os oocistos apresentam carga superficial negativa que resulta no aumento das forças eletrostáticas com determinadas partículas de carga diferentes (positivas) promovendo uma maior adesão destes com diferentes partículas e sedimentos (SEARCY et al., 2005). Desta forma, a recuperação de oocistos a partir de amostras ambientais pode ser dificultada, devido a essas interações eletrostáticas, mesmo quando se utiliza solução surfactante que interage com a carga superficial dos oocistos.

Alguns estudos tem demonstrado a capacidade de rotíferos e ciliados (FAYER et al., 2000b; STOTT et al., 2001; STOTT et al., 2003) em predação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. presentes em sistemas de tratamento aeróbios.

Neste estudo, verificou-se correlação positiva entre a densidade de cistos de *Giardia* spp. e ciliados carnívoros presentes no tanque de aeração. Apesar dos ciliados carnívoros não atuarem diretamente na remoção de bactérias e outras partículas do meio, eles podem contribuir de forma indireta na remoção destas, uma vez que exercem a predação dos ciliados bacterívoros.

6.1.2 Sistema combinado em escala de bancada

O sistema construído em escala de bancada, assim como a ETE Piçarrão, também apresenta a combinação de tratamento anaeróbio e aeróbio. A principal diferença entre os dois sistemas é a forma como a biomassa se desenvolve, no sistema em escala de bancada a biomassa permanece aderida, o que aumenta bastante a idade do lodo em relação a sistemas em que a biomassa desenvolve-se dispersa.

O sistema combinado anaeróbio/aeróbio visava à remoção de nitrogênio total (nitrificação-desnitrificação). A melhor condição operacional do sistema foi obtida com a razão de recirculação $q/Q = 4,0$, o que ocasionou taxas de aplicação hidráulica, de 2,3 e 4,2 m^3 / m^2 d (TDH de 5,0 e 2,7 horas) para o FA e BAS, respectivamente (FOCO, 2010). Nestas condições as eficiências de remoção de DQO, NTK e NT foram de $92 \pm 4\%$, $94 \pm 8\%$ e $83 \pm 8\%$, respectivamente, com concentrações médias efluentes de 49 ± 10 mg DQO / L, $1,1 \pm 0,6$ mg $N-NH_4^+$ / L, $2,2 \pm 1,1$ mg N-org / L, $0,12 \pm 0,11$ mg $N-NO_2^-$ / L e $8,1 \pm 2,6$ mg $N-NO_3^-$ /L. Essas condições são consideradas ótimas para um sistema que visa além da remoção da matéria orgânica carbonácea a remoção de nitrogênio total (FOCO, 2010).

Além da avaliação da remoção de parasitos em um sistema alternativo, salienta-se que grande parte do esgoto utilizado no sistema era proveniente do Hospital das Clínicas da UNICAMP. O esgoto hospitalar apresenta uma grande variedade de compostos químicos utilizados em tratamento, limpeza e desinfecção. Além disso, apresenta uma imensa variedade de patógenos que são eliminados principalmente pelas fezes e urina. O tratamento adequado deste tipo de esgoto é de fundamental importância para proteção dos mananciais e para proteção da saúde pública. Os protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. estão muito presentes em esgoto domésticos porém, estudos sobre a quantificação de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.

e a remoção destes, por meio de um sistema que trata esgoto hospitalar, ainda são pouco realizados.

Os resultados das análises parasitológicas realizadas mostram elevadas concentrações de cistos de *Giardia* spp. no lodo acumulado do filtro anaeróbio (FA) com média de 130.000 / L, concentrações menores no lodo acumulado no biofiltro aerado submerso (BAS) com média de 44.000 / L e uma menor observação no lodo proveniente do decantador (DEC), onde apenas foram detectados cistos nos meses de março a julho de 2011 com média de 40.000 / L. Estes resultados foram semelhantes aos observados na ETE Piçarrão, onde a maior parte dos cistos de *Giardia* spp. foi removida pelo RAFA e concentrou-se no lodo condicionado da ETE.

No mês de janeiro e fevereiro de 2011 foram detectadas concentrações elevadas de cistos de *Giardia* spp. de 360.000 cistos / L e 280.000 cistos / L, respectivamente. Estas concentrações elevadas podem ser atribuídas ao período entre agosto de 2010 e fevereiro de 2011, quando não houve descarte de lodo e ocorreu acúmulo de lodo. A remoção média no FA foi de $63,4 \pm 17,4\%$. A remoção no BAS foi de praticamente 100% durante todo o estudo. Porém, entre os meses de março a junho de 2011 o sistema de aeração apresentou problemas e o BAS ficou comprometido ocorrendo detecção de cistos de *Giardia* spp. no lodo do decantador. Assim, não houve remoção de cistos no sistema aeróbio nos meses de março e maio de 2011, mostrando que a aeração é de fundamental importância para a manutenção da biomassa e por consequência, remoção dos cistos. Nos meses seguintes, até julho de 2011, o sistema voltou a operar normalmente e os cistos passaram a ser removidos pelo BAS.

Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. por apresentarem tamanho bastante reduzido, variando de 3 a 8 μm , podem ser envolvidos por sólidos presentes no lodo impedindo a sua visualização por meio da microscopia de fluorescência. Isto pode ter ocorrido no mês de

novembro/2009 o que explicaria a sua detecção apenas no lodo do BAS. No mês de janeiro/2010 foram detectados oocistos no lodo do FA, porém não foram encontrados no BAS, demonstrando que o sistema anaeróbio, assim como ocorreu na ETE Piçarrão, foi eficiente na remoção de oocistos.

Segundo Searcy et al., (2006), a associação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. com comunidades que compõem o biofilme pode influenciar na propagação deste protozoário pelo meio ambiente e pelos processos de tratamento de água. Os pesquisadores observaram a captura e retenção de oocistos de *Cryptosporidium*, sob condições laboratoriais, em biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. Após a captura, os mesmos permaneceram retidos no biofilme por mais de 24 horas e, após este período foram liberados no meio.

Segundo Rogers e Keevil (1995), os oocistos de *Cryptosporidium* spp. podem residir vários meses em camadas de biofilme, tais como aqueles dentro de tubos de distribuição de água e, em seguida, serem relançados ao meio. Além disso, sabe-se que determinados protozoários de vida livre e rotíferos são capazes de alimentar-se sobre camadas de biofilme e/ou sobre a microfauna associada (SIBELLE et al., 1998).

Essa associação ao biofilme pode ter influenciado na retenção dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e, possivelmente também dos cistos de *Giardia* spp. no sistema estudado, pois o mesmo é constituído por biomassa aderida. O biofilme é composto por uma matriz heterogênea de substâncias poliméricas extracelulares compostas de polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, na qual estão presentes os micro-organismos produtores destas substâncias, outros organismos associados e partículas coloidais que se depositam (COSTERTON et al., 1995). As características morfológicas e químicas dos biofilmes oferecem condições adequadas para deposição e retenção de oocistos de *C. parvum* (SEARCY et al., 2006).

6.2 Caracterização molecular das espécies de *Giardia* e *Cryptosporidium*

O método 1623 (USEPA, 2005) e, atualmente, o método 1623.1 (USEPA, 2012) da Agência de Proteção Ambiental dos EUA são referência mundial para análise de amostras ambientais. O método 1623.1 preconiza a utilização de ensaio de imunofluorescência para detecção dos cistos e oocistos e a confirmação utilizando marcação com DAPI e visualização dos organismos por meio de DIC. Os métodos moleculares não são utilizados rotineiramente para detecção das espécies de *Giardia* e *Cryptosporidium* em amostras ambientais (KOTHAVADE, 2012), sendo, normalmente empregados como ferramenta complementar nestas análises.

Neste trabalho, as amostras positivas para cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram caracterizadas molecularmente visando conhecer as fontes de contaminação do esgoto e o risco associado para humanos dependendo do modo de transmissão de cada espécie (espécies zoonóticas ou antroponóticas).

6.2.1 *Cryptosporidium* spp.

Todas as amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. por meio da RID, quatro da ETE Piçarrão e duas do sistema em escala de bancada, também foram positivas pela *Nested* PCR. As amostras concentradas apenas por centrifugação e sem a separação imunomagnética (IMS) apresentaram melhor concentração do material genético e puderam ser genotipadas.

Mesmo utilizando os testes de diluição, as amostras com IMS apresentaram resultados positivos com a presença de bandas fracas na reação de *Nested-PCR*. Observou-se a presença da banda correspondente ao fragmento de 826 pb apenas nas primeiras reações de amplificação sugerindo uma possível degradação do material genético nas reações subsequentes. Anceno et al. (2007), visando à redução dos custos nas análises moleculares, propôs um protocolo para utilização da PCR sem a purificação prévia das amostras por meio da IMS. Os pesquisadores

obtiveram bons resultados melhorando a técnica de extração dos cistos e oocistos empregando tiocianato de guanidina e etapa de sonicação. No presente trabalho, mesmo utilizando apenas o kit comercial, os resultados das análises sem a etapa da IMS foram melhores e sugerem que esta etapa pode ser suprimida em testes posteriores, o que contribuiu para redução do custo das análises.

O sequenciamento das amostras resultou em perfis compatíveis com *C. hominis* e *C. parvum*, sendo que das amostras da ETE Piçarrão, uma amostra foi compatível com *C. hominis* e três com *C. parvum* e as duas amostras do sistema em escala de bancada foram compatíveis com *C. hominis*.

C. parvum e *C. hominis* são as principais espécies infectando tanto os hospedeiros humanos imunocompetentes como os imunocomprometidos. Diversos estudos têm indicado que em todo o mundo, mais de 90% das infecções nos seres humanos são causadas por *C. hominis* e *C. parvum*, embora a percentagem real dos casos atribuída a cada espécie varia geograficamente (LEONI et al, 2006;. XIAO e RYAN, 2004; XIAO e FENG, 2008). *C. parvum* infecta bovinos e outros ruminantes, além do homem; apresenta, portanto, um ciclo zoonótico (FRANCO, 2007). *C. hominis* é naturalmente infectante para seres humanos e macacos *Rhesus*, embora já tenha sido encontrado em peixe-boi marinho (MORGAN et al., 2000), caprinos, ovinos e bovinos (CHALMERS e KATZER, 2013). Assim, *C. hominis* tem um ciclo predominantemente antroponótico (FELTUS et al., 2006) As espécies *C. parvum* e *C. hominis* são as principais espécies incriminadas nos surtos de veiculação hídrica, nos últimos 25 anos (FRANCO, 2007).

A presença de *C. parvum* e *C. hominis* nas amostras provenientes da ETE Piçarrão está de acordo com a característica do esgoto que chega a ETE, onde em alguns pontos ocorre a mistura clandestina de águas pluviais ao esgoto doméstico nos períodos de chuva intensa. Nas ETE do

município de Campinas é proibida a ligação das águas pluviais à rede de esgoto. Porém, a Coordenadoria de Cadastro Técnico, da Gerência de Controle de Perdas e Sistemas da SANASA realiza mensalmente cerca de 2.500 vistorias e emite aproximadamente 200 notificações para moradores que despejam água da chuva na rede coletora (SANASA). A ETE Piçarrão está localizada em uma região do município de Campinas, onde poder ser observada, além da intensa urbanização, também áreas de pequenas fazendas com criação animal.

O achado de *C. hominis* no esgoto tratado pelo sistema em escala de bancada é coerente por tratar-se de esgoto hospitalar o qual recebe o esgoto das enfermarias de Moléstias Infecciosas e Pediatria do Hospital das Clínicas da UNICAMP, onde estão os indivíduos pertencentes aos principais grupos de risco de aquisição de *C. hominis*. Os oocistos foram detectados em apenas dois meses no sistema em escala de bancada, porém apresentando concentrações bastante elevadas (20.000 - 40.000 oocistos / L) indicando que a concentração dos mesmos nas fezes deve ser alta. Um estudo com crianças de creches no Reino Unido, utilizando na análise das fezes a separação imunomagnética e microscopia de imunofluorescência, relatou uma concentração de 13.367 oocistos por grama de fezes nas crianças infectadas com *C. hominis*, já nas crianças com *C. ubiquitum* a concentração de oocistos por grama de fezes foi de 3.471 (DAVIES et al., 2009).

Uma revisão de estudos de epidemiologia molecular parece indicar que, em países em desenvolvimento, as infecções por *Cryptosporidium* spp. são adquiridas principalmente através da transmissão antroponótica, sendo *C. hominis* responsável por 70 a 90% das infecções humanas (XIAO e FAYER, 2008; XIAO e FENG, 2008).

6.2.2 *Giardia* spp.

Todas as amostras positivas para *Giardia* spp. por meio da reação de imunofluorescência provenientes da ETE Piçarrão foram caracterizadas molecularmente e 75% (18/24) foram aferidas como positivas pela PCR (Figura 5) e puderam ser sequenciadas.

A maior parte das amostras sequenciadas apresentou perfil compatível com a assembleia AII (12 amostras) que sugere uma origem antroponótica dessas amostras (BOWMAN e LUCIO-FOSTER, 2010). Além disso, duas amostras foram identificadas como pertencentes à assembleia BIV também comumente associada a amostras clínicas humanas. Quatro amostras pertencentes à assembleia C que costuma ser identificada em cães e gatos. Na ETE Piçarrão, possivelmente, ocorre à mistura clandestina entre águas pluviais e o esgoto doméstico o que contribui para que fezes de animais estejam presentes no esgoto da cidade. Além disso, muitas pessoas tem a prática de colocar fezes de animais domésticos nos vasos sanitários.

Com relação ao sistema em escala de bancada, tratando esgoto hospitalar, 15 amostras foram analisadas, 12 foram positivas por meio da PCR e foram sequenciadas. A assembleia A foi a mais frequente sendo observada em 7 amostras e, dentre elas, 6 puderam ser sub genotipadas e resultaram em perfil compatível com assembleia AII. A assembleia B foi observada em 3 amostras, sendo que 2 resultaram em perfil compatível com a assembleia BIV e uma amostra foi identificada como pertencente à assembleia C.

Segundo Thompson (2004), os subgenótipos AII e BIV apresentam potencial antroponótico e os subgenótipos AI e BIII, potencial zoonótico. Estudos realizados em várias regiões do mundo demonstraram que o subgenótipo AII de *G. duodenalis* é o mais comumente associado com a infecção em seres humanos (CACCIÒ e RYAN, 2008; XIAO e FAYER, 2008). Já os animais são frequentemente parasitados pelo subgenótipo AI de *G. duodenalis*; o subgenótipo AII é mais

raramente detectado em animais, embora tenha sido identificado em amostras fecais de cães e gatos e outros hospedeiros vertebrados (XIAO e FAYER, 2008; SPRONG et al, 2009; BALLWEBER et al, 2010).

Devido à inconstância das delimitações da assembleia A, ainda ocorrem problemas para a realização de associações dentro das sub-assembleias que incluem cães, gatos e humanos, mas a maioria das evidências sugere que na maioria das vezes cães e gatos estão infectados com as assembleias C, D, e F e, em algumas ocasiões, AI (BOWMAN e LUCIO-FOSTER, 2010).

Até o momento, os genótipos C, D, E, F, e G, são considerados hospedeiros específicos de outros animais, com potencial zoonótico mínimo (CACCIÒ e RYAN, 2008; THOMPSON e SMITH, 2011). Os genótipos C e D tipicamente infectam os canídeos, mas também foram encontrados em gatos (CACCIÓ e RYAN, 2008).

Apesar da especificidade parasitária de *G. duodenalis* pertencente ao genótipo C ser amplamente associada à infecção de cães, recentemente, foi relatada a ocorrência deste genótipo em fezes humanas, por meio da amplificação de fragmentos do gene *β-giardina* e sequenciamento (SOLIMAN et al, 2011).

6.3 Avaliação da microfauna do lodo ativado

Os processos biológicos de tratamento de esgoto visam reduzir a carga de poluição a níveis aceitáveis e produzir um efluente clarificado. Estes processos podem ser considerados como ecossistemas construídos submetidos a condições extremas. Os microrganismos presentes no esgoto, principalmente bactérias e protozoários desempenham um papel fundamental, e sua caracterização se torna um indicador importante no controle operacional do processo. A análise

microbiológica traz informações importantes que se relacionam com o comportamento do processo de tratamento biológico (MADONI, 2011; MADONI, 1994; 1993)

Os protozoários são um dos componentes mais comuns nestes ecossistemas artificiais e desempenham um papel importante nos processos de purificação de águas residuárias. Os protozoários são responsáveis por melhorar a qualidade do efluente, mantendo a densidade de populações dispersas bacterianas por predação. Os estudos das relações entre protozoários e os parâmetros físicos e químicos e operacionais têm revelado que a estrutura de espécies destas comunidades é um indicador de eficiência da ETE (MADONI, 2011).

Dos organismos que compõem a microfauna do lodo ativado da ETE Piçarrão, os protozoários, em especial os ciliados, foram os grupos mais frequentes e abundantes ao longo do presente estudo. Os ciliados são geralmente os protozoários mais abundantes nas comunidades de sistemas de tratamento de esgoto (MADONI, 2011). A função primária dos ciliados no sistema é a clarificação do efluente e na ausência destes organismos, o efluente apresenta elevadas DBO_5 e turbidez devido à presença de bactérias (VELESSARD & BIHAN, 2003).

6.3.1 Estação de Tratamento de Esgoto Piçarrão

Entre as espécies de protozoários ciliados registradas na ETE Piçarrão, 25 foram encontradas em amostras frescas de lodo ativado analisadas no dia da coleta e 11 ocorreram apenas nas culturas, totalizando 36 espécies de protozoários. Dubber e Gray (2011a), em estudo realizado em 11 ETE na Irlanda que empregavam diversos sistemas de tratamento aeróbio, encontraram no total 24 espécies de protozoários ciliados pertencentes a 20 gêneros; Martín-Cereceda et al. (1996) encontraram 23 espécies de protozoários ciliados e 16 gêneros quando estudaram várias estações de tratamento de esgoto por lodos ativados. Ressalta-se que no

presente trabalho foram identificadas as espécies, por meio da técnica de impregnação com protargol, e os resultados foram correlacionados com os parâmetros físicos e químicos e são poucos os trabalhos que tem esta abordagem (DUBBER e GRAY, 2011a; LEE et al., 2004; MADONI, 2003).

As espécies mais comumente encontradas na ETE Piçarrão, as quais incluíram *Vorticella* spp. (94,7%), *Aspidisca cicada* (97,4%), *Gastronauta aloisi* (86,8%), *Acineria uncinata* (84,2%), *Epistylis plicatilis* (84,2%), foram semelhantes aos ciliados identificados com maior frequência em outros estudos. Dubber e Gray (2011a), em estudo que avaliou a comunidade de protozoários em onze ETE na área metropolitana de Dublin na Irlanda, observaram com maior frequência os ciliados *Acineria uncinata*, *V. convallaria*, *Epistylis entzii*, *A. cicada* e *Trithigmostoma cucullulus*. Cockburn (1970), em pesquisa realizada em ETE do Reino Unido, encontrou com maior frequência *A. uncinata*, *V. convallaria*, *V. microstoma*, *V. alba*, *Opercularia coarctata*, *Euplotes moebiusi* e *A. cicada*. Madoni et al. (1993) compararam a microfauna do lodo ativado de 17 estações de tratamento de águas residuais na Itália e também observou *V. convallaria*, *A. cicada* e *A. uncinata* como sendo as espécies mais comuns no lodo ativado. Martin-Cereceda et al. (1996), estudando lodos ativados, observaram com maior frequência ciliados dos gêneros *Vorticella* spp. (93%) e *Epistylis* spp. (85%).

As espécies *Paramecium aurelia* (2,6%), *Metopus* sp. (5,3%), *Chilodonella uncinata* (7,9%), *Drepanomonas revoluta* (5,3%), *Euplotes aediculatus* (13,2%), *Carchesium* sp. (5,3%) e *Opercularia* sp. (18,4%) foram encontrados com menor frequência e abundância em todas as amostras.

Considerando a abundância relativa dos grupos da microfauna, os resultados do presente estudo corroboram com aqueles obtidos por outros autores (MADONI, 1994; MARTIN-

CERECEDA et al., 1996; ZHOU et al., 2008), que observaram que os ciliados sésseis e os rastejantes são os grupos mais representativos em tanques de aeração com lodo ativado em condição estável.

Portanto, as populações de ciliados que predominaram no tanque de aeração da ETE Piçarrão foram os ciliados sésseis e rastejantes que se desenvolvem associados ao floco. Os ciliados sésseis e os rastejantes são mais bem adaptados ao lodo ativado devido sua capacidade de associar-se aos flocos; sendo os sésseis firmemente fixados por um pedúnculo enquanto os rastejantes apresentam cirros ou cílios para mover sobre a superfície do floco (ZHOU et al. 2008)

Liu et al. (2008), também observaram a mesma predominância estudando sistema combinado anaeróbico/anóxico/aeróbico. Segundo Madoni (1994), a predominância destes grupos indica uma estabilidade dinâmica em um ecossistema de lodos ativados muito eficiente. Outros estudos também observaram que a predominância de ciliados sésseis e rastejantes indica estabilidade do tanque de aeração e eficiência na clarificação do efluente (MARTÍN-CERECEDA et al, 1996; SALVADÓ et al, 1995).

Quando calculado o índice biótico do lodo (IBL) da ETE Piçarrão (Tabela 24) e observadas às classes de qualidade (Tabela 4) (54% das amostras, classe I; e 46%, classe II), verificou-se estabilidade do sistema durante todo o estudo. Segundo Madoni (1994), um sistema de lodos ativados que apresenta na maior parte do tempo lodo classe I é considerado bem colonizado apresentando estabilidade do lodo com excelente atividade biológica e ótimo desempenho do sistema. Neste caso, o IBL foi uma ferramenta útil e fidedigna para avaliação da qualidade do lodo da ETE Piçarrão.

Quando correlacionados os grupos predominantes e os dados físicos e químicos verificou-se que os ciliados bacterívoros sésseis apresentaram correlação positiva com os sólidos totais do

efluente do RAFA (afluente), indicando que este grupo é importante na remoção do material particulado que chega ao tanque de aeração, pois quando correlacionados com os parâmetros do efluente tratado, observou-se correlação negativa com a cor, DBO₅ e sólidos totais. As espécies de *Vorticella* spp. apresentaram correlação positiva com a cor, alcalinidade parcial e DBO₅ do afluente e correlação negativa com DBO₅ do efluente tratado indicando que, provavelmente, é um dos grupos mais importantes dentro dos ciliados sésseis na remoção de matéria orgânica. Papadimitriou et al. (2010), estudando a microfauna de leitos cultivados (*wetlands*), também verificaram correlação negativa entre *Vorticella* spp. e DBO₅ do efluente sugerindo que estas espécies são importantes na remoção de compostos orgânicos do esgoto.

Ntougias et al. (2011), estudando um sistema com aeração intermitente, observaram correlação positiva entre os ciliados sésseis, os sólidos em suspensão, a DBO₅ e a concentração de amônia do afluente. Os mesmos autores observaram um aumento na abundância de ciliados sésseis quando a carga orgânica aumentou de 0,403 kg de DBO₅/ m³dia para 0,773 kg de DBO₅/ m³dia. Segundo Lee et al. (2004) e Ntougias et al. (2001), os ciliados sésseis podem ser utilizados como indicadores de remoção de carga orgânica, possivelmente por filtração de partículas e de bactérias dispersas. No caso da ETE Piçarrão a carga orgânica média durante o estudo foi de $0,310 \pm 0,140$ kg DBO₅/ m³dia o que permitiu o crescimento tanto de ciliados sésseis como também de rastejantes. Conforme Madoni (2003), a maioria dos hipotríquios (ciliados rastejantes) desaparece quando a carga orgânica fica acima de 0,6 Kg de DBO₅/ m³dia e, quando a carga orgânica permanece entre 0,1 a 0,3 Kg de DBO₅/ m³dia, uma maior variedade de espécies de ciliados com uma maior distribuição na árvore dos grupos funcionais pode ser observada. As espécies *V. convallaria* e *A. cicada* são igualmente abundantes em diversas cargas orgânicas

sendo menos sensíveis às variações (MADONI, 2003). Estas espécies de ciliados foram as mais frequentes (94,7% e 97,4%, respectivamente) nas amostras da ETE Piçarrão.

Os ciliados bacterívoros rastejantes apresentaram uma correlação positiva com a cor, alcalinidade total e DBO₅ do efluente do RAFA, o qual abastece o tanque de aeração, e correlação negativa com a cor, turbidez, DBO₅ e nitrogênio total do efluente tratado indicando que este grupo contribui para a remoção tanto da matéria orgânica carbonácea como também atua nos processos de nitrificação. Estes resultados corroboram com os de Madoni (1994) que, estudando 44 plantas de lodo ativado, também observou uma forte correlação positiva entre a remoção de nitrogênio, DBO₅, cor e a densidade de ciliados rastejantes nos tanques de aeração.

O ciliado *A. cicada* apresentou correlação negativa com a concentração de sólidos totais no afluente e também correlação negativa com a cor, nitrogênio total e nitrato do efluente tratado. Estes resultados corroboram com os de Dubber et al. (2011a) que também verificaram correlação negativa entre esta espécie e a concentração de nitrato no efluente sugerindo participação de *A. cicada* nos processos de desnitrificação.

No presente estudo, *G. aloisi* foi outro ciliado rastejante que apresentou altos valores de frequência e abundância relativa no lodo da ETE Piçarrão. Espécies do gênero *Gastronauta* são comumente encontradas em ambientes de água doce, salobra ou em musgos, porém, o relato da ocorrência em plantas de tratamento de esgoto é escasso. Oberschmidleitner e Aescht (1996) descreveram pela primeira vez a morfologia de *G. aloisi* encontrada no lodo ativado de uma ETE na Áustria, mas os autores não apresentaram dados de correlação com parâmetros físicos e químicos.

O ciliado *G. aloisi* foi bastante frequente nas amostras da ETE Piçarrão e apresentou correlação positiva com OD e correlação negativa com a cor, turbidez, DBO₅, DQO e nitrogênio

total do efluente tratado, indicando relação com a remoção da matéria orgânica carbonácea e nitrogênio. Esses resultados poderão contribuir para o melhor conhecimento a cerca da biogeografia desta espécie e sua importância no tratamento de esgoto por lodos ativados, pois na literatura não existem outros relatos da ocorrência dessa espécie em sistemas de tratamento biológico de esgoto. O presente estudo trata do segundo registro da ocorrência dessa espécies em sistema de lodos ativados.

A. uncinata também apresentou correlação positiva com OD e negativa com a DBO₅ do efluente tratado, sugerindo que esta espécie participa da remoção da matéria orgânica. Madoni (1996) relata que a alta abundância dessa espécie ocorre quando a carga do lodo é baixa. Segundo Arregui et al. (2012), espécies do gênero *Acinertia* são bastante comuns em estações de tratamento de esgoto, porém são poucos os estudos que correlacionaram as espécies com os parâmetros das ETE estudadas. Lee et al. (2004) não observaram correlação entre *A. uncinata* e os parâmetros físico e químicos quando avaliaram o lodo ativado de uma estação piloto nos EUA. Pérez-Uz et al. (2010) relatam que *Acinertia* spp. demonstra não ter uma relação significativa com a remoção de nitrogênio. Dubber e Gray (2011a) relataram que *A. uncinata* foi a espécie mais comum nas ETE da Irlanda e verificaram forte correlação entre esta espécie e os sólidos suspensos voláteis ($r = 0.940$, $p < 0.01$), porém a correlação só foi observada com valores extremamente altos de SSV (195 mL/g). Quando a densidade foi comparada com uma faixa de valores de SSV menores (49 – 64 mL/g) não foram observadas correlações, indicando que esta espécie resiste a grandes variações de SSV no meio e possivelmente contribuiu para sua remoção. Conforme Salvadó (2001), *A. uncinata* é considerada uma espécie indicadora de condição poli-alfamesosapróbica, ou seja, vive em ambiente com fortíssimo teor de carga orgânica e pode

alimentar-se tanto de bactérias como também pode exercer a predação principalmente sobre protozoários flagelados.

A ocorrência de espécies de ciliados carnívoros livre natantes como componentes da microfauna do lodo ativado já foi registrada na literatura por outros autores (CURDS e COCKBURN, 1970; MADONI e GHETTI, 1981; MADONI, 1994; MARTÍN-CERECEDA et al., 1996; LEITNER e FOISSNER, 1997; ETTI et al., 2000, CHEN, et al., 2004, LEE et al., 2004; LIU et al., 2008; SIQUEIRA-CASTRO e SILVA-NETO, 2009).

Os ciliados carnívoros observados incluíram os livres natantes *Litonotus* sp. com frequência de 36,8%, *Loxophylum* sp. (15,8%), *Dileptus* sp. (7,9%) e *Trachelius* sp. (2,6%), sendo que os dois primeiros foram os mais abundantes com 66,8 / mL e 43,2 /mL respectivamente. Os ciliados carnívoros sésseis observados foram *Tokophrya quadripartita* (50%), *Podophrya fixa* (42,1%), *Discophrya* sp. (15,8%), e *Sphaerophrya* sp. (2,6%) e *Acineta* sp. (2,6%). *T.quadripartita* e *P. fixa* foram as mais abundantes com 63 / mL e 48,1 / mL de abundância média, respectivamente. Esses resultados corroboram com outros estudos realizados em sistemas de lodos ativados (MADONI, 2011). Dubber e Gray (2011a) observaram abundâncias médias de ciliados carnívoros que variaram de 0 a 133 / mL em estudo realizado em 11 ETE na Irlanda, porém as espécies de suctórias (ciliados carnívoros sésseis) não foram identificadas.

Conforme Liu et al. (2008), Martín-Cereceda et al. (1996) e Lee et al. (2004) os ciliados carnívoros, quando estão em grande abundância, podem indicar deficiência na sedimentação do lodo. Liu et al. (2008) observaram que na estação de tratamento que apresentava uma abundância relativa superior de carnívoros ciliados, havia uma má sedimentação de lodo (IVL médio de 197 mL/g). Zhou et al. (2008) relataram que os ciliados carnívoros e os flagelados apresentaram correlação positiva com os sólidos suspensos voláteis do efluente tratado, sugerindo que estes

grupos podem ser utilizados como indicadores de má sedimentação do lodo. Martin-Cereceda et al. (1996) e Lee et al. (2004) também relataram correlação positiva entre os protozoários carnívoros, principalmente *Litonotus lamella*, e os sólidos suspensos voláteis. No presente estudo, os ciliados carnívoros não apresentaram abundâncias relativas superiores aos demais protozoários ciliados e as mesmas se mantiveram baixas durante todo o estudo. Além disso, verificou-se uma correlação negativa entre os ciliados carnívoros e os sólidos totais no efluente tratado da ETE Piçarrão indicando que os ciliados carnívoros não estão interferindo na remoção da matéria orgânica da ETE.

Algumas espécies, como *Blepharisma sinuosum*, *Bakuella* sp., *Gastrostyla* sp., *Oxytricha granulifera*, *Oxytricha* sp., *Perispira* sp., *Colpidium* sp., *Didinium nasutum*; *Deviata* sp., *Tetmemena pustulata*, *Sterkiella cavicola*, e *Vorticella infusionum* são espécies pouco comuns de serem encontradas em estações de lodo ativado. Siqueira-Castro (2008) registrou a primeira ocorrência de *D. nasutum*, *Deviata* sp., e *S. cavicola* em amostras de esgoto de uma estação de tratamento de esgoto por lodos ativados.

Os ciliados *Bakuella* sp. e *Gastrostyla* sp. foram encontrados apenas nas culturas preparadas a partir das amostras de lodo ativado da ETE Piçarrão e não há registro na literatura da ocorrência dessas espécies em sistemas de lodo ativado. Na literatura apenas nove espécies do gênero *Bakuella* são conhecidas, habitando solo, água salobra e doce. Segundo Berger (1999), o gênero *Gastrostyla* apresenta oito espécies, encontradas tipicamente em ambientes marinhos, limnéticos ou edáficos. Esse oxitriquídeo apresenta zona adoral de membranelas com formato de ponto de interrogação, o número de cirros frontoventrais e pós-orais é maior que sete, formando uma contínua e oblíqua fileira de cirros ventrais. As espécies registradas nesse estudo a princípio

não pertencem a nenhuma das já descritas, merecendo um estudo morfológico mais detalhado para sustentar a hipótese de ocorrência de uma nova espécie.

A espécie *Oxytricha granulifera* é comumente encontrada em habitats terrestres, onde se alimenta de bactérias, hifas de fungos e flagelados heterótrofos (BERGER, 1999). Esse oxitriquídeo apresenta corpo elipsoide, 80 x 35 µm, com extremidades anterior e posterior arredondadas, dois nódulos macronucleares e dois micronúcleos, vacúolo contrátil localizado na região mediana e citoplasma com grânulos corticais arranjados em fileiras longitudinais. O registro dessa espécie em culturas obtidas de amostras de lodo ativado irá contribuir para dados de ocorrência de mais um habitat desse ciliado.

As tecamebas observadas foram *Arcella hemisphaerica* e *Euglypha* sp., sendo a primeira mais abundante e observada em todas as análises. Observou-se correlação positiva entre a densidade de *Arcella hemisphaerica* e oxigênio dissolvido no tanque de aeração. Liu et al. (2008), estudando um sistema combinado anaeróbio/aeróbio também observaram que, após os ciliados, as tecamebas foram o segundo grupo mais abundante. Os mesmos autores observaram correlação de Pearson positiva entre as amebas e a concentração de OD, indicando que as amebas são sensíveis aos níveis de OD em sistemas de lodos ativados. Além disso, também se observou correlação negativa entre a cor e a concentração de nitrogênio total no efluente tratado da ETE Piçarrão. Esses resultados indicam que esta tecameba pode estar relacionada com remoção de nitrogênio e produção de efluente de boa qualidade. Zhou et al. (2008) relataram correlação negativa entre as tecamebas, nitrogênio total, amônia, sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis, sugerindo que o grupo possa ser utilizado como indicador de bom desempenho do lodo ativado.

Os rotíferos foram o terceiro grupo mais abundante e os espécimes observados incluíram *Epiphanes* sp., *Rotaria* sp., *Philodina* sp. e *Lecane* sp., sendo que a última espécie ocorreu em 81,6% das análises. Os rotíferos apresentaram correlação positiva com a DBO₅, DQO e sólidos suspensos totais do afluente, correlação positiva com OD do tanque de aeração e correlação negativa com sólidos totais e sólidos dissolvidos totais do efluente tratado. Os resultados das correlações corroboram com os de Lapinski e Tunnacliffe (2003) que relatam a capacidade dos rotíferos da classe Bdelloidea em auxiliar na remoção de bactérias suspensas e outras pequenas partículas contribuindo para a clarificação do efluente. Vadstein et al. (1993) realizaram experimentos demonstrando que os rotíferos se alimentam de partículas suspensas de diversos tamanhos; estes autores utilizaram espécimes de *Brachionus plicatilis*, os quais foram hábeis em remover partículas que variaram de 0,3 a 3 mm. Já foi demonstrado também que *B. calyciflorus* consegue remover partículas de sílica de 3 a 6 mm (MIQUELIS et al. 1998).

Conforme Zhou et al. (2008), os rotíferos tem capacidade de consumir as bactérias dispersas no meio e contribuem para a melhoria da sedimentação através do aumento da agregação de flocos. Os experimentos de Lapinski e Tunnacliffe (2003), utilizando *Philodina roseola*, indicam que rotíferos podem funcionar como um biofloculante em águas residuárias. Os mesmos contribuem para a formação do floco por meio de substâncias secretadas para fixação ao substrato e estas substâncias atuam como flocculante.

6.3.2 Sistema Combinado em Escala de Bancada

A microfauna de sistemas combinados aeróbio/anaeróbio e ou anóxico, que visam à remoção de nutrientes como nitrogênio e fósforo, ainda é pouco estudada. O sistema combinado anaeróbio/aeróbio utilizado neste trabalho visava à remoção de nitrogênio total (nitrificação-

desnitrificação). O mesmo foi constituído por filtro anaeróbio (FA) seguido por biofiltro aerado submerso (BAS) que foram empregados para reduzir tanto as concentrações de matéria orgânica quanto de compostos de nitrogênio, com baixo consumo de energia, baixa formação de lodo e sem adição de fonte externa de carbono. Além disso, ressalta-se a nova forma de operação, sem recirculação da biomassa aeróbia de excesso entre as unidades; e empregando a recirculação de parte do efluente formado no BAS para o FA no início do sistema. Com a recirculação do efluente do BAS para um ambiente redutor, os doadores de elétrons utilizados para a desnitrificação são compostos orgânicos presentes no início do tratamento, tais como a matéria orgânica solúvel de rápida biodegradação constituinte do esgoto bruto e ácidos orgânicos formados no processo anaeróbio (FOCO, 2010).

Pérez-Uz et al. (2010) avaliaram bioindicadores para verificação do desempenho de sistemas avançados para o tratamento de águas residuárias que visam remoção de nitrogênio. Os resultados indicaram que a densidade populacional e a diversidade de protozoários são muito diferentes de outros sistemas convencionais. No entanto, Dubber e Gray (2011b) estudaram sistemas avançados e verificaram que a comunidade de protozoários foi moderadamente afetada, porém se manteve diversa e com alta abundância.

No presente estudo, quando foi utilizada a associação de filtro anaeróbio seguido de biofiltro aerado submerso no sistema em escala de bancada, a biomassa se desenvolveu aderida e os resultados obtidos foram bastante distintos dos observados na ETE Piçarrão, que utiliza reator anaeróbio de fluxo ascendente seguido de lodos ativados com biomassa dispersa. Ressalta-se que são escassos os estudos que avaliaram sistemas com biomassa aderida (PÉREZ-UZ et al., 2010).

Neste estudo foram identificadas 13 espécies de protozoários ciliados, além de outros protozoários e micrometazoários no lodo do biofiltro aerado submerso nas amostras no dia da

coleta. Houve predominância do ciliado livre natante *Paramecium aurelia* (94,2%), seguido pelos pequenos flagelados (69,6%), ciliados sésseis *Vorticella* spp. (60,9%), tecamebas *Centropyxis* sp. (42%) e ciliados carnívoros *Spathidium seppelti foissneri* (42%). Essas populações de protozoários, com exceção de algumas espécies de *Vorticella*, são associadas a sistemas de lodos ativados com desempenho deficiente e, portanto, são consideradas como indicadoras de uma deficiência funcional (CURDS e HAWKES, 1975). Em sistemas convencionais, os flagelados e as amebas estão relacionados com a etapa de partida do sistema ou com estágios de sobrecarga temporária. Portanto, o aparecimento e predomínio de ciliados livre natantes e flagelados durante fases de bom desempenho do sistema, na remoção de matéria orgânica e nitrogênio, é um achado importante. Resultados similares foram observados por Pérez-Uz et al. (2010), quando avaliaram três sistemas de lodo ativado, com sistemas avançados para remoção de nutrientes, tratando esgoto doméstico. Todos os sistemas incluíam ciclo contínuo alternando zonas aeróbias/anóxicas e ou anaeróbias para o desenvolvimento de populações de bactérias nitrificantes/desnitrificantes. Neste estudo, houve predominância de flagelados e amebas durante fases de bom desempenho dos sistemas avaliados por estes pesquisadores. Arévalo et al. (2009) relataram boas condições operacionais e estabilidade da qualidade dos efluentes, mesmo quando ocorreu aparecimento de flagelados e amebas e os autores concluíram que as ferramentas de controle desenvolvidas anteriormente, que indicavam associação entre flagelados e amebas com má qualidade do efluente necessitam ser revistos para sistemas alternativos.

Quando calculado o índice biótico do lodo (IBL) (Tabela 27) do sistema em escala de bancada e observadas as classes de qualidade (78,6% das amostras, classe IV; 12,9%, classe III e 8,6% classe II), verificou-se pouca estabilidade do sistema durante todo o estudo com predominância de ciliados livre natantes e flagelados. Porém, não houve concordância com os

dados físicos e químicos que se mantiveram adequados durante todo o estudo. Neste caso, o IBL não foi uma ferramenta útil e fidedigna para avaliação da qualidade do lodo do biofiltro aerado submerso do sistema em escala de bancada.

Os ciliados rastejantes apresentaram correlação positiva com a alcalinidade total e parcial, DQO, nitrogênio total e amônia presentes no efluente do filtro anaeróbio e correlação positiva com OD do biofiltro aerado submerso e negativa com DQO, DBO₅, nitrogênio total, amônia e nitrito presentes no efluente tratado. Estes achados indicam que este grupo está relacionado com remoção de matéria orgânica e remoção de nitrogênio.

Hipotrichida apresentou correlação positiva com a alcalinidade parcial, total, NH₄ e DQO do afluente, correlação positiva com OD, alcalinidade parcial e total do efluente tratado, indicando que este grupo apresenta certa sensibilidade às concentrações de oxigênio e pode estar envolvida nos processos de nitrificação.

Aspidisca cicada apresentou correlação positiva com NH₄ e negativa com os sólidos suspensos totais do afluente e correlação negativa com nitrato do efluente, o que indica que esta espécie está envolvida na nitrificação e remoção de matéria orgânica. Dubber et al. (2011a) também verificaram correlação negativa entre esta espécie e a concentração de nitrato no efluente sugerindo participação de *A. cicada* nos processos de desnitrificação.

Conforme Madoni (2011), as espécies *A. cicada*, *Vorticella convallaria* e *Vorticella microstoma* são bastante comuns tanto em lodos ativados como também em filtros percoladores. Neste estudo, avaliando o biofiltro aerado submerso, estas espécies também ocorreram, porém com uma frequência relativamente menor.

Os ciliados sésseis apresentaram correlação positiva com OD do biofiltro aerado submerso e negativa com DQO e DBO₅ do efluente tratado. *Epistylis* sp. apresentou correlação positiva

com o pH e DQO do afluente, correlação positiva com OD do BAS e correlação negativa com a DBO₅ do efluente tratado. *Vorticella* spp. apresentou correlação positiva com alcalinidade total, parcial e DQO do afluente e correlação negativa com a temperatura, DQO e DBO₅ do efluente tratado. Estes resultados confirmam que os ciliados sésseis estão fortemente associados à remoção de matéria orgânica e produção de efluente de qualidade (MADONI, 2011).

Já os ciliados livre natantes, considerados como grupo indicativo de mau desempenho do sistema, apresentaram correlação positiva com DBO₅, sólidos suspensos totais e ácidos orgânicos voláteis do efluente do filtro anaeróbio (afluente do biofiltro aerado submerso) e correlação positiva com OD do biofiltro aerado submerso e negativa com DQO e DBO₅ do efluente tratado. Estes resultados indicam que este grupo está relacionado com remoção de matéria orgânica pelo sistema. *Paramecium caudatum* apresentou correlação negativa com a temperatura e positiva com a DQO, NH₄ e sólidos suspensos totais do afluente e correlação negativa com a DQO do efluente tratado. Esta espécie foi a mais frequente em todo o estudo e ocorreu mesmo em situações de bom desempenho do sistema. Porém, Dubber e Gray (2011a) observaram predomínio de ciliados livre natantes quando ocorreram problemas em uma das plantas estudadas, a qual se manteve por um longo período em situação de partida.

A tecameba *Arcella hemisphaerica* apresentou correlação positiva com a alcalinidade total, parcial, nitrogênio total e NH₄ do afluente e correlação positiva com OD, nitrito e nitrato do efluente tratado, indicando que possivelmente está relacionada aos processos de nitrificação. Já *Euglypha* sp., apresentou correlação negativa com a temperatura e DBO₅ do efluente tratado. De acordo com Madoni (2011), as tecamebas, principalmente, *Arcella* spp. e *Euglypha* spp., são normalmente encontradas em tanque de aeração de sistemas de tratamento que operam visando a

remoção de nitrogênio. Estes sistemas são caracterizados pela baixa carga orgânica, um longo tempo de retenção do lodo e alta concentração de oxigênio.

Observou-se correlação negativa entre os flagelados, pH, alcalinidade parcial e nitrogênio total e positiva com os sólidos suspensos totais do afluente, demonstrando que a densidade de flagelados fica aumentada em situações de aumento de carga orgânica.

Os micrometazoários (rotíferos, tardígrados e nematóides) apresentam lenta taxa de crescimento e reprodução e por isso indicam alto tempo de detenção celular e alta idade do lodo presente no biofiltro aerado submerso (VELESSARD & BIHAN, 2003). Estes predadores e organismos detritívoros alimentam-se sobre o biofilme diminuindo o volume de biomassa, acelerando a mineralização. A capacidade de raspagem da superfície evita o entupimento dos filtros, pois consomem o biofilme controlando a sua espessura. A atividade diminui bastante em períodos frios (invernos rigorosos) sendo frequente a observação de entupimento de filtros em épocas frias (VELESSARD & BIHAN, 2003).

Os rotíferos do gênero *Rotaria* foram bastante frequentes nas análises (81,2%) e apresentaram correlação negativa com a temperatura, positiva com a alcalinidade parcial, alcalinidade total e DQO do afluente e correlação positiva com nitrogênio total e amônia. O que indica que os rotíferos estão envolvidos na remoção da matéria orgânica, porém não contribuem para remoção de nitrogênio.

Os resultados deste trabalho mostraram que a microfauna associada à zona aeróbia do biofiltro aerado submerso, onde ocorre o processo de nitrificação, teve composição diferente com relação às espécies e as abundâncias se comparados com aqueles encontrados em sistemas de lodos ativados convencional (CURDS E COCKBURN, 1970; ESTEBAN et al, 1991; MADONI, 1994; SERRANO et al, 2008). As populações que prevaleceram no sistema avaliado foram

similares às encontradas em outros estudos utilizando sistemas não convencionais que visavam à remoção de nitrogênio (PÉREZ-UZ et al., 2007; LIU et al, 2008; ARÉVALO et al., 2009; TOCCHI et al., 2012). O aparecimento de populações estáveis de ciliados livre natantes e flagelados, especialmente em boas situações de desempenho do sistema, é outra característica distintiva. Esta observação também difere do que tem sido observado em sistemas convencionais (CURDS e COCKBURN, 1970; ESTEBAN et al, 1991; MADONI, 1994; MARTÍN-CERECEDA et al, 1996). Estes resultados salientam as limitações do índice biótico do lodo (IBL), desenvolvido para avaliação de sistemas com lodos ativados convencionais, para ser utilizado em sistemas empregando novas tecnologias. O estudo da adaptação das comunidades à variabilidade das condições do sistema é a chave para o desenvolvimento do conhecimento para empregar essas populações na avaliação do desempenho de sistemas não convencionais.

6.4 Avaliação do potencial predatório de espécies de ciliados componentes da microfauna.

Os ciliados de vida livre *Euplotes aediculatus* e *Sterkiella cavicola* demonstraram potencial predatório sobre oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp.

E. aediculatus e *S. cavicola* são ciliados hipotríquios, pertencentes às ordens Euplotida Small & Lynn, 1985 e Sporadotrichina Fauré-Fremiet, 1961, respectivamente. Ambos são ciliados que se locomovem sobre a superfície do floco de lodo ativado, e estão agrupados como ciliados bacterívoros rastejantes. Apresentam ampla abertura bucal localizada na face ventral e uma extensa ciliatura oral constituída por numerosas membranelas arranjadas consecutivamente formando uma zona adoral de membranelas (ZAM).

Provavelmente graças a desenvolvida ciliatura oral, a grande área oral e a forte corrente

gerada pelo batimento das membranelas, *E. aediculatus* e *S. cavicola* tenham obtido sucesso na predação dos cistos e oocistos. Os oocistos foram as formas mais predadas possivelmente devido a sua diminuta dimensão (3 a 6 μm), enquanto cistos, que podem medir de 8 a 12 μm , foram menos predados.

Stott et al. (2001) demonstraram que os ciliados têm o potencial para remover até 5.000 oocistos / célula / hora de efluentes tratados de leitos cultivados (*wetlands*) e os rotíferos isolados a partir da zona úmida também demonstraram a capacidade de ingerir grandes quantidades de oocistos. Stott et al. (2003) observaram maior predação por *Paramecium* spp., que foi capaz de ingerir mais de 30 oocistos, quando os espécimes foram expostos e altas densidades de oocistos. Fayer et al. (2000b) relataram a ingestão de 5 a 25 oocistos por rotíferos. Os protozoários de vida livre e os rotíferos podem desempenhar um papel importante na remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e, possivelmente, também de cistos de *Giardia* spp.

Os experimentos realizados nesse estudo servirão de base para outros ensaios futuros sobre o potencial predatório de mais espécies de protozoários ciliados encontrados no lodo de sistemas de tratamento de esgoto sobre as formas patogênicas de *Giardia* e *Cryptosporidium*.

7. CONCLUSÕES

1. A ETE Piçarrão apresentou eficiências de remoção de cistos de *Giardia* spp. que variaram de 99,8 a 100% demonstrando que a combinação dos sistemas RAFA seguido por Lodos Ativados pode ser uma alternativa promissora para remoção destes patógenos.
2. As análises realizadas durante os 24 meses na ETE Piçarrão indicaram altas concentrações de cistos de *Giardia* spp. no esgoto bruto com uma média de 98.333 cistos / L, sendo que a maior parte dos cistos foi removida pelo RAFA e concentrou-se no lodo condicionado ressaltando a importância do tratamento adequando deste resíduo.
3. Cistos de *Giardia* spp. foram detectados em todos os 24 meses de análises e oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados em apenas 3 meses na ETE Piçarrão indicando que a frequência de criptosporidiose na população atendida pela ETE Piçarrão possivelmente é bastante inferior à a frequência de giardiose.
4. O sistema combinado em escala de bancada (filtro anaeróbio seguido de biofiltro aerado submerso) apresentou eficiência de remoção de praticamente 100% durante todo o estudo demonstrando que a combinação de sistemas anaeróbio/aeróbio, além de remover nutrientes como nitrogênio e fósforo, também contribui para remoção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.
5. No sistema combinado em escala de bancada, mesmo utilizando esgoto hospitalar e doméstico, foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em apenas 2 meses, sugerindo que a criptosporidiose não é tão frequente na população que utiliza o Hospital das Clínicas e na população atendida pela rede coletora de esgoto na região da UNICAMP.

6. O sequenciamento das amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. resultou em perfis compatíveis com as espécies *C. hominis* e *C. parvum* indicando que a criptosporidiose nas regiões estudadas pode ter caráter antroponótico e também zoonótico.
7. O sequenciamento das amostras positivas para *Giardia* spp. resultou em perfis compatíveis com a espécie *G. duodenalis* assembleias AII e BIV de origem predominantemente antroponótica e assembleia C que costuma ser identificada em cães e gatos, o que sugere que amostras de fezes de animais também estão entrando em contato com o esgoto da cidade.
8. O estudo da remoção destes parasitos patogênicos ressalta a importância do tratamento de esgotos sanitários para redução do impacto dos efluentes gerados no meio ambiente e na saúde pública e a necessidade de maior controle quanto ao tratamento de lodo condicionado gerado em ETE.
9. A microfauna do lodo ativado da ETE Piçarrão é diversificada e composta principalmente por organismos indicadores de boas condições operacionais, as quais incluíram *Vorticella* spp. (94,7%), *Aspidisca cicada* (97,4%), *Gastronauta aloisi* (86,8%), *Acinertia uncinata* (84,2%) e *Epistylis plicatilis* (84,2%) com maior frequência nas análises.
10. A microfauna do sistema em escala de bancada que visava remoção de nitrogênio teve composição diferente com relação às espécies e as abundâncias se comparados com aqueles encontrados em sistemas de lodos ativados convencional.
11. O aparecimento de populações estáveis de ciliados livre natantes e flagelados, especialmente em boas situações de desempenho do sistema, é outra característica distintiva do sistema em escala de bancada visando remoção de nitrogênio. Assim, estes achados salientam as limitações do índice biótico do lodo (IBL), desenvolvido para

avaliação de plantas com lodos ativados convencionais, para ser utilizado em sistemas empregando novas tecnologias.

12. O estudo da adaptação das comunidades à variabilidade das condições dos sistemas de tratamento de esgoto é a chave para o desenvolvimento do conhecimento para empregar essas populações na avaliação do desempenho de sistemas não convencionais.

13. Os ciliados de vida livre *Euplotes aediculatus* e *Sterkiella cavicola* isolados da ETE Piçarrão demonstraram potencial predatório sobre oocistos de *Cryptosporidium* sp. e cistos de *Giardia* sp..

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S.A. & ZAIAT, M. Desempenho de reator anaeróbio – aeróbio de leito fixo no tratamento de esgoto sanitário. **Eng. Sanit. e Ambiental** v. 13, n.2, p. 181-188, 2008.

ADL, S. M.; SIMPSON, A. G. B.; FARMER, M. A.; ANDERSEN, R. A.; ANDERSON, O. R.; BARTA, J. R.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R. A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T. Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C. E.; LEWIS, L. A.; LODGE, J.; LYNN, D. H.; MANN, D. G.; MCCOURT, R. M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, J.; MOZLEY-STANDRIDGE, S. E.; NERAD, T. A.; SHEARER, C. A.; SMIRNOV, A. V.; SPIEGEL, F. W.; TAYLOR, M. F. J. R. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **J. Eukaryot. Microbiol.** v.52, p.399- 451, 2005.

APHA/AWWA/WEF. **Standard Methods of the Examination of water and wastewater.** 20th Edition. New York: American Public Health Association, 1998.

AIYUK, S.; FORREZ, I.; LIEVEN, D.E.K.; HAANDEL, A.; VERSTRAETE, A. Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates- a review. **Bioresour. Tech.** v.97, p. 2225-2241, 2006.

ALVAREZ-PELLITERO, P.A.; PEREZ, M. I.; QUIROGA, M. J.; REDONDO, S.; VAZQUEZ, A.; RIAZA, O.; PALENZUELA, A.; SITJA`-BOBADILLA; J. M. NIETO. Host and environmental risk factors associated with *Cryptosporidium scophthalmi* (Apicomplexa) infection in cultured turbot, *Psetta maxima* (L.) (Pisces, Teleostei). **Vet. Parasitol.** v.165, p.207–215, 2009.

AL-SAED, R. Pathogens assessment in reclaimed effluent used for industrial crops irrigation. **Int. J. Environ. Res. Pub. Hlth.** v.4,p.68–75, 2007.

AL-SHAHWANI, S.M. e HORAN, N.J. The use of protozoa to indicate changes in the performance of activated sludge plants. **Water Res.**, v.25,p.633–638, 1991.

AMANN, R.; LEMMER, H.; WAGNER, M. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. **FEMS Microbiol. Ecology**, v.25, p.205–215, 1998.

AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 21th ed. **Am. Public. Health Assoc.**, Washington, DC, 2005.

ARÉVALO, J.; MORENO, B.; PÉREZ, J.; A. GÓMEZ, MA.. Applicability of the Sludge Biotic Index (SBI) for MBR activated sludge control. **J. Hazard. Mater.**, v.167, p. 784–789, 2009.

ARREGUI, L.; LIEBANA, R.; RODRIGUEZ, E.; MURCIANO, A.; CONEJERO, F.; PEREZ-UZ, B.; SERRANO, S. Analysis of the usefulness of biological parameters for the control of activated sludge wastewater treatment plants in an interlaboratory study context. **J. Environ. Monit.**, v.14, p.1444–1452, 2012.

AUBERT, D e VILLENA, I. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region, France. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.104, n.2, pp. 290-295, 2009.

BALDURSSON, S. e KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. **Water Res.**, v.45, p.6603-6614, 2011.

BALLWEBER, L. R.; XIAO, L.; BOWMAN, D. D.; KAHN, G.; CAMA, V. A. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. **Trends. Parasitol.**, v.26, p.180-189, 2010.

BEDOGNI, G., FALANELLI, A., PEDRAZZI, R. **Evaluation of the abundance ratio between crawling and attached ciliates in the management of an activated sludge sewage treatment plant.** In: BIOLOGICAL APPROACH TO SEWAGE TREATMENT PROCESS: CURRENT STATUS AND PERSPECTIVES, Perugia. Proceedings. Perugia: Centro Bazzucchi, p. 229-233. 1991.

BELL, A.; GUASPARINI, R.; MEEDS, D.; MATHIAS, R. G.; FARLEY, J. D. A swimming pool-associated outbreak of cryptosporidiosis in British Columbia. **Can. Public Health. J.**, v.84 p.334-337, 1993.

BENTO, A.P.; SEZERINO, P.H.; PHILIPPI, L.S.; REGINATTO, V.; LAPOLLI, F.R. Caracterização da microfauna em Estação de Tratamento de Esgotos do tipo lodos ativados: um instrumento de avaliação e controle do processo. **Eng. Sanit. Ambiental**, v.10, n.4, p. 329-338, 2005.

BERGER H. Monograph of the Oxytrichidae (Ciliophora, Hypotrichia). **Monographiae Biologicae**, v. 78, p.1–1080, 1999.

BERGER H. Monograph of the Urostyloidea (Ciliophora, Hypotrichia). **Monographiae Biologicae**, v.85, p.1–1303, 2006.

BERGER H. Monograph of the Gonostomatidae and Kahliellidae (Ciliophora, Hypotrichia). **Monographiae Biologicae**, v.90, i-xiv, p.1-741, 2011.

BONATTI, T.R. **Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. e ovos da família Ascarididae em amostras de lodo de esgoto.** 2007. 157p. (Dissertação de Mestrado em Parasitologia). Instituto de Biologia- Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

BOWMAN, D.D. e LUCIO-FORSTER, A. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance **Exp. Parasitol.**, v.124, p. 121–127, 2010.

BUKHARI, Z.; SMITH, H. V.; SYKES, N.; HUMPHREYS, S. W., PATON, C. A.; GIRDWOOD, R. W. A.; FRICKER, C. R. Occurance of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England. **Water Sci. Technol.**, v.35, n.11, p.385-390, 1997.

BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, W. Parasitology meets ecology on its own terms. **J. Parasitol.**, v. 83, n. 4, p. 575-583, 1997.

BRASIL. **Portaria nº 2.914 de 12 de Dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Ministério da Saúde. Brasília. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 15 Mar. 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução Nº. 357 de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em: 20 Mai. 2011.

BRIANESCO R, BONADONNA L An Italian study on *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater, fresh water and treated water. **Environ. Monit. Assess.**, v.104, p.445–457, 2005.

CABADA, M. M.; WHITE, A. C. Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.23, p.494–499, 2010.

CACCIÓ, S.M. DE GIACOMO, M.; AULICINO, F.A.; POZIO, E. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n.6, p. 3393-3398, 2003.

CACCIÒ, S. M.; THOMPSON, R. C. A.; McLAUHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends. Parasitol.**, v.21, p.430-436, 2005.

CACCIÒ, S. M.; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molec. Bioch. Parasitol.**, v.160, p.75-80, 2008.

CANTEY, P. T.; ROY, S.; LEE, B.; CRONQUIST, A.; SMITH, K.; LIANG, L.; BEACH, M. J. Study of nonoutbreak giardiasis: novel findings and implications for research. **Am. J. Med.**, v.124,p.1175-1175, 2011.

CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R.M.B. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil. **Hig. Aliment.**, v. 18, n. 118, p. 52-59, 2004.

CANTUSIO NETO, R.; SANTOS, L.U.; FRANCO, R.M.B. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. **Water Sci. Tech.**, v.54, n.3, p.89-94, 2006.

CANTUSIO NETO R, SANTOS LU, SATO MIZ, FRANCO RMB. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in surface water supply of Campinas, Southeast Brazil. **Water Sci. Tech.**, v.62, p.217-222, 2010.

CASTRO-HERMIDA, J.A. et al., Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. **Water Res.**, v.42, n.13, p.3528–38. 2008.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Apostila do curso Microbiologia de Lodos Ativados, 2009.

CDC. Protracted Outbreaks of Cryptosporidiosis Associated With Swimming Pool Use -Ohio and Nebraska, 2000. **MMWR**. v.50, n.20, p. 406-410, 2001

CDC. Cryptosporidiosis Outbreaks Associated with Recreational Water Use - Five States, 2006. **MMWR** v. 56, n.29, p.729-732, 2007.

CHALMERS, R. M. E FRANK KATZE, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. **Trends in Parasitol.**, v. 29, n. 5, 2013.

CHARLES K, ASHBOLT N, FERGUSON C, ROSER D, MCGUINNESS R, DEERE D. Centralised versus decentralized sewage systems: a comparison of pathogen and nutrient loads released into Sydney's drinking water catchments. **Water Sci. Technol.**, v.48, p.53–60, 2003.

CHEN, S.; XU, M.; CAO, H.;ZHU,J.; ZHOU, K.; YANG, X.; GAN, Y.; LUI,W.; ZHAI, J.; SHAO, Y. Tha activated-sludge fauna and performance of five sewage treatment plants in Beijing, China. **Euro. J. Protistolol.**, v.40, p.147-152, 2004.

CHENG, H.A.; FRANCES E. LUCY, F.E.; GRACZYK, T.K.; BROADERS, M.A.; TAMANG, L.; CONNOLLY, M.. Fate of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts during secondary wastewater treatments, **Parasitol. Res.**, v.105, p.689–696, 2009.

CHERNICARO, C.A.L. **Reatores anaeróbios**. 2ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, 2007. 380 p. (Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias, 2007.

COSTERTON, J. W., Z. LEWANDOWSKI, D. E. CALDWELL, D. R. KORBER, AND H. M. LAPPIN-SCOTT. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.** v.49, p.711–745, 1995.

COUPE, S. SARFATI, C. HAMANE, S., DEROUIN, F. Detection of *Cryptosporidium* and Identification to the Species Level by Nested PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.3, p.1017-1023, 2005.

CURDS, C.R., COCKBURN, A., Protozoa in biological sewage treatment processes. 2. Protozoa as indicators in activated-sludge process. **Water Res.**, v.4, p.237–249, 1970.

CURDS, C.R., HAWKES, H.A., **Ecological Aspects of Used-water Treatment.** Academic Press, London. 1975.

DAVIES, A.P.; CAMPBELL, B.; EVANS, M.R. ; BONE, A.; ROCHE, A.; CHALMERS, R.M. Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom. **Paediatr. Infect. Dis. J.**, v. 28, p.838–840, 2009.

D'ANTONIO, R. G., WINN, R.E.; TAYLOR, J. P. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. **Ann. Intern. Med.**, v.103, p.886-888, 1985.

DE MARCO, N., GABELLI, A., CATTARUZZA, C. AND PETRONIO, L. Performance of biological sewage treatment plants: some experiences on municipal plants in the province of Pordenone (Italy). In: P. Madoni (ed.) Biological Approach to Sewage Treatment Process: Current Status and Perspectives, pp. 247–251. Centro Bazzucchi, Perugia, 1991.

DENKINGER, C. M.; HARIGOPAL, P.; RUIZ, P.; DOWDY, L. M. *Cryptosporidium parvum* – associated sclerosing cholangitis in a liver transplant patient. **Transpl. Infect. Dis.**, v.10, p.133–136, 2008.

DIECKMANN, J. An Improved Protargol Impregnation for Ciliates Yielding Reproducible Results. **Euro. J. Protistolol.**, v.31, p. 372-382, 1995.

DILALLO, R.; ALBERTSON, O.E. Volatile acids by direct titration. **J. Water Pollution Control Federation**, v. 33, n. 4, p. 357-365, 1961.

DUBBER, D. e GRAY, N.F., The influence of fundamental design parameters on ciliates community structure in Irish activated sludge systems. **Eur. J. Protistolol.**, v.47, n.4, p.274–86. 2011a.

DUBBER, D. E GRAY, N.F., The effect of anoxia and anaerobia on ciliate community in biological nutrient removal systems using laboratory-scale sequencing batch reactors (SBRs). **Water Res.**, v.45,n.6, p.2213–26, 2011b.

EISENBERG, J.N.S.; SETO, E.Y.W.; COLFORD, Jr., J.M.; OLIVIERI, A. ; SPEAR, R.C. An analysis of the Milwaukee cryptosporidiosis outbreak based on a dynamic model of the infection process. **J. Epidemiol.**, v.9, n.3, p.255-263, 1998.

ESTEBAN, G., TELLEZ, C., BAUTISTA, L.M., Dynamics of ciliated protozoa communities in activated-sludge process. **Water Res.**, v.25, p.967–972, 1991.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.**, v.8,p.186-194, 1998.

FARTHING, M. J. Treatment options for the eradication of intestinal protozoa. **Nat. Clin. Prat. Gastroenterol. Hepatol.**, v.3, p.436-445, 2006.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection, and identification. **Int. J. Parasitol.**, v.30, p.1305-1322, 2000a.

FAYER, R., TROUT, J.M., WALSH, E.;COLE, R. Rotifers ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum* **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.47, n.2,161–163, 2000b.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Vet. Parasitol.**, v.126, p. 36-56, 2004.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Exp. Parasitol.**, v.124 p.90–97, 2010.

FELSENSTEIN, J., PHYLIP: Phylogeny Inference Package (Version 3.2). **Cladistics** v.5, p.164–166, 1989.

FELTUS, D.C., GIDDINGS, C.W., SCHNECK, B.L., MONSON, T., WARSHAUER, D., MCEVOY, J.M., Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* in Wisconsin. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p.4303–4308, 2006.

FLETCHER, S. M.; STARK, D.; HARKNESS, J.; ELLIS, J. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.25, p.420-449, 2012.

FIGUEIREDO, M. G.; DOMINGUES, V. B. **Microbiologia de Lodos Ativados**. CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo: CETESB, 48 p. 1997.

FISK, R. Giardiasis in British Columbia. **Can. Dis. Weekly Rep.**, v.1347, p.211-213, 1987.

FOCO, M.L.R; **Filtro anaeróbico seguido de biofiltro aerado submerso: produção de biomassa, conversão de matéria orgânica e de nitrogênio**, 2010. 109 p. Dissertação (Mestrado em Saneamento e Ambiente) – Faculdade de Engenharia Civil, Urbanismo e Arquitetura, Universidade de Campinas, Campinas.

FOISSNER W. Neotypification of protists, especially ciliates (Protozoa, Ciliophora). **The Bulletin of Zoological Nomenclature**, v. 59, n. 3, 2002.

FOISSNER, W.; BLATTERER, H.; BERGER, H. & KOHMANN, F. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems – Band I: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea. **Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für Wasserwirtschaft**, 1/91, 478p., 1991.

FOISSNER, W.; BERGER, H. & KOHMANN, F. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems – Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida. **Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für Wasserwirtschaft**, 5/92, 502p., 1992.

FOISSNER, W.; BERGER, H. & KOHMANN, F. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems – Band III: Hymenostomata, Prostomatida, Nassulida. **Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für Wasserwirtschaft**, 1/94, 548p., 1994.

FOISSNER, W.; BERGER, H.; BLATTERER, H. & KOHMANN, F. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems – Band IV: Gymenostomatea, Loxodes, Suctoria. **Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für Wasserwirtschaft**, 1/95, 540p., 1995.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R., CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v.43, n.2, p.109-111, 2001.

FRANCO, R.M.B. & SANTOS, L.U. **Criptosporidiose**. In: AMATO NETO, V.;GRYSCHKEK, R.C.B.; AMATO, V.S.; TUON, F.F. Parasitologia – uma abordagem clínica. Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.

FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Rev. Panam. Infectol.** v.9,p.36-43, 2007.

FRANCO, R.M.B.; BRANCO, N. LEAL, D.A.G parasitologia ambiental:métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Rev. Patol. Trop.** v. 41, n.2, p.119-135, 2012.

FU, C.Y., XIE, X., HUANG, J.J., ZHANG, T., WU, Q.Y., CHEN, J.N.; HU, H.Y. Monitoring and evaluation of removal of pathogens at municipal wastewater treatment plants. **Water Sci. Tech.**, v.61, p.1589–1599, 2010.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Manual de saneamento**. 4 ed. rev. Brasília, Fundação Nacional de Saúde, 2006. 408p.

GAJADHAR, A.A. e ALLEN, J.R. Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites. **Vet. Parasitol.**, v.126, p.3-14, 2004.

GALE, P. Land application of treated sewage sludge: quantifying pathogen risk from consumption of crops. **J. Appl. Microbiol.**, v.98,p.380–396, 2005.

GALLAS-LINDEMANN, C.; SOTIRIADOU, I.; PLUTZER, J.; KARANIS, P. Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater and the surface, drinking and ground waters in the Lower Rhine, Germany. **Epidemiol. Infect.**, v.141, p.9–21, 2013.

GERARDI, M.H. **An operator's guide to protozoa and their role in the activated sludge process.** Public Works, p. 44-47/90-92, 1986.

GRACZYK TK, LUCY FE, TAMANG L, MIRAFLOR A Human enteropathogen load in activated sewage sludge and corresponding sewage sludge-end products. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73, p.2013–2015, 2007.

GRACZYK TK, KACPRZAK M, NECZAJ E, TAMANG L, GRACZYK H, LUCY FE, GIROUARD AS Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in sewage sludge and solid waste landfill leachate and quantitative comparative analysis of sanitization treatments on pathogen inactivation. **Environ, Res.**, v.106, p.27–33, 2008.

GRACZYK, T.K., LUCY, F.E., TAMANG, L., MASHINSKI, Y., BROADERS, M.A., CONNOLLY, M., CHENG, H.-W.A. Propagation of human enteropathogens in constructed horizontal wetlands used for tertiary wastewater treatment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.75, p.4531–4538, 2009.

GREINERT, J.A.; FURTADO, D.N.; SMITH, J.J., BARARDI, C.R.M. SIMÕES, C.M.O. Detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in Swimming Pool Filter Backwash Water Concentrates by Flocculation and Immunomagnetic Separation. **Intern. J. of Environ. Health Res.**, v. 14, n.6, p.395-404, 2004.

GOSTIN, L.O.; LAZZARINI, Z.; NESLUND, V. S.;OSTERHOLM, M. T. Water quality laws and waterborne diseases: *Cryptosporidium* and other emerging pathogens. **Am. J. Public Health.**, v.90, p. 847-853, 2000.

GUIGUET LEAL, D. A. **Avaliação da contaminação de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) por espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* em um ambiente de estuário do litoral de São Paulo.** 2008c. 188p. (Dissertação de Mestrado em Parasitologia). Instituto de Biologia- Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

GÜNTER, F. **Introdução aos problemas da poluição ambiental.** São Paulo, E.P.U, Springer, EDUSP, 1980.

HACHICH, E. M.; SATO, M. I. Z.; GALVANI, A. T.; MENEGON, J.R.N.; MUCCI, J.L.N. *Giardia* e *Cryptosporidium* um source waters of São Paulo State, Brazil. **Water Sci. Tech.**, v.50, n. 1, p. 239-245, 2004.

HOFFMANN, H., PLATZER, C. Aplicação de imagens microscópicas do lodo ativado para a detecção de problemas de funcionamento das estações de tratamento de esgotos na Alemanha. In: I SEMINÁRIO DE MICROBIOLOGIA APLICADA AO SANEAMENTO, Universidade Federal do Espírito Santo, p. 108-120. 2000.

HUTCHISON ML, WALTERS LD, MOORE A, AVERY SM Decline of zoonotic agents in liquid livestock wastes stored in batches on farm. **J. Appl. Microbiol.**, v.99, p.58–65, 2005.

HSU, B.M. e HUANG, C. Influence of ionic strength and pH on hydrophobicity and zeta potential of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.201, n.1-3, p.201–206, 2002.

IQBAL, A.; LIM, Y. A.; SURIN, J.; SIM, B. L. High diversity of *Cryptosporidium* subgenotypes identified in Malaysian HIV/AIDS individuals targeting gp60 gene. **PLoS. One.**, v.7, n.2, e31139, 2012.

JENKINS, D., RICHARD, M.G., DAIGGER, G.T. **Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming**. 2 ed. Chelsea, Michigan: Lewis Publishers, Inc., 193 p. 1993.

JIRKŮ M, VALIGUROVÁ A, KOUDELA B, KRÍZEK J, MODRÝ D, SLAPETA J. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. **Folia Parasitol. (Praha)**, v.55, n.2, p.81-94, 2008.

JOHNSON, D. W.; ENRIQUEZ, C. E.; PEPPER, I. L.; DAVIS, T. L.; GERBA, C. P.; ROSE, J. B. Survival of *Giardia*, *Cryptosporidium*, Poliovirus and *Salmonella* in marine waters. **Water Sci. Tech.**, v.35, n.11-12, p.261-268, 1997.

KARANIS, P.; SCHOENEN, D.; SEITZ, H. M. Distribution and removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies in Germany. **Water Sci. Tech.**, v.37, n.2, p.9-18, 1998.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learned. **J. Water Health**, v. 5, n.1, p. 1-38, 2007.

KATZ, D.E.; HEISEY-GROVE, D.; BEACH, M.; DICKER, R.C.; MATYAS, B.T. prolonged outbreak of giardiasis with two modes of transmission. **Epidemiol. Infect.**, p.1-7, 2006.

KISTEMANN, T.; RIND, E.; KOCH, C.; CLAßEN, T.; LENGEN, C.; EXNER, M.; RECHENBURG, A. Effect of sewage treatment plants and diffuse pollution on the occurrence of protozoal parasites in the course of a small river. **Int J Hyg Envir Heal**, v.215, n.6, p.577–83, 2012.

KOTHAVADE, R.J. Potential molecular tools for assessing the public health risk associated with waterborne *Cryptosporidium* oocysts. **Journal of Medical Microbiology**, v.61, n. 8, p.1039–51, 2012.

KUNKEL, K.E.; KARL, T.R.; DAVID R. D.R.; REDMOND, K.; YOUNG, J.; YIN, X.; HENNON, P.. Probable maximum precipitation and climate change. *Geophys. Res. Lett.*, v.40, n.7, p.1402–1408, 2013.

LAPINSKI, J.; TUNNACLIFFE, A. Reduction of suspended biomass in municipal wastewater using bdelloid rotifers. **Water Res.**, v.37, n.9, p.2027–34, 2003.

LEE, S.; BASU, S.; TYLER, C.W.; WEI, I.W. Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island treatment plant. **Adv. Environ. Res.** v.8, n.3-4, p.371-378, 2004.

LEONHARD, S.; PFISTER, K.; BEELITZ, P.; THOMPSON, R.C.A. The molecular characterisation of *Giardia* from dogs in southern Germany. **Vet. Parasitol.** v.150, p.33–38, 2007.

LEONI, F., AMAR, C., NICHOLS, G., PEDRAZA-DÍAZ, S., MCLAUCHLIN, J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. **J. Med. Microbiol.**, v.55, p.703–707, 2006.

LIM, Y.A.L., WAN HAFIZ, W.I. AND NISSAPATORN, V. Reduction of *Cryptosporidium* and *Giardia* by wastewater treatment processes. **Trop. Biomed.**, v.24, p.95–104, 2007.

LIU, J. et al., Comparative study of protozoan communities in full-scale MWTPs in Beijing related to treatment processes. **Water Res.**, v.42, n.8-9, p.1907–18. 2008.

LIU, A.; JI, H.; WANG, E.; LIU, J.; XIAO, L.; SHEN, Y.; LI, Y.; ZHANG, W.; LING, H. Molecular identification and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia duodenalis* in raw urban wastewater in Harbin, China. **Parasitol. Res.**, v.109, p.913–918, 2011.

LONIGRO A, POLLICE A, SPINELLI R, BERRILLI F, DICAVE D, D’ORAZI C, CAVALLO P, BRANDONISIO O. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in membrane-filtered municipal wastewater used for irrigation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72, p.7916–7918, 2006.

LUCY FE, GRACZYK TK, TAMANG L, MIRAFLOR A, MINCHIN D. Biomonitoring of surface and coastal water for *Cryptosporidium*, *Giardia* and human-virulent microsporidia using molluscan shellfish. **Parasitol. Res.**, v.103, p.1369–1375, 2008.

LYNN D. H. e SMALL, E. B. Phylum Ciliophora. *In: An Illustrated Guide to the Protozoa.* LEE, J.J., BRADBURY, P.C. e LEEDALE, G.F. (eds.). Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas. pp. 371-656, 2002.

- MACÊDO, J. A. B. *Águas & Águas*. Juiz de Fora, Ortofarma, 2000.p. 444 – 470.
- MACKENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, M. S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D. E.; KAZMIERCZAK, J. J.; ADDISS, D. G.; FOX, K. R.; ROSE, J. P.; DAVIS, J. P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **New Engl. J. Med.**, v.331, n.161-167, 1994.
- MACKENZIE, W. R.; KAZMIERCZAK, J. J.; DAVIS, J. P. An outbreak of cryptosporidiosis associated with a resort swimming pool. **Epidemiol. Infect.**, v.115, p.545-553, 1995.
- MACPHERSON, C.N.L. Human behavior and epidemiology of parasitic zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v.35, p.1319-1331, 2005.
- MADONI, P., DAVOLI, D. AND CHERICI, E. Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works. **Water Res.**, v.27, p.1485–1491, 1993.
- MADONI, P. A., Sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. **Water Res.**, v. 28, n. 1, p. 67-75, 1994.
- MADONI, P.. The sludge biotic index for the evaluation of the activated-sludge plant performance: the allocation of the ciliate *Acinertia uncinata* to its correct functional group. **Acta Protozool.**, v.35, p.209–214, 1996.
- MADONI, P. Protozoa in wastewater treatment processes: A minireview. **Ital. J. Zool.**, v.78, n.1, p.3–11, 2011.
- MADONI, P. & GHETTI, P. F. The structure of ciliated protozoa communities in biological sewage-treatment plants. **Hydrobiologia**, v. 83, p. 207-215, 1981.
- MARTÍN-CERECEDA, M.; SERRANO, S. & GUINEA, A. A comparative study of ciliated protozoa communities in activated-sludge plants. **Fems Microbiol. Ecol.**, v. 21, p. 267-276, 1996.
- McANULTY, J. M.; FLEMING, D. W.; GONZALEZ, A. H. A community-wide outbreak of cryptosporidiosis associated with swimming at a wave pool. **J. Am. Med. Assoc.**, v.272, p.1597-1600, 1994.
- MEAD, P. S., L. SLUTSKER, V. DIETZ, L. F. MCCAIG, J. S. BRESEE, C. SHAPIRO, P. M. GRIFFEN; R. V. TAUXE. Food-Related Illness and Death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, v.5 n.5 p.607-625, 1999.
- MEDEMA, G. J.; SCHETZ, F. M.; TEUNIS, P. M.; HAVELAAR, A. H. Sedimentation of Free and Attached *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts in Water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, n.11, p.4460– 4466, 1998.

MIQUELIS A, ROUGIER C, POURRIOT R. Impact of turbulence and turbidity on the grazing rate of the rotifer *Brachionus calyciflorus* (Pallas). **Hydrobiologia** v.386, p.203–11, 1998.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; HILL, B. D.; O' DONOGHUE, P. E.; LIMOR, J.; LAL, A.; THOMPSON, R. C. A. Detection of the *Cryptosporidium parvum* "human" genotype in a Dugong (*Dugong dugon*). **J. Parasitol.** v.86, p.1352-1354, 2000.

MORRIS, R. D.; NAUMOVA, E. N.; GRIFFITHS, J. K. Did Milwaukee experience waterborne Cryptosporidiosis before the large documented outbreak in 1993? **Epidemiology**, v.9, n.3, p.264-270, 1998.

MOTA, S. **Preservação e conservação de recursos hídricos**. 2. ed. Rio de Janeiro, ABES, 1995.

MONIS, P.T. ANDREWS, R.H., MAYRHOFER, G. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. **Parasitology** v.116 p.7–19, 1998.

MONTEMAYOR, M.; VALERO, F.; JOFRE, J. LUCENA, F. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. **J. Appl. Microbiol.**, v.99, p. 1455-1462, 2005.

MORRISON, H.G.et al., Genomic Minimalism in the Early Diverging Intestinal Parasite *Giardia lamblia*. **Science**, v. 317, n.5846, p. 1921 – 1926, 2007.

NASSER, A.M.; VAIZEL-OHAYON, D.; AHARONI, A.; REVHUN, M. Prevalence and fate of *Giardia* cysts in wastewater treatment plants. **J. Appl. Microbiol.**, v.113, p.477–484, 2012.

NAUMOVA, E.N., JAGAI, J.S., MATYAS, B., DEMARIA, A., MACNEILL, I.B. AND GRIFFITHS, J.K. Seasonality in six enterically transmitted diseases and ambient temperature. **Epidemiol. Infect.**, v.135, p.281–292, 2007.

NTOUGIAS, S., TANASIDIS, S.; MELIDIS, P. Microfaunal indicators, Ciliophora phylogeny and protozoan population shifts in an intermittently aerated and fed bioreactor. **J. Hazard. Mater.**, v.186, n.2-3, p.1862–9, 2011.

OBERSCHMIDLEITNER, R. e AESCHT, E. Taxonomische Untersuchungen über einige Ciliaten (Ciliophora, Protozoa) aus Belebtschlammern oberösterreichischer Kläranlagen. **Beitr. Naturk. Oberösterreichs**, v. 4, p. 3-30, 1996.

O'CONNOR, R. M.; SHAFFIE, R.; Kang, G.; Ward, H.D. Cryptosporidiosis in patients with HIV / AIDS. **AIDS**. v.25, p.549-560, 2011.

ONO, K.; TSUJI, H.; RAI, S. K.; YAMAMOTO, A.; MASUDA, K.; ENDO, T.; HOTTA, H.; KAWAMURA, T.; UGA, S. Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in western Japan. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, n.9, p.3832-3836, 2001.

Organização das Nações Unidas (ONU) **Ecosistemas e Saúde Humana** – Avaliação Ecosistêmica do Milênio, 2006.

ORTEGA Y.R. & ADAM, R.D. *Giardia*: overview and update. **Clin. Infect. Dis.**, v.25 n.3 p.545–549, 1997.

OTTOSON, J.; NSEN, A.; JÖRLENIUS, B. NORDER, H.; STENSTRÖM. Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. **Water Res.**, v.40, p. 1449-1457, 2006.

PAPADIMITRIOU, C.A.; PAPATHEODOULOU, A.; TAKAVAKOGLU, V.; ZDRAGAS, A.; P. SAMARAS, P.; SAKELLAROPOULOS, G.P.; LAZARIDOU, M.; ZALIDIS, G. Investigation of protozoa as indicators of wastewater treatment efficiency in constructed wetlands. **Desalination** v.250 p.378–382, 2010.

PATTERSON, D. J. **Free-living freshwater protozoa – A colour guide**. Manson Publishing. London, 223p, 1996.

PÉREZ-UZ, B., ARREGUI, L., CALVO, P., SALVADÓ, H., FERNÁNDEZ, N., RODRÍGUEZ, E., ZORNOZA, A., SERRANO, S., Assessment of plausible bioindicators for plant performance in advanced wastewater treatment systems. **Water Res.**, v.44, p.5059–5069, 2010.

POLLICE A, LOPEZ A, LAERA G, RUBINO G, LONIGRO A Tertiary filtered municipal wastewater as alternative water source in agriculture: a field investigation in southern Italy. **Sci. Total Environ.**, v.324, p.201–210, 2004.

POSADA, D. e CRANDALL, K. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. **Trends Ecol. Evol.**, (Personal edition), v.16, n.1, p.37-45, 2001.

POULTON, M.; COLBOURNE, J.; DENNIS, P.J. Thames (England, UK) water's experiences with *Cryptosporidium*. **Water Sci. Technol.**, v.24, n.2, p.21-26, 1991.

RICHARDSON, A.J.; FRANKENBERG, R.A .; BUCK, A .C.; SELKON, J.B.; COLBOURNE, J.S.; PARSOS, J.W.; MAYON-WHITE, R.T. An outbreak of waterborne cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire. **Epidemiol. Infect.**, v.107, p.485-495, 1991.

RIMHANEN-FINNE R, VUORINEN A, MARMO S, MALMBERG S, HANNINEN ML Comparative analysis of *Cryptosporidium*, *Giardia* and indicator bacteria during sewage sludge hygienization in various composting processes. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.38,p.301–305, 2004.

RIPLEY, L.E.; BOYLE, W.C., CONVERSE, J.C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **J. Water Pollution Control Fed.**, v. 58, n. 5, p. 406-411, 1986

ROBERTSON, L.J.; PATON, C.A.; CAMPBELL, A.T.; SMITH, P.G.; JACKSON, M.H.; GILMOUR, R.A.; BLACK, S.E.; STEVENSON, D.A.; SMITH, H.V. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. **Water Res.**, v.34, n.8, p.2310-2322, 2000.

ROBERTSON, L. J.; HERMANSEN, L.; GJERDE, B. K.; STRAND, E.; ALVSVAG, J. O.; LANGELAND, N. Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72, p.2212-2217, 2006.

ROGERS, J. e KEEVIL, C.W. Survival of *Cryptosporidium parvum* in aquatic biofilms. In “**Protozoal Parasites in Water**” edited by THOMPSON, C. e FRICKER, C. Royal Society of Chemistry, London, p. 209–213, 1995.

ROSE, J. B. e SLIKFO, T. R. *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Cyclospora* and their impact on foods: a review. **J. Food Protect.**, v.62, n.9, p.1059-1070, 1999.

SAITOU, N. e NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic Trees. **Mol. Biol. Evol.**, v.4, n.4, p.406-425, 1987.

SANASA – www.sanasa.com.br, acessado em 30 de novembro de 2012.

SALVADÓ, H., GRACIA, M.P., AMIGÓ, J.M., Capability of ciliated protozoa as indicators of effluent quality in activated sludge plants. **Water Res.**, v.29, p.1041–1050, 1995.

SALVADÓ, H.; MAS, M.; MENÉNDEZ, S.; GRACIA, M.P. Effects of Shock Loads of Salt on Protozoan Communities of Activated Sludge. **Acta Protozool.**, v.40, p.177 – 185, 2001.

SANTOS, C. **Estatística Descritiva - Manual de Auto-aprendizagem**, Lisboa, Edições Sílabo, 2007.

SANTOS L.U.; BONATTI T.R.; CANTUSIO NETO R.; FRANCO, R.M.B. Occurrence of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.46, p.309-313, 2004.

SANTOS, L.U.; CANTUSIO NETO, R. FRANCO, R.M.B. Protozoários patogênicos de veiculação hídrica: as metodologias de detecção em amostras de esgoto e a eficiência dos tratamentos de remoção e desinfecção. **Hig. Aliment.**, v. 22, n.1, p. 22-28, 2008.

SATO, M.I.Z. et al., Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. **Sci. Total Environ.**, v.442, p.389–96, 2013.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia e Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative”. **Trends in Parasitol.**, v.22, n.5, 203-208, 2006.

SEARCY, K. E.; PACKMAN, A. I.; ATWILL, E. R.; HARTER, T. Association of *Cryptosporidium parvum* with suspended particles: impact on oocyst sedimentation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.71, n.2, p.1072-1078, 2005.

SEARCY, K.E. et al. Capture and retention of *Cryptosporidium parvum* oocysts by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72, n.9, p.6242–7, 2006.

SERRANO, S.; ARREGUI, L.; PÉREZ-UZ, B.; CALVO, P.; GUINEA, A. **Guidelines for identification of ciliates in Wastewater Treatments Plants**, London; IWA Publishing, 2008.

SHIRLEY, D. A. T.; MOONAHB, S. N.; KOTLOFFA, K. L. Burden of disease from cryptosporidiosis. **Curr. Opin.**, v.25, p.555-563, 2012.

SIBELLE, I., SIME-NGANDO, T., MATHIEU, L. AND BLOCK, J.C. Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, n.1, p.197–202, 1998.

SIQUEIRA-CASTRO, I. C. V. **Taxonomia e morfologia de protistas ciliados presentes em uma estação de tratamento de esgoto pelo processo de lodos ativados da cidade do Rio de Janeiro, RJ**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Zoologia). Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

SIQUEIRA-CASTRO, I. C. V.; SILVA NETO, I. D. Morfologia de ciliados haptorais (Protista: Litostomatea) encontrados em uma estação de tratamento de esgoto da cidade do Rio de Janeiro, RJ. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 11, p. 243-252, 2009.

SITJÀ-BOBADILLA, A.; PADRÓS, F.; AGUILERA C.; ALVAREZ-PELLITERO P. Epidemiology of *Cryptosporidium molnari* in Spanish gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cultures: from hatchery to market size. **Appl. Environ. Microbiol.** v.71, p.131–139, 2005.

SLIFKO, T. R.; SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Emergent parasite zoonoses associated with water and food. **Internat. J. Parasitol.**, v.30, n.12-13, p.1379-1393, 2000.

SPERLING, M. **Princípios básicos do tratamento de esgotos**. v. 2 Belo Horizonte: Departamento de Engenharia sanitária e Ambiental, Editora UFMG, 1996.

SPRONG, H., CACCIO, S.M., VAN DER GIESSEN, J.W.B. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 3, e558, 2009.

SIGNORILE, G.; MOLINARI, A.; LUGOLI, F.; SCIANCALEPORE, L.; P. MONTEMURRO, P.; DONNO, A. D. Study of the correlation between microfauna and the macrostructure of activated sludge and the efficiency of biological wastewater treatment plants. **J. Prev. Med. Hyg.**, v.51, p.15-19, 2010.

SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. **Biometry**. 3. ed. New York, W. H. Freeman, 1995. 850p.

SOLIMAN, R. H.; FUENTES, I.; RUBIO, J. M. Identification of a novel Assemblage B subgenotype and a zoonotic Assemblage C in human isolates of *Giardia intestinalis* in Egypt. **Parasitol. Int.**, v.4, p.507-511, 2011.

SMITH, A.; REACHER, M.; SMERDON, W.; ADAK, G.K.; NICHOLS, G.; CHALMERS, R.M. Outbreak of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Epidemiol. Infect.**, p.1-9, 2006.

SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. *Cryptosporidium*: detection in water and food. **Exp. Parasitol.**, v.124, p.61-79, 2010.

STOTT, R.; MAY, E.; MATSUSHITA, E.; WARREN, A. Protozoan predation as a mechanism for the removal of *Cryptosporidium* oocysts from wastewaters in constructed wetlands. **Water Sci. Technol.**, v.44, n.11-12, p.191-198, 2001.

STOTT, R.; MAY, E.; RAMIREZ, E.; WARREN, A. Predation of *Cryptosporidium* oocysts by protozoa and rotifers: implications for water quality and public health **Water Sci. Technol.**, v. 47, n.3, p.77–83, 2003.

SULAIMAN IM, FAYER R, BERN C, GILMAN RH, TROUT JM, et al. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. **Emerging infectious diseases** v.9, p.1444–1452, 2003.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol. Biol. Evol.**, v.28, p.2731-2739, 2011.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. *Clustal W*: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic. Acids. Res.**, v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.

THOMPSON, R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet.Parasitol.**, v.126, p.15-35, 2004.

THOMPSON, R.C.A.; MONIS, P.T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Adv. Parasitol.**, v.58, p.69-137, 2004.

THOMPSON, R.C.A. **The impact of *Giardia* on science and society.** In: ORTEGA P., G., CACCIO, S.M., FAYER, R., MONK, T.G., SMITH, H.V., THOMPSON, R.C.A. (Eds.), *Giardia and Cryptosporidium: From Molecules to Disease.* CAB International, Wallingford, pp. 1–11, 2009.

THOMPSON, R. C. A.; SMITH, A. Zoonotic enteric protozoa. **Vet. Parasitol.**, v.182, p.70-78, 2011.

THOMPSON, R. C. A.; MONIS, P. *Giardia* – from genome to proteome. **Adv. Parasitol.**, v.78, p.57-95, 2012.

TOCCHI, C.; FEDERICI, E.; FIDATI, L.; MANZI, R.; VINCIGURERRA, V.; PETRUCCIOLI, M.. Aerobic treatment of dairy wastewater in an industrial three-reactor plant: Effect of aeration regime on performances and on protozoan and bacterial communities. **Water Res.**, v.46, p.3334-3344, 2012.

TYAGI, V.K.; SUBRAMANIYAN, S.; KAZMI, A.A. CHOPRA, A.K. Microbial community in conventional and extended aeration activated sludge plants in India. **Ecological Indicators**, v.8, p.550 – 554, 2008.

TUNDISI, J.G. E TUNDISI, T.M. **A água.** São Paulo: Publifolha, 2005.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Office of Water. Washington DC. **Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by filtration/IMS/FA.** EPA-815-R- 05-002, 2005.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Office of Water. Washington DC. **Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA** EPA, 816-R-12-001, 2012

VADSTEIN O, GUNOVER O, OLSEN Y. Particle size dependent feeding by the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Hydrobiologia**, v.255, p.261–7, 1993.

VARELA, C. A. S. **Poluição em águas continentais – alternativas de controle de resíduos líquidos industriais.** São Luís, PPG/EDUUFMA, 1987.

VELESSARD, P. & BIHAN, L.Y. Fixed film process. In: MARA, D. & HORAN, N. **Handbook of water and wastewater microbiology.** Amsterdam: Academic Press, p.317-336, 2003.

VIANA, S.G.F. **Giardiase.** In: AMATO NETO, V.;GRYSCHKEK, R.C.B.; AMATO, V.S.; TUON, F.F. **Parasitologia – uma abordagem clínica.** Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* systematic and Implications for Public Health. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 7, p. 295-297, 2000.

XIAO, L., RYAN, U.M., Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.17, p.483–490, 2004.

XIAO, L. E FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **Int. J. Parasitol.**, v.38, n.11, p.1239–55, 2008.

XIAO, L., FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **Fems. Immunol. Med. Mic.**, v.52, p.309–323, 2008.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Exp. Parasitol.**, 124:80–89, 2010.

ZHOU, K.; XU, M. ;DAI, J.; CAO, H. The microfauna communities and operational monitoring of an activated sludge plant in China, **Eur. J. Protistol.**, v.42, p.291–295, 2006.

ZHOU, K.; XU M.; LIU, B.; CAO, H. Characteristics of microfauna and their relationships with the performance of an activated sludge plant in China. **J. Environ. Sci.**, v.20, p.482–486, 2008.