

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E
URBANISMO
DEPARTAMENTO DE SANEAMENTO E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA SUBTERRÂNEA
E MICROBIOLOGIA DO SOLO EM ÁREA IRRIGADA COM
EFLUENTE DE LAGOA ANAERÓBIA**

Aluno: Rodrigo Carminatti Burbarelli

Campinas, 2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E URBANISMO
DEPARTAMENTO DE SANEAMENTO E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA SUBTERRÂNEA E
MICROBIOLOGIA DO SOLO EM ÁREA IRRIGADA COM EFLUENTE
DE LAGOA ANAERÓBIA**

Aluno: Rodrigo Carminatti Burbarelli

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Guimarães

Co-Orientador: Prof. Dr. Antônio Roberto Siviero

Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Civil, na Área de Concentração em Saneamento e Ambiente.

Campinas, 2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

B91a Burbarelli, Rodrigo Carminatti
Avaliação da qualidade da água subterrânea e microbiologia do solo em área irrigada com efluente de lagoa anaeróbia / Rodrigo Carminatti Burbarelli.-- Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientadores: José Roberto Guimarães e Antônio Roberto Siviero.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo.

1. Águas residuais no solo. 2. Águas residuais de irrigação. 3. Lagoa de estabilização. 4. Microrganismos do solo. 5. Agricultura. I. Guimarães, José Roberto. II. Siviero, Antônio Roberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E URBANISMO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA SUBTERRÂNEA E
MICROBIOLOGIA DO SOLO EM ÁREA IRRIGADA COM EFLUENTE
DE LAGOA ANAERÓBIA**

Aluno: Rodrigo Carminatti Burbarelli

Dissertação de Mestrado aprovada pela Banca Examinadora, constituída por:

Prof. Dr. José Roberto Guimarães
Presidente e Orientador/ FEC - UNICAMP

Prof. Dr. Bruno Coraucci Filho
FEC – UNICAMP

Dr. Ronaldo Stefanuti
CTHIDRO/CNPq – UNICAMP

DEDICATÓRIA

À minha mãe Maristela pelo amor
e apoio, muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor José Roberto Guimarães pela orientação, apoio e compreensão.

Ao Professor Doutor Antonio Roberto Siviero pela co-orientação e valiosas sugestões.

Ao Professor Doutor Bruno Coraucci Filho pelo incentivo, ensinamentos e apoio financeiro na execução desta pesquisa.

Ao Professor Doutor Ronaldo Stefanuti pelo apoio e recursos fornecidos na execução desta pesquisa.

À Professora Doutora Edna Bertocini pelos ensinamentos e ajuda no desenvolvimento na área experimental.

Ao Professor Doutor Durval Rodrigues de Paula Jr. pelos conselhos dados durante o exame de qualificação.

Ao Professor Doutor Roberto Feijó por participar do projeto.

Ao Professor Doutor Edson Aparecido Abdul Nour pelo apoio e orientação nos processos burocráticos.

À minha mãe Maristela pelo apoio, amor e força durante os momentos difíceis que superamos no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu pai Humberto por me ajudar a descobrir maior força em mim mesmo.

Aos meus familiares: tias Mariulda, Paulina, Márcia, tio Zeca. Meus primos Rodolfo, Ricardo e Ana Lídia e especialmente à minha avó Cida.

Aos meus amigos Marcelo, Kuru, Pelúcio, Tais, Patrícia, Fer, Caio, Tarça, Andreza e um grande abraço para o Marcão.

Aos meus colegas de trabalho: Saulo, Bianca, Ligia, Enelton, Cristiano, Patrícia, Marta, Adriano, Paulo e especialmente Camila pela força, colaborando de alguma forma neste trabalho.

RESUMO

Burbarelli, Rodrigo C. Avaliação da qualidade da água subterrânea e microbiologia do solo em área irrigada com efluente de lagoa anaeróbia. Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, UNICAMP, 2004. 102 p Dissertação de mestrado.

Neste projeto avaliou-se a influência da aplicação de efluente de lagoa de estabilização anaeróbia e água no solo, alterações em sua flora microbiana e principalmente alterações na qualidade das águas subterrâneas. Isso se deu por meio de análises de indicadores microbiológicos de poluição e alguns parâmetros físico-químicos, tanto do solo quanto da água subterrânea. O efluente da lagoa de estabilização foi aplicado no solo de duas formas, diretamente e também após receber aplicação de cloro para a remoção de microrganismos. A técnica de aplicação utilizada foi a de sulcos rasos, como forma de pós-tratamento do efluente. Visou-se o reuso agrícola do efluente, ou seja, a utilização da água para irrigação e dos nutrientes presentes nesse efluente, principalmente nitrogênio e fósforo, pela cultura de milho (*Zea mays*). Além disso, a carga orgânica remanescente no efluente favorece o metabolismo microbiano no solo, onde pode ocorrer a conversão da matéria orgânica complexa em formas químicas mais simples, acessíveis à planta. Este sistema possui a vantagem de reduzir e, em alguns casos eliminar o uso de fertilizantes industrializados. Além de suprir a demanda de água requerida no manejo de culturas agrícolas, protege os corpos

d'água receptores da deterioração causada pelo lançamento deste efluente. Os parâmetros microbiológicos monitorados no solo foram fungos totais e bactérias heterotróficas ou totais e os parâmetros físico-químicos foram pH no início e final do experimento e umidade do solo coletado. Com relação à água subterrânea e efluente da lagoa anaeróbia, os parâmetros microbiológicos monitorados foram coliformes totais, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* e bactérias heterotróficas durante a primeira safra. Na segunda e terceira safras passou-se a monitorar ovos de helmintos e cistos de protozoários, também os parâmetros físico-químicos pH e condutividade elétrica. Os dados colhidos durante o desenvolvimento do projeto foram comparados com os índices estabelecidos pela legislação vigente e aspectos de saúde. Esse trabalho é parte do edital do projeto temático CT-HIDRO 2001, financiado pelo CNPQ e pelo Fundo Setorial de Recursos Hídricos. Projeto este que envolve várias faces da engenharia sanitária/ambiental. Os resultados desta pesquisa recomendam a desinfecção dos efluentes para uso na forma de irrigação ou reuso.

Palavras chave: lagoa anaeróbia, água subterrânea, solo, reuso, agricultura.

ABSTRACT

Burbarelli, Rodrigo C. Evaluation of groundwater quality and soil microbiology in irrigated area with anaerobic pond effluent, Campinas:,Civil Egeineering College, State University of Campinas 2004. 102 p Master Degree Dissertation.

The present project the influence of stabilization ponds effluent and water application on soil and changes in its microflora but the main aim was the evaluation of groundwater quality. This research took place by the assessment of microbiological indicators of pollution and a little physicochemical parameters both in soil and groundwater. The effluent application on soil happened directly and after disinfection by chlorine to microbial removal. The technique of application of effluent used was the shallow ruts like a post treatment and reuse of its nutrients like nitrogen and phosphorus in maize crops (*Zea mays*). Furthermore the organic matter that remains on in the effluent improves the microbial metabolism in soil converting this complex organic matter to simple chemical forms assessable to crops. The main advantage of this system is reduce or eliminate the use of fertilizer and water supply necessity protecting the water bodies of degradation. Soil was controlled by microbiological analyses of total fungi and total bacteria and physicochemical analyses of moisture and pH in the beginning and the end of the experiment. Groundwater quality was assessed by microbiological analises: *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* (Enterococos) and heterophic bacteria in the first harvest. In the second and third harvest was assess by physicochemical analyses: pH and electrical condutctivity. Besides helminth eggs and protozoan

cists like a new microbiological analysis. The presents work data was compared to the present legislation and heal aspects. This work is part of a licence of the project CT-HIDRO 2001 financed by CNPq and Fundo Setorial de Recursos Hídricos. This project involves many faces of environmental engeneering. The results reached in this work suggests that the desinfection of efluente is necessary to the use of this water in irrigation and reuse.

Key words: stabilization pond, groundwater, soil, reuse, agriculture.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Lagoas de estabilização anaeróbias	5
3.2 Microrganismos das águas subterrâneas	8
3.3 Microrganismos do solo	11
3.4 Microrganismos monitorados	15
3.4.1 Indicadores microbiológicos de poluição	15
3.4.1.1 Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	17
3.4.1.2 Bactérias heterotróficas ou totais	20
3.4.1.3 <i>Streptococcus faecalis</i> e Enterococos	22
3.4.1.4 Bolores totais	23
3.4.1.5 Ovos de Helminhos e cistos de Protozoários	24
3.5 Parâmetros físico-químicos monitorados	25
3.5.1 Umidade do solo	26
3.5.2 Potencial hidrogeniônico (pH) da água	26
3.5.3 Condutividade elétrica da água	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Área experimental	29
4.2 Poços de monitoramento da água subterrânea	32
4.3 Coletas e preparo das amostras de solo	33
4.4 Coleta das amostras da água subterrânea	33
4.5 Metodologias utilizadas nas análises da água subterrânea e do solo	35
4.5.1 Determinação da umidade do solo	35

4.5.2 Determinação do pH da água subterrânea	36
4.5.3 Determinação da condutividade elétrica da água subterrânea	36
4.6 Metodologias para as análises microbiológicas das amostras de água	36
4.6.1 Metodologia para a determinação de Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> pelo método do substrato definido Colilert [®] utilizando cartelas Quanty-Tray [®]	36
4.6.2 Técnica da contagem de microrganismos em placas " Pour Plate"	37
4.6.3 Metodologia para a identificação e quantificação de <i>Streptococcus faecalis</i> e Enterococos	38
4.6.4 Metodologia para a determinação de ovos de Helmintos e cistos de protozoários ,método de Hoffman, Pons & Janner ou Lutz	39
4.7 Diluições das amostras para ensaios microbiológicos	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Efluente aplicado	43
5.2 Poços de monitoração	44
5.2.1 pH	45
5.2.2 Condutividade elétrica	48
5.2.3 Bactérias Heterotróficas	51
5.2.4 <i>Streptococcus faecalis</i> (Enterococos)	55
5.2.5 Coliformes totais	57
5.2.6 <i>Escherichia coli</i>	61
5.2.7 Ovos de Helmintos e cistos de protozoários	65
5.2.8 Bactérias heterotróficas e fungos totais do solo	66
6 CONCLUSÃO	72
ANEXOS	75
REFERÊNCIAS	97

LISTA DE FIGURAS

3.1 Lagoa de estabilização anaeróbia da ETE – Graminha (Limeira-SP)	8
4.1 Área experimental na Estação de Tratamento de Esgotos-ETE Graminha (LIMEIRA-SP)	30
4.2 Sulcos irrigados com efluente da lagoa anaeróbia na área experimental de ETE-Graminha (LIMEIRA-SP)	30
4.3 Disposição dos poços de monitoramento e parcelas de irrigação montadas na área experimental da ETE-Graminha (LIMEIRA-SP)	31
4.4 Poço de monitoramento da água subterrânea	32
4.5 Sistema de coleta de amostras de água dos poços de monitoramento	34
5.1 Valores de pH nos comparados ao Poço P6	49
5.2 Valores de condutividade elétrica nos poços comparados ao Poço P6	52
5.3 Valores de bactérias heterotróficas de P6 comparados com os poços do cenário água	55
5.4 Valores de bactérias heterotróficas de P6 comparados com os poços do cenário efluente	55
5.5 Comparação dos valores de bactérias heterotróficas entre P6 e D40	56
5.6 Comparação dos valores de Enterococos entre os poços dos cenários água, efluente e efluente desinfetado	58
5.7 Valores de coliformes totais de P6 comparados com os poços do cenário água	61
5.8 Valores de coliformes totais de P6 comparados com os poços do cenário efluente	61
5.9 Comparação dos valores de coliformes fecais entre P6 e D40	62

5.10 Valores de <i>E.coli</i> de P6 comparados com os poços do cenário água	65
5.11 Valores de <i>E.coli</i> de P6 comparados com os poços do cenário efluente	65
5.12 Comparação dos valores de <i>E.coli</i> entre P6 e D40	66
5.13 Valores de Ovos de helmintos e cistos de protozoários	67
5.14 Parcelas de solo do cenário água comparadas às parcelas do cenário efluente para o parâmetro bactérias heterotróficas	70
5.15 Parcelas de solo do cenário água comparadas às parcelas do cenário efluente desinfectado para o parâmetro bactérias heterotróficas	70
5.16 Parcelas de solo do cenário efluente comparadas às parcelas do cenário efluente desinfectado para o parâmetro bactérias heterotróficas	71
5.17 Parcelas de solo do cenário água comparadas às parcelas do cenário efluente para o parâmetro fungos totais	71
5.18 Parcelas de solo do cenário água comparadas às parcelas do cenário efluente desinfectado para o parâmetro fungos totais	72
5.19 Parcelas de solo do cenário efluente comparadas às parcelas do cenário efluente e efluente desinfectado para o parâmetro fungos totais	72

LISTA DE TABELAS

3.1 Principais grupos de microrganismos do solo e suas características (SIQUEIRA, 1994)	12
3.2 Padrões de coliformes em corpos d'água	18
3.3 Sobrevivência de patógenos no solo	25
4.1 Metodologias utilizadas nas análises laboratoriais	41
5.1 Características físico-químicas analisadas do efluente aplicado	44
5.2 Padrões de potabilidade para a água de consumo humano	46
5.3 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro pH	47
5.4 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço P6 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro pH	48
5.5 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço D40 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro pH	49
5.6 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro condutividade elétrica	50
5.7 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço P6 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro condutividade elétrica	51
5.8 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço D40 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro condutividade elétrica	51

5.9 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro bactérias heterotróficas	53
5.10 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço P6 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro bactérias heterotróficas	54
5.11 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço D40 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro bactérias heterotróficas	54
5.12 Comparação entre os poços para o parâmetro Enterococos	57
5.13 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro coliformes totais	59
5.14 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço P6 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro coliformes totais	60
5.15 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço D40 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro coliformes totais	60
5.16 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro <i>E.coli</i>	63
5.17 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço P6 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro <i>E.coli</i>	64
5.18 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço D40 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro <i>E.coli</i>	64
5.19 Comparação entre as parcelas de aplicação nos três cenários para o parâmetro bactérias heterotróficas do solo	69
5.20 Comparação entre as parcelas de aplicação nos três cenários para o parâmetro fungos totais do solo	69

1 Introdução

A água residuária tratada pode ser utilizada de uma maneira planejada para diversas finalidades. O reuso de despejos tratados não é prática nova, entretanto, ultimamente tem havido um crescente interesse em relação a esta reutilização. Os tipos de reuso dessas águas podem ser como água não potável municipal, de emprego não nobre, como água para abastecimento público, para piscicultura, para aplicação no solo ou para a utilização em finalidades secundárias (CAMPOS, 1999).

A avaliação da qualidade da água subterrânea tradicionalmente envolve a investigação de componentes físicos e químicos. A avaliação de características microbiológicas é de uso recente, envolvendo principalmente a presença ou ausência de coliformes fecais (THORN, 1992).

O crescimento dos impactos sobre as águas subterrâneas, provenientes de práticas agrícolas é, aparentemente, um fenômeno recente associado ao aumento do uso de fertilizantes químicos e pesticidas sintéticos (KRAFT, 1999).

Como consequência da aplicação na agricultura de efluentes líquidos ocorre a percolação destes para as camadas mais profundas do solo, podendo ocorrer a contaminação das águas subterrâneas e do solo por substâncias químicas, como também por microrganismos presentes no efluente, sendo necessária, portanto, uma investigação e monitoração destes parâmetros.

A aplicação de efluente oriundo de lagoa de estabilização utilizado no tratamento de esgoto doméstico no solo como forma de fertilização, é interessante devido à presença de nutrientes indispensáveis para as plantas, como nitrogênio e fósforo. Por outro lado há também nesse tipo de efluente grande quantidade de microrganismos, muitos deles patogênicos, podendo estes contaminar o solo e percolar para as águas subterrâneas carregados pela própria água do efluente e com o auxílio de precipitações.

Embora a introdução de microrganismos externos em um ambiente natural que já possua uma flora microbiana autóctone estabelecida gere uma competição entre essas duas comunidades, o que acontece normalmente é que a comunidade

autóctone prevaleça na competição por nutrientes, terminando por eliminar o grupo que foi introduzido, minimizando o efeito de percolação de microrganismos para níveis mais profundos do solo (ALEXANDER, 1977; ODUM, 1988).

2 Objetivos

Os objetivos definidos para o presente trabalho foram subdivididos em gerais e específicos, descritos a seguir.

2.1 Objetivos gerais

Avaliar os aspectos sanitários da água subterrânea e do solo de uma área com cultura de milho, que recebe a aplicação de efluente de lagoa de estabilização anaeróbia, desinfectado por cloração e água, por meio de análises microbiológicas e físico-químicas.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas das águas subterrâneas por meio de análises de parâmetros microbiológicos e físico-químicos, tais como:

- Coliformes totais;
- *Escherichia coli*;
- *Streptococcus faecalis*;
- Bactérias heterotróficas ou totais;
- Ovos de helmintos;
- Cistos de protozoários.

Avaliar as características físico-químicas e parâmetros microbiológicos do solo, como:

- pH, no início Fungos totais. e no final do experimento;
- Bactérias heterotróficas totais;
- Fungos totais.

3 Revisão bibliográfica

Este capítulo visa abordar os principais pontos envolvidos no projeto, como lagoas de estabilização, microrganismos em águas subterrâneas, microrganismos no solo e também os parâmetros microbiológicos e físico-químicos monitorados.

3.1 Lagoa de estabilização anaeróbia

Uma tarefa quase impossível é determinar onde e quando se utilizaram lagoas de estabilização de esgotos sanitários pela primeira vez, visto que há séculos se emprega o princípio de tanques que recebiam aplicação de fezes, visando a produção de peixes. Essa prática era comum na China, onde usavam as fezes humanas ao invés de suínas.

Em alguns países europeus, entre eles a Alemanha, desde longa data vêm sendo utilizados tanques de criação de peixes para melhorar as condições gerais das estações de tratamento de esgotos (VICTORETTI, 1973).

Os sistemas de lagoas de estabilização constituem-se na forma mais simples para o tratamento dos esgotos, podendo ser facultativas, anaeróbias, aeradas facultativas, sistema de lagoas aeradas de mistura completa seguidas por lagoas de decantação e lagoas de maturação.

As lagoas anaeróbias constituem-se em uma forma alternativa de tratamento de efluentes, onde a existência de condições estritamente anaeróbias é essencial, o que é alcançado através do lançamento de altas cargas de DBO por unidade de volume da lagoa, fazendo com que a taxa de consumo de oxigênio seja sempre superior à taxa de produção.

A estabilização em condições anaeróbias é lenta, devido à baixa taxa de reprodução das bactérias anaeróbias. A temperatura do meio tem grande influência nas taxas de reprodução e estabilização, o que faz com que locais com temperatura elevada, como o Brasil, se tornem propícios a esse tipo de lagoas.

A estabilização anaeróbia é um processo biológico que se desenvolve através de um consórcio de diferentes tipos de microrganismos, que na ausência de oxigênio molecular, promovem a transformação de compostos orgânicos complexos (lipídeos, proteínas e carboidratos) em produtos mais simples como metano e gás carbônico.

Isso ocorre através da ação de grupos específicos de bactérias heterotróficas que realizam esta conversão através de seus processos metabólicos, sendo cada grupo de bactérias responsável por uma das quatro etapas do processo de estabilização anaeróbia, que são hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (CAMPOS et al, 1999).

Nesse processo, o grupo das *Archaeobactérias* tem se mostrado importante. Estas bactérias, divididas em mais de 200 espécies, diferem das Eubactérias principalmente pela ausência de peptidoglicanos em sua parede celular.

Diferenças bioquímicas sugerem que elas divergiram evolutivamente das outras bactérias praticamente desde a origem da vida no planeta.

Elas se dividem em três grupos: Halófilas, que habitam ambientes extremamente salgados; Termoacidófilas, que normalmente crescem em ambientes com altas temperaturas, 60 ° C, e baixo pH, 1 a 2 (ácido sulfúrico concentrado); E as Metanogênicas, as mais importantes nos sistemas de tratamento anaeróbio, que produzem metano à partir de CO₂ e hidrogênio. São habitantes de sedimentos de pântanos, esgotos e são comuns no trato digestivo de seres humanos e outros animais (BERG, 1997).

A preocupação em monitorar os microrganismos envolvidos no presente projeto deve-se principalmente ao fato de que o efluente aplicado vem de uma lagoa de estabilização anaeróbia de esgoto doméstico.

Neste tipo de tratamento, ocorre uma remoção da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) da ordem de 50 – 60 %, o que deixa uma considerável porção de matéria orgânica para ser metabolizada pelos microrganismos do solo, podendo ser convertida em formas químicas acessíveis à planta.

O ponto mais importante a ser considerado neste trabalho, é que os sistemas de lagoas anaeróbias também possuem uma baixa remoção de patógenos (VON SPERLING, 1996).

O tempo de residência hidráulica do efluente no sistema de lagoas de estabilização é o principal parâmetro a ser considerado. No que diz respeito à remoção e inativação de microrganismos patogênicos.

Este tempo é de vital importância, seguido por fatores como velocidade e direção do vento, topografia do leito, zonas mortas e sistemas de entrada e saída de efluente na lagoa, caso algum destes fatores cause um curto circuito no fluxo, o rendimento do sistema será reduzido (CAMPOS et al, 2000).

Segundo FASCIOLO (2002), a irrigação utilizando efluente tratado num sistema de valas de oxidação pode produzir alho e cebola em quantidades iguais as que seriam obtidas, se fosse utilizada a irrigação com água, adicionando-se quantidades recomendadas de nitrogênio e fósforo para o tipo de solo onde os experimentos foram realizados por sua equipe. A produção irrigada com efluente foi 10 a 15 % maior do que a irrigada com água de poço sem fertilizantes. Com relação à contaminação microbiológica, a lavagem e o tempo de armazenamento do alho (90 dias) e da cebola (55 dias), foram suficientes para atingir valores aceitáveis de *E. coli*.

A Figura 3.1 mostra a lagoa de estabilização da ETE – Graminha, localizada no Município de Limeira – SP, de onde foi coletado o efluente utilizado no presente trabalho.



Figura 3.1 Lagoa de estabilização anaeróbia da ETE – Graminha (Limeira-SP)

3.2 Microrganismos em águas subterrâneas

A água no planeta Terra circula do solo, plantas, seres vivos e corpos aquáticos para a atmosfera, e da atmosfera de volta para a terra, em um processo chamado ciclo hidrológico.

Este ciclo é a passagem da água para a atmosfera pela evaporação de oceanos, outros corpos d'água da superfície e pela evapotranspiração das folhas de plantas, seres vivos, através da transpiração, excreção e processos metabólicos.

Outros processos liberam água para a atmosfera, como atividades industriais e atividades vulcânicas (ODUM, 1988). Conseqüentemente essa água que evapora retorna à superfície do planeta através da precipitação da umidade acumulada na atmosfera na forma de chuva, neve ou granizo.

As águas naturais podem servir de habitat para muitos microrganismos, dependendo de condições físico-químicas que prevalecem naquele ambiente, como temperatura, luminosidade, pH e nutrientes (PELCZAR et al, 1996).

A água que se move abaixo da superfície, ou água subterrânea, passa por uma filtração no próprio solo, que remove a maioria dos microrganismos. Por essa razão, as águas de fontes e poços profundos normalmente são de boa qualidade quando comparadas às águas superficiais.

Como cada vez mais se tornam escassas as fontes de água doce, alternativas para o seu reuso tem se tornado objeto de estudo em diversas partes do mundo, na tentativa de se aumentar a possibilidade de obtenção desse recurso.

Segundo ASANO et al (2004), quando se torna necessário um aumento no suprimento de água subterrânea, uma recarga artificial do subsolo pode ser feita através da aplicação de esgoto através de planejamento, tratamento e controle da qualidade da água subterrânea apropriados, para que não ocorra contaminação.

Uma das mais perigosas formas de contaminação da água, disseminando doenças, ocorre quando microrganismos presentes em fezes humanas penetram no sistema de abastecimento de água, devido a falhas no processo de tratamento, ou por possíveis fontes de contaminação no sistema de distribuição.

Muitas doenças são perpetuadas pela rota fecal – oral de transmissão, onde patógenos se abrigam nas fezes humanas ou de animais, sendo veiculados pela água contaminada e ingeridos. Exemplos de doenças, tais como, febre tifóide e cólera, são causadas por bactérias que se alojam somente nas fezes humanas (TORTORA et al, 2002).

No Brasil, as águas subterrâneas constituem uma fonte importante de abastecimento, sendo que no Estado de São Paulo mais de 20.000 poços profundos, e uma quantidade muito maior de poços rasos, fornecem água para o abastecimento público, uso industrial e irrigação (VENDEMIATTI, 2003).

Entre 1971 e 1980, o uso de águas de poços não tratadas foi responsável por mais de 35% das ocorrências de doenças de veiculação hídrica nos Estados Unidos. Isso aponta para o potencial de contaminação por microrganismos patogênicos das águas subterrâneas. As maiores fontes de contaminação destes organismos são os efluentes domésticos, lodo derivado de estações de tratamento e efluentes de tanques sépticos (MITCHELL, 1992).

A precipitação tem um efeito determinante na contaminação de águas subterrâneas por microrganismos, promovendo a penetração destes no solo pela ação de arraste provocado pela água da chuva.

ARNADE (1999), estudou a contaminação da água subterrânea por coliformes em quatro regiões de Palm Bay, Flórida (EUA). Nesse trabalho foram comparadas as concentrações de coliformes durante as estações seca e chuvosa, através da monitoração por poços. As concentrações de coliformes durante a estação chuvosa, foi praticamente duas vezes maior do que as encontradas na estação seca em todas as quatro regiões.

Segundo MUHAMMETOGLU (2002), numa área agrícola na Turquia, com área de 6 km por 5 km, foram instalados nove pontos de monitoramento da água subterrânea, onde se avaliou a penetração de fertilizantes e coliformes fecais na água subterrânea e parâmetros físicos do solo. Concluiu-se que as concentrações de compostos químicos aplicados no solo, bem como a qualidade da água de irrigação, determinam o grau de vulnerabilidade da água subterrânea às fontes difusas de contaminação agrícola.

Isso demonstra que qualquer tipo de aplicação no solo requer um rigoroso estudo e monitoração de impactos no próprio solo e na água subterrânea.

A Resolução 20 – CONAMA, de 1986, caracteriza a água subterrânea como classe especial, de acordo com o artigo 18 desta resolução, portanto a presença de microrganismos indicadores de poluição deve ser monitorada, visando-se evitar a dispersão de uma possível contaminação pontual para poços utilizados para o consumo.

3.3 Microrganismos no solo

O solo é constituído por um grande número de microrganismos, uma colher de chá de solo fértil pode conter bilhões de microrganismos, como bactérias, actinomicetos, fungos filamentosos, leveduras, algas, protozoários, nematódeos e vírus, em grande quantidade e diversidade de espécies. Direta ou indiretamente estes microrganismos convertem dejetos e corpos de animais mortos, tecidos de plantas em substâncias que enriquecem o solo (PELCZAR,1996).

Os microrganismos desempenham um papel importante na gênese do habitat onde vivem. Em ecossistemas em clímax, a biota e o solo encontram-se em equilíbrio dinâmico, garantindo sua sustentabilidade e a biodiversidade.

Do ponto de vista microbiológico o solo é um ambiente extremamente estressante, fortemente limitado por nutrientes, mas capaz de sustentar uma população microbiana extremamente diversa.

Os microrganismos ocupam menos de 5 % do espaço poroso do solo, sendo a presença de um microrganismo no solo a expressão de sua reação às condições ambientais, dentro dos limites de sua bagagem genética. Isso permite sua sobrevivência de forma ativa ou dormente, sendo este último o predominante nos solos em geral (SIQUEIRA et al, 1994).

Esse estado de latência permite a sobrevivência dos microrganismos por longos períodos no solo (Tabela 3.3), até que o ambiente volte a apresentar condições favoráveis.

Além disso, a biomassa microbiana representa uma pequena fração da concentração de nitrogênio e carbono no solo, porém a rápida conversão do seu material celular resulta na liberação de nitrogênio mineralizado e outros nutrientes importantes para a nutrição das plantas, favorecendo o seu crescimento (KUMAR SINGH et al. 2002).

A Tabela 3.1 apresenta os principais microrganismos presentes no solo e suas principais características.

Tabela 3.1 Principais grupos de organismos do solo e suas características (SIQUEIRA et al, 1994).

Grupo de organismos	Organização celular	Tamanho/ Morfologia	Fisiologia/ Nutrição	Importância no solo	Representantes principais
Macro e mesofauna	eucarioto eluricelular	> 0,2 mm variada	Saprófita Herbívoros Detritívora	Decomposição Predação Parasita	Minhocas Artrópodes Moluscos
Microfauna	eucarioto unicelular/ pluricelular	< 0,16 mm variada	Saprófita Predadores	Decomposição Equilíbrio biológico	Nematóides Protozoários Rotíferos
Bactérias	procarioto unicelular	0,5-2,0µm bacilo, coco	Heterotrófica Autotrófica Simbiótica	Mineralização Transformação Patógenos Biocontrole Simbionte	<i>Pseudomonas</i> <i>Rhizobium</i> <i>Bacillus</i> <i>Arthrobacter</i>
Actinomicetos	procarioto pluricelular	0,5-1,2µm filamentoso	Heterotrófica Simbiótica	Transformação Patógenos Biocontrole	<i>Actinomyces</i> <i>Streptomyces</i>
Fungos	eucarioto unicelular/ pluricelular	5-10 µm filamentoso	Heterotrófica Simbiótico	Decomposição Patógenos Biocontrole Simbionte	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Pythium</i> <i>Phytophthora</i>
Algas verde-azuladas	procarioto unicelular/ pluricelular	< 10 µm filamentoso	Autotrófica Simbiótica	Fotossíntese Fixação de N ₂	<i>Anabaena</i> <i>Nostoc</i> <i>Tolypotrix</i>
Algas verdes	eucarioto unicelular/ pluricelular	variada	Autotrófica	Fotossíntese	<i>Chlorella</i> <i>Chlorococcum</i>

A matéria orgânica presente no solo pode ser classificada em três grupos: insolúveis (húmus), solúveis (açúcares, aminoácidos e compostos fenólicos) e microbiana (PELCZAR et al, 1996).

O destino dos microrganismos no solo e aquíferos, é comandado por seu transporte e persistência nestes ambientes. A sobrevivência e transporte de patogênicos em solos e aquíferos são controlados por quatro fatores principais: clima (temperatura e precipitação), tipo do solo ou material do aquífero, (textura, pH, capacidade de retenção de água e capacidade de troca de cátions), porosidade (saturação) e tipo do patógeno.

O tópico da sobrevivência de bactérias entéricas no solo tem sido amplamente revisto, os fatores que controlam sua sobrevivência neste ecossistema complexo são temperatura, umidade, luminosidade, pH, matéria orgânica, tipo da bactéria e microflora antagonista.

Alguns patógenos como as micobactérias são extremamente resistentes e sobrevivem por vários meses no solo. A sobrevivência de patógenos em solos ácidos é geralmente menor, outro fator que provoca diminuição da microflora na superfície do solo é a luz solar.

A predação por protozoários associada às relações de competição e antagonismo com outras bactérias e fungos, pela produção de antibióticos, pode contribuir para o decaimento da comunidade de patógenos bem como das bactérias indicadoras de poluição no solo (MITCHELL, 1992).

Segundo STOTT (2003) a predação realizada por protozoários de vida livre é responsável pela remoção de bactérias em sistemas aeróbios de tratamento de esgoto. Em seu trabalho foi avaliada, a ação predatória dos protozoários sobre oocistos de *Cryptosporidium*, um protozoário patogênico, responsável pelo desenvolvimento de doenças gastrointestinais. Isso prova que a ação predatória dos protozoários se aplica também em um autocontrole populacional.

A remoção de bactérias e vírus em sistemas de tratamento de efluentes no solo ocorre pela combinação de processos como filtração, dessecação, adsorção, radiação e predação (REED, 1995).

O conjunto das relações estabelecidas entre as espécies estabelece o clímax da comunidade, num dado habitat.

Há diversos tipos de relações que podem ocorrer entre duas espécies, podendo ser benéficas como o neutralismo, onde os dois microrganismos

comportam-se de maneira totalmente independente. Na simbiose, ocorre que os dois simbioses associados se beneficiam da relação. Isso pode ser exemplificado pela ação *Rhizobium*-Leguminosa, onde a bactéria promove a fixação do nitrogênio do solo para a planta, recebendo desta exudatos liberados por suas raízes.

A protocooperação é benéfica para as duas espécies, mas não há uma obrigatoriedade dessa interação para sua sobrevivência.

Na relação de comensalismo, uma espécie se beneficia enquanto a outra não é afetada. Um exemplo disso ocorre quando uma espécie ataca um substrato indisponível para segunda espécie, transformando esse composto numa forma acessível.

Outro exemplo de comensalismo ocorre pela síntese de compostos por certos microrganismos, sua excreção permite a proliferação de microrganismos nutricionalmente fastidiosos do solo, sendo que estes microrganismos heterotróficos sustentam os deficientes na natureza.

O comensalismo no solo também pode ocorrer pela ação de microrganismos aeróbios, que ao consumir o oxigênio, favorecem o crescimento de microrganismos anaeróbios obrigatórios, bem como alterações do pH do solo, provocada por determinada espécie, podem favorecer uma outra.

Também podem ocorrer relações não benéficas para uma das espécies de microrganismos envolvida. Exemplos disso são relações de competição, onde ocorre a supressão de um organismo, quando duas espécies lutam por quantidades limitadas de nutrientes, normalmente o principal nutriente disputado é o carbono.

No amensalismo ocorre a supressão de uma espécie enquanto a outra não é afetada, isto resulta da produção de toxinas. Essas toxinas, como antibióticos, podem ser produzidas por fungos, actinomicetos e bactérias em condições de laboratório, mas sua ação em ambiente natural pode não ser fundamental na eliminação de outras espécies.

Finalmente, podem ocorrer relações de parasitismo e predação, estas consistem no ataque direto de um organismo sobre o outro. Um exemplo de

predação na microflora do solo, é a ação de protozoários que se alimentam de bactérias, sua principal fonte de nutrientes.

O parasitismo pode ocorrer pela ação de bactérias e alguns fungos capazes de penetrar em protozoários, sendo que as bactérias se reproduzem dentro do animal até seu rompimento ou lise. O mesmo pode ocorrer pela ação de vírus sobre bactérias.

Estas relações favorecem a comunidade autóctone do solo, promovendo a destruição da comunidade introduzida. Um exemplo foi demonstrado pela introdução de 10^9 UFC/g de solo do microrganismo patogênico *Corynebacterium insidiosum* em solo natural. Após sete dias o microrganismo não pôde mais ser detectado.

Isso ocorre similarmente com os patogênicos entéricos introduzidos no solo, que tendem a ser destruídos pela microflora nativa (ALEXANDER, 1977).

3.4 Microrganismos monitorados na água subterrânea e no solo

A seguir serão abordados os microrganismos envolvidos neste trabalho, na monitoração da água subterrânea e do solo.

3.4.1 Indicadores microbiológicos de poluição

Microrganismos indicadores da perda de qualidade sanitária em alimentos têm sido utilizados na avaliação da qualidade da água desde a virada do século XIX para XX. Coliformes totais e *Escherichia coli* (*E. coli*) são os mais utilizados na detecção de problemas sanitários.

A análise microbiológica de rotina da água para a avaliação de sua potabilidade, não é e não deve ser, baseada na identificação de microrganismos patogênicos, devido ao seu acesso esporádico ao ambiente hídrico e baixo tempo de sobrevivência nessas condições, podendo ser perdidos em uma amostra

submetida a análises laboratoriais. Além disso, são necessárias 24 horas para sua detecção em laboratório, tempo suficiente para que um grande número de pessoas faça uso dessa água contaminada. Por essas razões os microrganismos indicadores são a opção de parâmetro microbiológico da qualidade sanitária de água. (PELCZAR, 1996).

A presença desses microrganismos indica a possibilidade da contaminação por patógenos, fezes humanas e ou de animais de sangue quente, não constituindo, os indicadores, um risco propriamente dito à saúde pública.

Para ser considerado um indicador de contaminação fecal um microrganismo deve obedecer a algumas características importantes que são:

1. Estar presentes em águas poluídas e ausentes em águas potáveis;
2. Estar presentes na água quando os microrganismos patogênicos estiverem presentes;
3. O número de microrganismos indicadores está correlacionado com o índice de poluição;
4. Sobreviver melhor e por mais tempo na água do que os microrganismos patogênicos;
5. Apresentar propriedades uniformes e estáveis;
6. Geralmente ser inofensivo ao homem e a outros animais;
7. Estar presente em maior número do que os patogênicos;
8. Ser facilmente evidenciado por técnicas laboratoriais padronizadas;
9. Ser mais resistentes que os patógenos às técnicas de desinfecção (PELCZAR, 1996; TORTORA et al, 2002).

Não existe microrganismo que se enquadre perfeitamente na definição acima descrita, por isso outros microrganismos foram sugeridos como indicadores alternativos de contaminação fecal, como o *Streptococcus faecalis* (*S. faecalis*) ou Enterococos, *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) e os vírus entéricos, que podem ser carregados juntos aos dejetos humanos para o ambiente.

Além destes, bactérias patogênicas potencialmente causadoras de diarreia como *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Plesiomonas*, *Aeromonas* e *Vibrios* merecem atenção na determinação da qualidade sanitária de corpos d'água em zonas rurais, desprovidas de água tratada (POTGIETER, 2003).

Uma grande variedade de indicadores biológicos alternativos, tem sido investigados quanto ao seu potencial de diferenciação entre as fontes de contaminação fecal, como *Bifidobacterium*, Colifagos RNA F-específicos, *Bacteróides frfragilis*, perfis de resistência a antibióticos em *E.coli*, espécies de *Streptococcus*.

Parâmetros químicos como ácidos biliares, cafeína e esteróides também são temas de estudos mais recentes sobre as origens da contaminação fecal (GILPIN et al, 2003).

3.4.1.1 Coliformes totais e *Escherichia coli*

O grupo coliforme consiste de bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporulados, que fermentam lactose formando ácido e gás em 24 – 48 h em meio líquido ou sólido na faixa de 32 – 35 °C (LEDERBERG, 1992; PELCZAR, 1996; TORTORA, 2002).

Os gêneros incluídos no grupo coliforme são *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Escherichia*.

Os coliformes totais são comumente encontrados nas fezes de animais de sangue quente, material vegetal e no solo, por isso a *E. coli* é a mais utilizada como indicador direto de contaminação por fezes, pois sua presença está intimamente ligada à presença de contaminação fecal.

Por outro lado, o uso destes microrganismos como indicadores de contaminação fecal, incluindo *E. coli*, *S. faecalis* e coliformes totais vem sendo questionados na validade deste propósito. A Tabela 3.2 mostra os padrões estabelecidos pela resolução CONAMA – 20, de 1986 para coliformes totais e fecais em corpos d'água, de acordo com a classe do corpo receptor.

Tabela 3.2 Padrões de coliformes em corpos d'água (Resolução CONAMA-20, de 1986).

Classe do corpo d'água receptor	Coliformes fecais (UFC/100 mL)	Coliformes totais (UFC/100 mL)
Especial	Ausente*	Ausente*
1	200	1000
2	1000	5000
3	4000	20000
4	Não há padrão**	Não há padrão**

* Não são permitidos quaisquer lançamentos, mesmo tratados

** Não há padrão para coliformes, pois as águas de Classe 4 não são indicadas para abastecimento, irrigação ou balneabilidade.

GAUTHIER et al (2001) reporta que em sete indústrias canadenses de papel, na qual análises de amostras coletadas do sistema interno de tratamento de efluentes, apresentaram o crescimento de diversos tipos de coliformes, especialmente *Klebsiella spp.*, *E. coli*, *Enterobacter spp.* e *Citrobacter spp.* Das sete indústrias estudadas, seis não apresentavam introdução de esgoto no sistema, desinfetando a água introduzida, mesmo assim, em todo o sistema das sete indústrias foram encontrados *E.coli*. O estudo concluiu que:

1- Tanto coliformes totais quanto *E. coli* crescem continuamente na maioria, senão em todas as fábricas de papel estudadas, sendo as áreas preferenciais tanto para coliformes como para enterococos (*S. faecalis*), as máquinas de papel, biofilmes na maquinaria e tubulações e o clarificador primário.

2- As temperaturas de 40 – 60 °C, típicas do sistema de água das fábricas de papel selecionam cepas termotolerantes de coliformes.

3- Os coliformes isolados do sistema podem crescer rápida e extensivamente no sistema de água da fábrica.

4- Três espécies indicadoras, *E. coli*, *S. faecalis* e *Streptococcus faecium* (*S. faecium*), são onipresentes no sistema de circulação de água dessas fábricas de papel, que não possuem entrada de material fecal conhecida, sendo sua quantificação inútil como avaliação de risco à saúde, a menos que sejam variedades patogênicas de *E. coli*.

5- A ausência de variedades patogênicas de *E. coli*, *Salmonella* e contaminação fecal sugerem que o despejo dessas águas é feito independente da carga de coliformes e enterococos, não apresentando risco à saúde dos operários nem à saúde da população, considerando-se que não ocorra a adição de esgoto bruto na rede.

6- A regulagem do sistema, baseada no número de coliformes totais, *E. coli* e *S. faecalis* presentes no sistema não está protegendo a saúde pública. A demonstração da ausência de formas patogênicas de *E. coli* e *Salmonella* seria uma melhor forma de controle.

Isso confirma a dificuldade de se estabelecer um indicador microbiológico que seja totalmente seguro para se determinar uma fonte de poluição de origem fecal, em relação a microrganismos sempre há exceções, devido à complexidade de suas interações entre si e com o meio ambiente.

No caso de aplicação de efluentes no solo, a adsorção e sobrevivência comparadas de *E. coli*, colifagos somáticos e RNAfagos F-específicos em área irrigada com efluente doméstico demonstrou que os colifagos somáticos contaminam o solo em profundidades muito maiores do que a *E.coli* e os RNAfagos, sobrevivendo por mais tempo tanto no solo quanto no efluente líquido (GANTZER et al, 2000).

MASCHER et al (2003), determinou que as taxas de redução de *E. coli* mostraram significativa correlação com intensidade da radiação solar, ou o tempo de duração do dia. Comparando águas de banho com altas e baixas turbidez, ele demonstrou que quanto menor a turbidez da água, possibilitando uma maior penetração da luz, maior é a taxa de redução de *E. coli*.

Segundo NOLA et al (2002), a abundância de *E. coli* e *S. faecalis* nas águas subterrâneas da área equatorial da República de Camarões, foi correlacionada com parâmetros físico-químicos, como pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, cloretos, sódio, potássio, cálcio e magnésio em simulação de um biótopo de primavera em laboratório, onde o aumento no valor desses parâmetros favoreceu o aumento da população destes microrganismos.

Por outro lado, análises realizadas em amostras colhidas em ambiente natural similar geraram resultados heterogêneos quando a mesma correlação foi feita. Isto demonstra a dificuldade e a falta de informações sobre a dinâmica das populações microbianas presentes no solo e suas interações com os fatores abióticos e climáticos do ecossistema.

3.4.1.2 Bactérias Heterotróficas (Totais)

Bactérias heterotróficas são aquelas que utilizam a matéria orgânica ou compostos orgânicos como fonte de carbono para seu crescimento e para a síntese de material celular. Na maioria dos casos, as bactérias heterotróficas são classificadas como quimiorganotróficas, ou seja, utilizam o carbono orgânico tanto como fonte de carbono como fonte de energia (LEDERBERG, 1992; TORTORA et al, 2002).

Segundo PELCZAR (1996), microrganismos heterotróficos são incapazes de utilizar o dióxido de carbono (CO₂) como única fonte de carbono, exigindo um ou mais compostos orgânicos.

CARACCILO et al (2001) estudaram potencial de degradação do herbicida terbutilazina (TBA) e demonstraram que os microrganismos no solo podem utilizá-lo como fonte de carbono e crescimento simplesmente através em que sua transformação com reações cometabólicas, onde os organismos degradam um composto químico sem crescimento.

Isso demonstra a importância destes microrganismos na mineralização da matéria orgânica no solo ou na água, sendo de grande importância sua monitoração em áreas de aplicação de efluentes como forma de tratamento.

O controle da população bacteriana total é de fundamental importância, visto que, uma densidade muito elevada destes microrganismos na água pode determinar a deterioração de sua qualidade, com o desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis, bem como a produção de limo ou películas.

Além desses problemas, podem representar risco à saúde dos consumidores, pois embora a maioria das bactérias da flora normal da água não seja considerada patogênica, algumas delas podem atuar como patógenos oportunistas causando doenças em pessoas com o sistema imunológico debilitado, como pacientes em recuperação.

Neste sentido, populações substanciais de bactérias em águas potáveis podem incluir gêneros tais como *Pseudomonas* e *Flavobacterium*, que podem constituir risco à saúde de pacientes debilitados. Outro aspecto importante é a influência inibidora exercida por alguns microrganismos, que em número elevado, podem impedir a detecção de coliformes.

Estudos comparativos demonstram que embora haja uma relação direta entre a frequência de detecção de coliformes e a densidade bacteriana até níveis de 500 UFC/ 100 mL, quando a população excede 1000 UFC/ 100 mL a frequência de detecção de coliformes decresce. Essa ação inibitória tem sido evidenciada em relação aos gêneros *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Bacillus*, *Actinomyces*, sarcinas e leveduras.

Em termos de aplicação, a determinação da densidade de bactérias heterotróficas em águas é um importante instrumento auxiliar no controle bacteriológico para:

- 1- Avaliação das condições higiênicas de poços, fontes, reservatórios, piscinas e sistemas de distribuição de água para consumo humano;

- 2- Avaliação da eficiência da remoção de bactérias nas etapas de operação de estação de tratamento de água;

3- Estimativa da biomassa de bactérias heterotróficas presentes em corpos d'água;

4- Determinação das possíveis causas de deterioração da qualidade da água (CETESB, 1986).

De acordo com os padrões de potabilidade da água para consumo humano estabelecidos pela portaria 1.469 (2000), o número de bactérias heterotróficas deve ser ≤ 500 UFC/mL.

Nos sistemas de tratamento biológico, o material orgânico presente na água residuária é convertido pela ação bioquímica de microrganismos, principalmente de bactérias heterotróficas (CAMPOS et al, 1999).

3.4.1.3 *Streptococcus faecalis* e *Enterococcus*

As bactérias do gênero *Streptococcus* são cocos Gram-positivos, geralmente ocorrendo aos pares ou em cadeias curtas e apresentam reação negativa na prova da catalase. Possuem capacidade de hidrolisar esculina e de crescerem à temperatura de 45 °C, na presença de sais biliares na concentração de 40%.

Provavelmente, são responsáveis por mais males e causam uma variedade de doenças maior que qualquer outro grupo bacteriano. Entre elas estão a febre escarlatina, faringites e pneumonia pneumocócica. O gênero *Enterococcus* compreende estreptococos que normalmente habitam o trato intestinal. As linhagens antibiótico-resistentes são freqüentes e estão se tornando uma causa grave de infecções nosocomiais (TORTORA et al, 2002).

Segundo WALLIS (2003), a contaminação por organismos do gênero *Enterococcus* em águas superficiais, pode ter origem no esgoto doméstico ou pelo escoamento superficial da água de chuva sobre áreas destinadas à pecuária. Através de testes fenotípicos foi determinada a origem da contaminação, onde a diversidade da população de microrganismos do gênero *Enterococcus* no esgoto doméstico, é maior do que nas fezes de gado bovino e ovino. Isto torna possível a

determinação da origem da contaminação baseada na diversidade de espécies desse gênero.

Níveis baixos de pH mostraram ter um efeito bactericida maior sobre os *Enterococos* em esgotos domésticos, sendo esse efeito potencializado pela ação da luz solar. Estes organismos sobreviveram em níveis de pH = 11, especialmente na ausência de luz (AWUAH et al, 2002).

Os *Enterococcus* são indicadores alternativos de contaminação fecal em águas e sua identificação e quantificação é normalmente feita através da técnica de tubos múltiplos.

3.4.1.4 Fungos totais

Ecologicamente os fungos têm duas vantagens principais sobre as bactérias, podendo crescer em ambientes com baixos valores de pH e umidade reduzida, portanto sem sua presença no processo de degradação da matéria orgânica, esta seria acumulada devido à interrupção do ciclo do carbono (METCALF & EDDY, 1991).

Uma grande quantidade de fungos habita o solo, ocorrendo uma maior quantidade próxima à superfície onde prevalecem condições de aerobiose. Algumas das espécies mais comuns no solo são *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*.

Os fungos são muito ativos na decomposição de compostos orgânicos complexos de tecidos de plantas como celulose, lignina e pectina. Além do mais, o micélio fúngico melhora a estrutura física do solo pelo aumento da estrutura desintegrada (PELCZAR, 1996).

A população de fungos no solo varia de 10^4 a 10^6 propágulos por grama deste solo. Os fungos são predominantes em solos ácidos (pH em torno de 5,6), podendo ser encontrados em solos com pH entre 2,0 a 9,0. A população fúngica do solo pode ser influenciada por fatores como matéria orgânica, pH, compostos inorgânicos, umidade, aeração, temperatura, perfil e estação do ano.

Os fungos podem viver em ambientes desidratados, e quando isso ocorre produzem esporos e entram em estado de vida latente, trabalhos revelaram que os fungos se desenvolvem bem próximo à capacidade de campo (SIVIERO, 1995).

3.4.1.5 Ovos de helmintos e cistos de protozoários

Os protozoários são organismos unicelulares, eucarióticos quimio – heterotróficos pertencentes ao Reino Protista. São habitantes naturais da água e do solo. No estágio vegetativo, ou trofozoíto, se alimentam de bactérias e pequenas partículas de nutrientes. Alguns fazem parte da microbiota normal dos animais. Das quase 20000 espécies de protozoários, relativamente poucas são causadoras de doenças.

Sob certas condições adversas, alguns protozoários produzem uma cápsula protetora chamada cisto. Um cisto permite que o animal sobreviva quando o alimento, umidade ou oxigênio estão faltando, quando a temperatura não é suportável, ou quando compostos químicos tóxicos estão presentes. Um cisto também permite que uma espécie parasita sobreviva fora do hospedeiro.

Helmintos são animais eucarióticos multicelulares que geralmente possuem sistemas digestivo, circulatório, excretor, nervoso e reprodutivo. Helmintos parasitas são altamente especializados para viver no interior de um hospedeiro. Seus ovos são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro promovendo a contaminação de outros por contato com esse material. Por exemplo, os ovos de *Ascaris lumbricóides*, que é um nematodo grande (30 cm de comprimento), podem sobreviver no solo por grandes períodos de tempo, máximo absoluto de 7 anos, antes de ser ingerido por outro hospedeiro (TORTORA et al, 2002).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que ovos de helmintos e cistos de protozoários, quando patogênicos, são os microrganismos que mais colocam em risco a saúde humana e de outros animais, devido aos seguintes fatores: ampla distribuição geográfica, alta frequência do parasitismo na população, sua baixa

dose infectante e o longo tempo de sobrevivência no meio externo (GODINHO, 2003).

Giardia intestinalis e *Cryptosporidium parvum* são parasitas comumente contraídos por veiculação hídrica, mas pouco é conhecido sobre seus ciclos de transmissão entre o homem e os animais. Estudos genotípicos realizados na Nova Zelândia, demonstraram que a sazonalidade exerce influência sobre a origem da contaminação humana por *Cryptosporidium parvum*, sendo de origem bovina na primavera e de origem humana no fim do verão, porém nada se concluiu sobre o ciclo da *Giardia intestinalis* (LEARMONTH et al, 2003).

Segundo VICTORIA (2003), os ovos de helmintos devem ser avaliados não apenas quantitativamente, mas sim pela análise de sua viabilidade.

Tabela 3.3 Sobrevivência de patógenos no solo

Organismo patogênico	Máximo absoluto	Máximo comum
Bactéria	1 ano	2 meses
Vírus	1 ano	3 meses
Cisto de protozoário	10 dias	2 dias
Ovo de helminto	7 anos	2 anos

(Modificado EPA 1992)

3.5 Parâmetros físico-químicos monitorados

Os parâmetros físico-químicos monitorados foram pH do solo no início e fim do experimento. Durante as todas as coletas de solo foram realizados ensaios para a determinação de sua umidade. Os testes de pH e condutividade elétrica da água foram realizados a partir da segunda safra, sendo que as análises abrangeram uma safra na estação seca e uma na estação chuvosa.

3.5.1 Umidade do solo

O fator determinante para a sobrevivência das bactérias no solo é a umidade, incluindo *E. coli* e *Salmonella typhosa*. A sobrevivência de bactérias no solo tem se mostrado maior durante estações chuvosas, em solos arenosos, onde a percolação da água é mais rápida devido à sua baixa capacidade de retenção de umidade, sendo o tempo de sobrevivência bacteriana menor, entre 3 a 7 dias, durante a estação seca. Por outro lado em solos com alta capacidade de retenção de água, como solos argilosos, a sobrevivência desses organismos pode ser superior a 42 dias (BITTON, 1987).

Os espaços inter e intra-agregados do solo são ocupados por água e ou gases, influenciando fortemente a atividade microbiana. O volume total ocupado por poros no solo é de 50 a 60 %, sendo 15 a 45 % ocupados por água, o restante é ocupado por gases, os mesmos encontrados na atmosfera (N_2 , O_2 , CO_2 , etc.), mais os decorrentes da atividade microbiana como CH_4 e o H_2S . A aeração mínima adequada para o solo deve ser de 10%, pois a maioria da microbiota do solo é aeróbia, mudanças de metabolismo aeróbio para anaeróbio ocorrem quando a concentração de oxigênio for inferior a 1 % (SIQUEIRA, 1994).

3.5.2 Potencial hidrogeniônico da água (pH)

O potencial hidrogeniônico, ou pH, representa a concentração de íons hidrogênio H^+ (em escala antilogarítmica), dando uma indicação sobre as condições de acidez, neutralidade e alcalinidade da água. A faixa de pH é de 0 a 14. Suas origens naturais são a dissolução de rochas, absorção de gases da atmosfera, oxidação da matéria orgânica e da fotossíntese. Despejos industriais e domésticos constituem suas origens antropogênicas (VON SPERLING. 1996).

Os microrganismos aquáticos geralmente crescem bem em uma faixa de pH de 6.5 a 8.5. Lagos e rios podem mostrar uma variação mais ampla de pH, dependendo das condições ambientais do local. Por exemplo, arqueobactérias

foram isoladas de lagos salgados da África, cujo pH é de 11,5. Outras espécies de arqueobactérias crescem em pH 1 ou menor (PELCZAR,1996).

Elevados níveis de pH contribuem significativamente para a remoção de coliformes fecais em lagoas de estabilização (AWUAH et al, 2002).

O *Thiobacillus ferrooxidans* é uma bactéria que cresce na presença de enxofre elementar produzindo ácido sulfúrico (H_2SO_4). Sua faixa para crescimento em um pH ótimo é de 1,0 a 3,5. (TORTORA et al, 2002).

3.5.3 Condutividade elétrica da água

Condutividade elétrica, k , é a medida da capacidade de uma solução aquosa conduzir corrente elétrica. Isso depende da presença de íons, suas concentrações, mobilidade e valência, bem como da temperatura durante sua análise. Soluções com altas concentrações de compostos orgânicos são relativamente melhores condutores. Por outro lado, moléculas orgânicas que não se dissociam em soluções aquosas são bem inferiores na condução de correntes elétricas (EATON, 1998). Como citado anteriormente, a presença de íons em meio líquido é um dos principais fatores que afetam o metabolismo microbiano.

4 Material e métodos

O experimento foi conduzido em três safras, duas em período de seca e outra no período das chuvas.

Na primeira safra foram aplicados no solo adubo e água tratada, e separadamente efluente de lagoa de estabilização anaeróbia, seguida por duas lagoas de maturação.

Durante a segunda safra que foi cultivada no período de chuvas também foi aplicado efluente da lagoa desinfectado pelo método de cloração, que foi monitorado da mesma forma que foi realizado durante a primeira safra, com a abertura de novos poços para coleta e análise da água subterrânea e a construção de novas parcelas de plantio de milho.

4.1 Área experimental

A área onde se desenvolveu o experimento desse projeto localiza-se no município de Limeira, o qual está situado a 154 km da capital, na região sudeste do estado de São Paulo, a 22°33'45" de latitude Sul e 44°24'09" de latitude Oeste. O Município ocupa a área de 597 km² e encontra-se a 567 m do nível do mar entre os rios Mogi Guaçu e Piracicaba, na bacia hidrográfica do rio Piracicaba e na sub-bacia do ribeirão Tatu, pertencendo ao sistema hidrográfico Tietê-Paraná.

O terreno utilizado para a realização do experimento, Figura 4.1, possui uma área de 7978,07 m², fazendo divisa com a Estação de Tratamento de Esgotos Graminha (ETE Graminha), operada pela empresa Águas de Limeira, situado no bairro Graminha.

No local já foram realizados ensaios para caracterização do solo, levantamento topográfico e determinação do sentido do fluxo do lençol freático. Na Figura 1 está mostrada a área experimental onde se realizaram os ensaios.



Figura 4.1 Área experimental na ETE - Graminha (LIMEIRA-SP).

Na Figura 4.2 estão apresentados os sulcos rasos, onde é aplicado o efluente. Entre estes sulcos, estão as linhas de plantio do milho.

Nestas linhas, chamadas linhas de plantio, é feito o plantio das sementes de milho, com espaçamento de 20 cm entre elas.

Os sulcos têm a profundidade de 15 cm, 50 cm de largura e 4 m de comprimento.



Figura 4.2 Parcela de irrigação com sulcos e milho (LIMEIRA-SP).

A construção da área experimental obedeceu a critérios de projeto como taxas de aplicação, monitoramento e operação.

As taxas de aplicação foram calculadas com base na caracterização do solo, para volumes de água suficientes para infiltrar no solo a profundidades de 0,20; 0,40 e 0,60 m, em parcelas destinadas a receber adubação e água, e efluente da lagoa anaeróbia.

Na segunda e terceira safras, mais três parcelas foram preparadas, uma para cada taxa de aplicação, que recebeu o efluente tratado por cloração.

Em relação ao presente projeto, o milho utilizado para o plantio referente às três safras foi a variedade AG-405, Agroceres, de crescimento rápido, com ciclo de 120 dias.

A Figura 4.3 representa a disposição das parcelas destinadas à aplicação de efluente no solo e dos poços de monitoramento.

Bloco 3

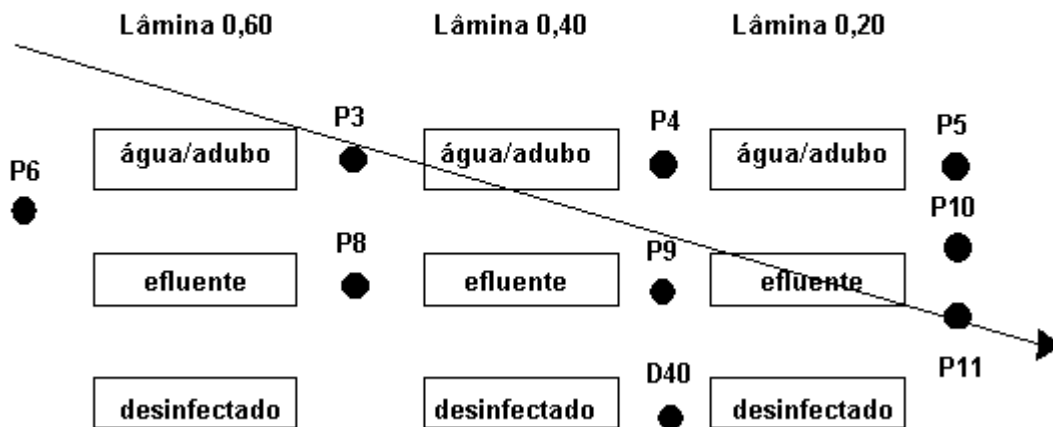


Figura 4.3 Disposição dos poços de monitoração e parcelas na área experimental, e sentido do fluxo da água subterrânea.

- Legenda:
- poços de monitoração das águas subterrâneas
 - parcelas de plantio de milho e aplicação do efluente
 - sentido do fluxo da água subterrânea

4.2 Poços de monitoração da água subterrânea

A monitoração da água subterrânea foi feita através de poços instalados no terreno, Figura 4.4, sendo três localizados no cenário água, três localizados no cenário efluente e um abaixo da parcela 0,40 m de efluente tratado com cloro, chamado de (D40).

O poço destinado ao controle ou testemunha (P6), localizado fora da área de plantio, considerando-se o sentido do fluxo do lençol freático.

As coletas foram realizadas no período de um ano, com início no mês de junho e final no mês de julho do ano seguinte.

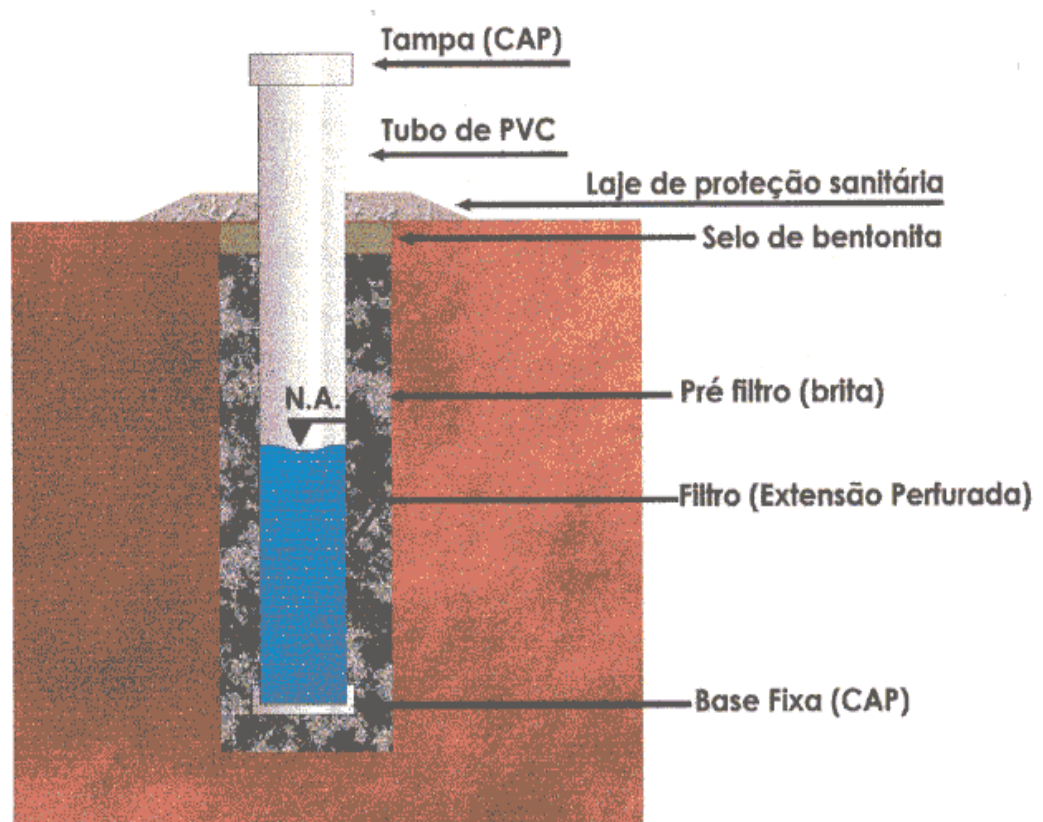


Figura 4.4 Poço de monitoração (CETESB).

4.3 Coletas e preparo das amostras de solo

As coletas das amostras de solo foram realizadas na área superficial, através de amostras compostas de cinco pontos, coletadas a 15 cm de profundidade, de dentro de um dos sulcos de cada parcela. Concomitantemente com as coletas de água dos poços de monitoração.

As amostras de solo foram retiradas com auxílio de um trado, que foi desinfectado no campo com álcool 70% e água destilada, e armazenadas em sacos plásticos esterilizados, apropriados para coleta de solo. Posteriormente, em laboratório, essas amostras foram dispostas em bandejas de polipropileno devidamente esterilizadas e os solos cuidadosamente homogeneizados com espátula esterilizada, e dispostas para a secagem em capela de fluxo laminar (SIVIERO,1995). Das porções de solo de cada parcela foram retiradas 10 g para teste de umidade e 10 g para as análises microbiológicas.

As coletas de solo ocorrerão de acordo com a aplicação do efluente, sendo intercaladas por coletas de água dos poços de monitoração.

4.4 Coleta das amostras de água subterrânea

De acordo com ABNT NBR 13895 (1997) a água estagnada no poço não pode ser representativa da qualidade da água do local sendo necessário o esgotamento total dos poços de tal forma que a água da formação substitua a água estagnada.

Os esgotamentos dos poços foram realizados dois dias antes da coleta da água, preferencialmente no dia da aplicação do efluente.

Os poços foram esgotados com o auxílio de bomba a vácuo conectada a tubos de plástico cristal. A coleta se deu através do mesmo sistema de bomba a vácuo, sendo o tubo conectado ao frasco de coleta e seqüencialmente ligado a um Kitassato de segurança para evitar a entrada de água na bomba, Figura 4.5.

Este sistema de coleta é eficiente, porém as precipitações da estação chuvosa tornam-se um fator limitante ao uso do sistema devido ao uso de energia elétrica, havendo risco de choques nos operadores e danos ao material.

Um sistema manual de coleta e esgotamento dos poços se fez necessário devido às constantes chuvas ocorridas no período das coletas, o que poderia ter causado danos ao equipamento elétrico, bem como provocar acidentes com os operadores.

A alternativa encontrada foi o uso de coletores manuais chamados bailers, que são cilindros de polipropileno com capacidade de 1,1 L, introduzidos nos poços com o auxílio de cordas e retirados com esse volume de água. Estes coletores são esterilizados com água sanitária a 10%, e seu resíduo é retirado através da lavagem com água destilada. Esse sistema mostrou ser uma ótima alternativa de coleta, devido às intensas chuvas durante a segunda safra, na estação chuvosa.

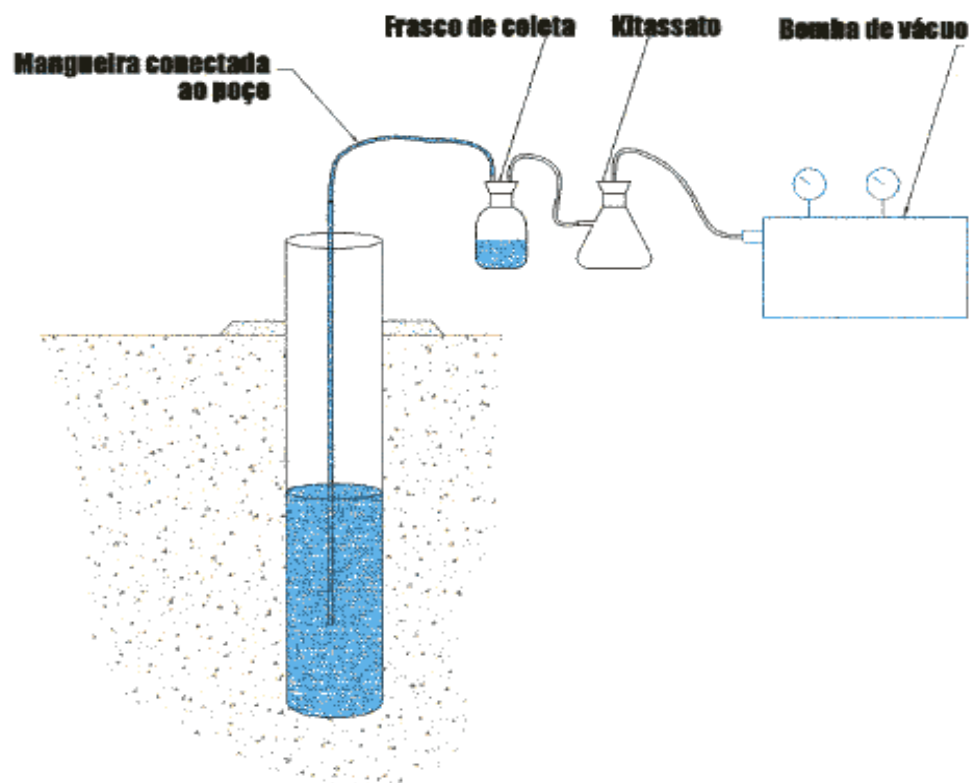


Figura 4.5 Sistema de coleta da água subterrânea (VENDEMIATTI, 2003).

4.5 Metodologias utilizadas nas análises físico-químicas da água subterrânea e do solo

4.5.1 Determinação de umidade do solo

Para a determinação da umidade do solo, utiliza-se o método gravimétrico de VIEIRA, 1983, citado por SIVIERO (1995). Após a coleta das amostras, estas foram homogeneizadas e 10 g de cada amostra foram pesadas em recipientes de cerâmica, previamente tarados. As amostras foram submetidas à secagem a temperatura de 105 - 110 ° C até que sua massa seja constante, e temperatura estabilizada em dessecador de vidro contendo sílica e, então pesadas novamente em balança analítica e em seguida são efetuados os cálculos com o uso da equação abaixo:

$$\text{Cálculo da umidade : } Ua = \frac{Pu - Ps}{Ps} \times 100$$

Onde:

Ua = umidade total do solo, em porcentagem em relação ao peso seco.

Pu = massa em gramas da amostra de solo úmido.

Pu = P'u - T.

P'u = massa em gramas do solo úmido mais recipiente.

T = massa em gramas do recipiente.

Ps = massa em gramas da amostra de solo seco.

Ps = P's - T.

P's = massa em gramas do solo seco mais recipiente.

4.5.2 Determinação do pH da água subterrânea

A leitura do pH das amostras é realizada de forma direta e o mais rapidamente possível após a coleta, com o uso de pHmetro Orion. A metodologia para a determinação do pH das amostras de água subterrânea está descrita em EATON et al (1998), método eletrométrico 4500-H⁺ B.

4.5.3 Determinação da condutividade elétrica da água subterrânea

A determinação da condutividade elétrica também é realizada de forma direta, com o uso de condutímetro.

A metodologia para a determinação da condutividade elétrica das amostras de água subterrânea está descrita em EATON et al (1998), método eletrométrico, 2510.

4.6 Metodologias para as análises microbiológicas das amostras de água

Seguem descritos os procedimentos adotados nas análises microbiológicas das amostras coletadas dos poços de monitoramento.

4.6.1 Metodologia para a determinação de Coliformes totais e *Escherichia coli* pelo método do substrato definido Colilert® utilizando cartelas Quanty - Tray®.

1. Inicialmente, limpar a bancada com álcool a 70%;
2. Homogeneizar a amostra 25 vezes, formando um ângulo de 45° entre o braço e o antebraço, vagarosamente;

3. Adicionar o meio de cultura em 100 mL de amostra, ou em porção diluída e agitar cuidadosamente até sua total dissolução;

4. Despejar o conteúdo da amostra na cartela Quanty -Tray®;

5. Selar a cartela e levar para a estufa de incubação por 24 h a 35 °C;

6. A coloração amarela intensa indica a presença de coliformes totais. O resultado é obtido através da contagem dos quadrados grandes e pequenos positivos na cartela, através do cruzamento destes dados a leitura é feita na tabela IDEXX. Nos quadrados, ou células, que não apresentarem coloração amarela serão considerados negativos para a presença de coliformes totais. O mesmo se extrapola para a amostra no caso da respectiva cartela não apresentar nenhuma célula amarela. O resultado é expresso em número mais provável por 100 mL de amostra (NMP/100 mL).

7. A leitura do NMP para *E. coli* será feita através do uso de lâmpada ultravioleta (UV) long wave, de 365 nm e 6 Watt. Quantificar as células grandes e pequenas com coloração azul fluorescente e utilizar a tabela IDEXX para o NMP/100 mL.

4.6.2 Técnica de contagem de microrganismos em placas “Pour plate”

Esta técnica consiste da inoculação de 1mL da amostra na diluição desejada, seguida da aplicação do meio de cultura específico. Ela será utilizada nas análises de quantificação das bactérias heterotróficas do solo e da água subterrânea, com o uso do meio de cultura Plate count Agar (PCA) bem como na quantificação de bolores totais do solo, utilizando-se o meio de cultura Sabouraud dextrose agar.

Seu procedimento é o seguinte:

1. Desinfetar a capela de fluxo laminar com álcool 70 % antes do início dos procedimentos.

2. Preparar as placas de Petri em duplicata, já esterilizadas em autoclave a 121° C por 15 minutos, em seguida, proceder a identificação das mesmas na tampa da placa de acordo com o tipo de amostra, origem, diluição e data.

3. Homogeneizar a diluição da amostra a ser utilizada, no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco num ângulo de 45 ° entre o braço e o antebraço.

4. Com uma pipeta estéril de 1 mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir volumes de 1 mL da diluição da amostra desejada para as placas de Petri correspondentes.

5. Após a inoculação e em um período inferior a 20 minutos, entreabrir cada placa e acrescentar 10 a 12 mL do meio de cultura específico fundido e mantido em banho-maria para a estabilização da temperatura em 45 ± 1 ° C, tendo o cuidado de flambar a boca do frasco do meio de cultura antes de vertê-lo na placa.

6. Homogeneizar o inóculo e o meio de cultura contidos na placa com movimentos circulares em forma de oito (8), por dez vezes consecutivas, de maneira suave para evitar a projeção do meio de cultura com o inóculo contra as paredes ou a tampa da placa.

7. Deixar o meio de cultura solidificar e levar as placas para a incubadora por 24 h a 35°C para as bactérias heterotróficas e por no mínimo 72 h a 25 – 28°C para os fungos.

4.6.3 Metodologia para identificação e quantificação de *Streptococcus faecalis* ou Enterococos

A técnica utilizada para a identificação e quantificação de *S. faecalis* é a de tubos múltiplos, dividida em testes presuntivo e confirmativo.

No teste presuntivo as amostras são inoculadas em séries repetidas de cinco tubos de ensaio, a primeira série contém 10 mL de meio de cultura caldo azida dextrose em concentração dupla, que recebe 10 mL de amostra sem diluição. A segunda série de cinco tubos contém 9 mL do mesmo meio de cultura em concentração simples, com metade da concentração da primeira série. Seguem-se

então repetições iguais de cinco tubos em concentração simples, tantas quantas forem as diluições necessárias utilizando-se somente decimais múltiplos de 1 mL. Então os tubos inoculados são incubados a $35 \pm 0,5$ ° C. Após 24 ± 2 h os tubos são examinados quanto a turbidez, o que determina o resultado positivo.

No teste confirmativo os tubos que apresentaram turbidez, após 24 - 48 h, são submetidos à repicagem em câmara de fluxo laminar asséptica, com o auxílio do bico de Bunsen, dessas amostras positivas em placas contendo meio de cultura Bile Esculina Azida Agar sólido. Estas placas são incubadas a $35 \pm 0,5$ ° C. Após 24 ± 2 h. Colônias marrons escuras confirmam a presença de *S. faecalis*, como descrito em EATON et al (1998, 9230 B).

4.6.4 Metodologia para a determinação de ovos de helmintos e cistos de protozoários ou Método de Hoffman, Pons & Janner ou Lutz

Esta metodologia consiste no isolamento e quantificação de ovos de helmintos e cistos de protozoários, e o procedimento consiste em:

1. Deixar o frasco de coleta em repouso por 24 horas;
2. Eliminar o sobrenadante deixando aproximadamente 70 mL de amostra no frasco;
3. Distribuir 50 mL do restante da amostra em tubos de centrifuga;
4. Centrifugar a 2500 rpm (rotações por minuto) durante 5 minutos;
5. Coletar com pipeta estéril, 1 mL do fundo do tubo centrifugado e passar para a câmara de Sedgwick-Rafter SR-1;
6. Acrescentar uma gota de lugol;
7. Realizar a contagem e identificação com o uso de microscópio óptico no aumento de 100 x (PESSOA, 1992).

4.7 Diluições das amostras para ensaios microbiológicos

1. A diluição deve ser feita quando a densidade microbiana na amostra for muito elevada, trazendo assim a mesma para um nível adequado às análises laboratoriais. A seguir a descrição do processo:

2. Homogeneizar a amostra (como em 6.4.1.4) e com pipeta estéril de 10mL e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10 mL da amostra para um frasco previamente identificado, contendo 90 ± 2 mL de água de diluição estéril. Estará preparada assim a primeira diluição decimal (10^{-1}), sendo que 1 mL da mesma corresponde ao volume de 0,1 mL da amostra.

3. Repetir a operação segundo o item anterior, com o frasco contendo a diluição feita anteriormente (10^{-1}) e desta, com uma nova pipeta estéril de 10 mL, transferir 10 mL para um novo frasco contendo 90 ± 2 mL de água de diluição estéril. Preparando-se assim a segunda diluição decimal (10^{-2}), sendo que 1 mL da mesma corresponde ao volume de 0,01 mL da amostra original.

4. Proceder da mesma maneira na seqüência das diluições desejadas.

Tabela 4.1 Metodologias utilizadas nas análises laboratoriais

Análise	Referência	Metodologia
Umidade do solo	VIEIRA 1983)	Método gravimétrico
pH	EATON(1998)	Método eletrométrico, 4500-H+
Condutividade elétrica	EATON1998)	Método eletrométrico, 2510
Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	EATON(1998)	Método cromogênico, cartela Quanty-Tray, 9223 B
Bactérias heterotróficas	CETESB L5.201 (1986)	Técnica pour plate
<i>Sterptococcus faecalis</i>	EATON(1998)	Técnica de tubos múltiplos, 9230 B
Fungos totais	CETESB L5.201 (1986)	Técnica pour plate
Ovos de helmintos e cistos de protozoários	PESSOA (1982)	Método de Hoffman, Pons, Janner e cols.

5 Resultados e discussão

Os resultados apresentados correspondem ao período de coletas realizadas a partir de junho a julho do ano seguinte. O presente trabalho foi realizado através da análise de amostras da água subterrânea e do solo da área experimental durante três safras de milho, cada uma abrangendo um período de 120 dias. Duas delas durante a estação seca e uma durante a estação chuvosa. Também foi considerado o índice pluviométrico durante as três safras.

A avaliação da influência das aplicações do efluente da lagoa anaeróbia, água e efluente desinfectado sobre a água subterrânea e o solo, com relação a alguns parâmetros físico-químicos e principalmente microbiológicos, foi aplicado um tratamento estatístico nos dados utilizando-se o método da comparação de médias de duas amostras (MILLER, 1993). Foi avaliada a comparação do poço 6 (P6), controle, de forma que este fosse comparado com todos os demais poços da área experimental (Figura 4.3)

O poço (D40) referente à aplicação de efluente desinfectado por cloração, Anexo A2, em parcela de 0,40 m recebeu o mesmo tratamento estatístico dado ao poço controle (P6).

Comparações em paralelo de acordo com as taxas de aplicação e o tipo de tratamento também foram feitas, ocorrendo entre os poços de cenários diferentes instalados em paralelo, correspondendo da seguinte forma: Poço 3 e Poço 8; Poço 4, Poço 9 e Poço D40; Poço 5, Poço 10 e Poço 11. De acordo com a disponibilidade de água no poço para a coleta, visto que por diversas vezes os poços não apresentaram volumes de água suficientes para a amostragem.

Na avaliação dos dados coletados com relação ao solo, estes receberam o mesmo tratamento estatístico acima citado, comparando-se cada parcela de cada tipo de tratamento, ou cenário, com sua respectiva em paralelo (Figura 4.3), como foi feito com os poços: Parcela 0,60 m de água (A6), Parcela 0,60 de efluente da lagoa sem desinfecção (E6) e Parcela de efluente desinfectado 0,60 m (D6), repetindo-se a comparação nas taxas de aplicação de 0,40 m e 0,20 m.

5.1 Efluente aplicado

O efluente da lagoa de estabilização anaeróbia foi também caracterizado com relação aos parâmetros físico-químicos e principalmente microbiológicos.

Na tabela 5.1 são apresentados os valores médios das 10 amostras coletadas.

Tabela 5.1 Características físico-químicas e microbiológicas biológicas analisadas do efluente aplicado.

PARÂMETROS	RESULTADOS
<i>Escherichia coli</i> (NMP/ 100mL)	2,87 x 10 ⁷
<i>Streptococcus faecalis</i> (NMP/ 100mL)	2,93 x 10 ⁶
Coliformes totais (NMP/ 100mL)	1,32 x 10 ⁸
Bactérias heterotróficas (UFC/ mL)	3,15 x 10 ⁶
Ovos de helmintos e cistos de protozoários (ovo ou cisto/mL)	4,4
pH	6,79
Condutividade elétrica (µS/cm)	5812,6

Obs: Média geométrica.

5.2 Poços de monitoração

Os resultados estão apresentados por parâmetros analisados, divididos em poços de monitoração localizados nas parcelas de aplicação água, efluente e efluente desinfectado.

O poço de controle (P6), está localizado fora da área de aplicação, contra o fluxo da água subterrânea, como mostra a Figura 4.3. Portanto, não sofrendo influência das aplicações de efluente.

Os dados obtidos com relação à água subterrânea foram comparados com a legislação vigente para água de consumo humano, Portaria 1.469 (2000) do Ministério da Saúde, considerando-se que em áreas rurais é comum o uso de poços para o abastecimento da comunidade local. Portanto, se esse sistema for aplicado em áreas de plantio de milho, deve-se assegurar a qualidade da água coletada de poços para o consumo humano.

Durante o desenvolvimento do trabalho, algumas coletas não foram efetuadas, como nos poços P5, P10 e P11, devido à ausência de água nos mesmos ou assoreamento parcial no decorrer da pesquisa.

Os valores máximos permitidos para água de consumo humano para os parâmetros avaliados nesta pesquisa, segundo a Portaria 518 (2004), estão na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Alguns padrões de potabilidade para a água de consumo humano da Portaria 1.469 (2000).

PARÂMETROS	PORTARIA 1.469 (2000)
<i>Escherichia coli</i> (NMP/ 100mL)	Ausente em 100 mL
<i>Streptococcus faecalis</i> (NMP/ 100mL)	Não reportado
Coliformes totais (NMP/ 100mL)	Ausente em 100 mL
Bactérias heterotróficas (UFC/ mL)	< 500 UFC/mL
Ovos de helmintos e cistos de protozoários (ovo ou cisto/mL)	
pH	6,0 a 9,5
Condutividade elétrica $\mu\text{S/cm}$	Não reportado

5.2.1 pH

O Poço controle (P6) manteve o pH entre 4,47 e 4,9 durante o período analisado. Nos poços referentes às parcelas de aplicação de água, o pH das amostras variou entre 4,2 e 5,1. Nos poços das parcelas de aplicação de efluente, a variação foi de 4,3 a 5,0. O poço referente à aplicação de efluente desinfectado (D40) apresentou variação entre 4,0 e 5,4.

Os resultados das análises estatísticas da comparação de médias dos valores de pH, entre os três tipos de aplicação, estão alocados na Tabela 5.3. Houve diferença significativa entre dos dados totais entre P5 (água) e P10 (efluente).

Os valores obtidos para o parâmetro pH estão alocados no Anexo A19.

As análises comparativas entre P6 (controle) e os demais poços não apresentaram diferenças significativas entre os poços em nenhuma das duas estações e nem no total das amostras, como mostra a Tabela 5.4.

O mesmo ocorreu na comparação entre o poço referente à aplicação de efluente desinfectado (D40) e os demais poços, Tabela 5.5.

Baseado na Portaria 1.469 (2000), o valor de pH para a água para consumo humano é de 6,0 a 9,5 (Tabela 5,2). Em nenhuma amostra coletada da água subterrânea o pH chegou a 6,0, ficando entre 4,3 e 5,44. Isso pode estar correlacionado com o baixo pH do solo analisado, que esteve na faixa de 4,5 a 6,0.

A Figura 5.1 mostra os valores de pH encontrados nos poços, comparados com o poço 6, controle.

Portanto a água está fora do padrão de potabilidade para consumo humano para o parâmetro pH.

Tabela 5.3 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro pH.

pH					
Período	P3-P8		P4-P9		P5-P10
Total	N		N		D
Seca	N		N		N
Chuva	N		N		N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com P = 0,05

D: os resultados diferem com nível de significância com P = 0,05

Tabela 5.4 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço P6 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro pH.

pH						
	P6-P3	P6-P4	P6-P5	P6-P8	P6-P9	P6-P10
Total	N	N	N	N	N	N
Seca	N	N	N	N	N	N
Chuva	N	N	N	N	N	N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com $P = 0,05$

D: os resultados diferem com nível de significância com $P = 0,05$

Tabela 5.5 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço D40 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro pH.

pH						
	D40-P3	D40-P4	D40-P5	D40-P8	D40-P9	D40-P10
Total	N	N	N	N	N	N
Seca	N	N	N	N	N	N
Chuva	N	N	N	N	N	N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com $P = 0,05$

D: os resultados diferem com nível de significância com $P = 0,05$

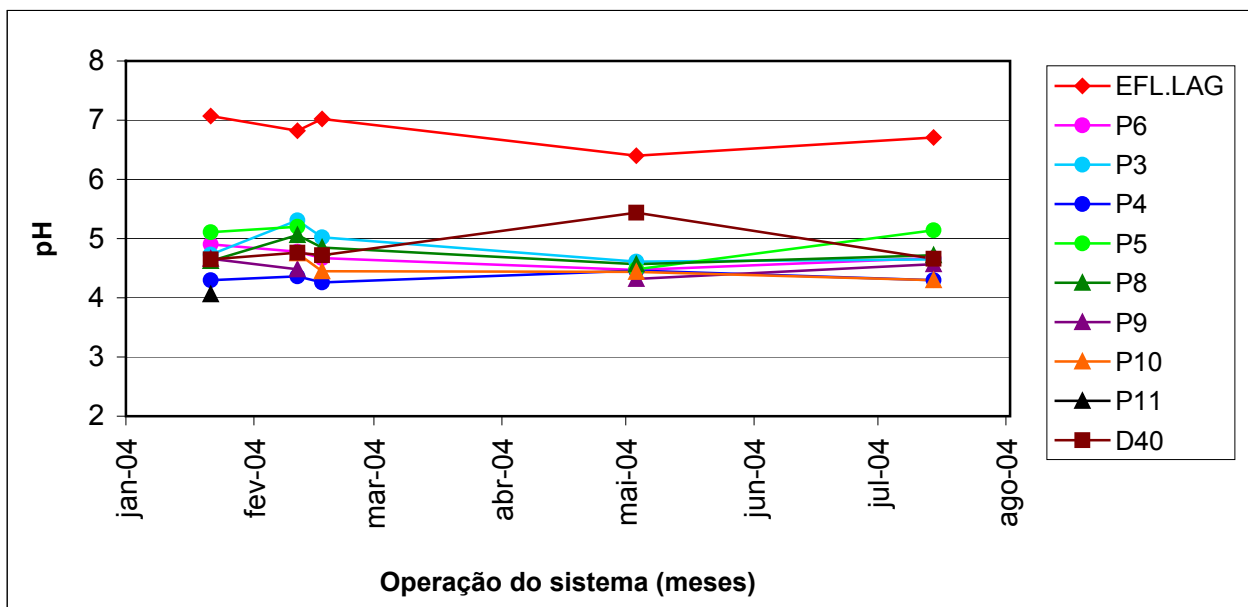


Figura 5.1 Valores de pH nos poços comparados ao Poço P6

5.2.2 Condutividade elétrica

Os resultados obtidos para a condutividade elétrica da água subterrânea estão alocados no Anexo A18. A média dos valores encontrados para o Poço controle (P6), 46 $\mu\text{S}/\text{cm}$, mais baixa do que a dos poços das parcelas do cenário água, 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

A média das parcelas dos cenários efluente e efluente desinfectado também foi maior, quando comparada com o poço controle, sendo estes valores de 93 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e 75 $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectivamente.

O acúmulo de sais no solo e conseqüentemente na água subterrânea, pode ser responsável por essa diferença com relação ao poço controle e os demais poços. Isso pode ter ocorrido porque as análises de condutividade elétrica foram realizadas nas últimas duas safras, após quatro safras consecutivas, onde ocorreu a aplicação de efluente no solo.

Essa diferença mostrada no gráfico (Figura 5.2), não se mostrou significativa quando submetida à avaliação estatística.

A comparação dos resultados dos poços referentes às parcelas dos três cenários, não se mostrou significativa para $P = 0,05$. Isso também foi observado nas comparações entre P6 (controle) e os demais poços, bem como na comparação do Poço D40 (desinfectado) com os demais poços (Tabelas 5.6 a 5.8).

A Portaria 1.469 não reporta valor padrão de condutividade elétrica da água para consumo humano.

Tabela 5.6 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro condutividade elétrica.

CONDUTIVIDADE ELÉTRICA mS/cm

	P3-P8	P4-P9	P5-P10
Total	N	N	N
Chuva	N	N	N
Seca	N	N	N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com $P = 0,05$

D: os resultados diferem com nível de significância com $P = 0,05$

Tabela 5.7 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço P6 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro condutividade elétrica.

CONDUTIVIDADE ELÉTRICA mS/cm

	P6-P3	P6-P4	P6-P5	P6-P8	P6-P9	P6-P10
Total	N	N	N	N	N	N
Chuva	N	N	N	N	N	N
Seca	N	N	N	N	N	N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com $P = 0,05$

D: os resultados diferem com nível de significância com $P = 0,05$

Tabela 5.8 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço D40 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro condutividade elétrica.

CONDUTIVIDADE ELÉTRICA mS/cm

	D40-P3	D40-P4	D40-P5	D40-P8	D40-P9	D40-P10
Total	N	N	N	N	N	N
Seca	N	N	N	N	N	N
Chuva	N	N	N	N	N	N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com $P = 0,05$

D: os resultados diferem com nível de significância com $P = 0,05$

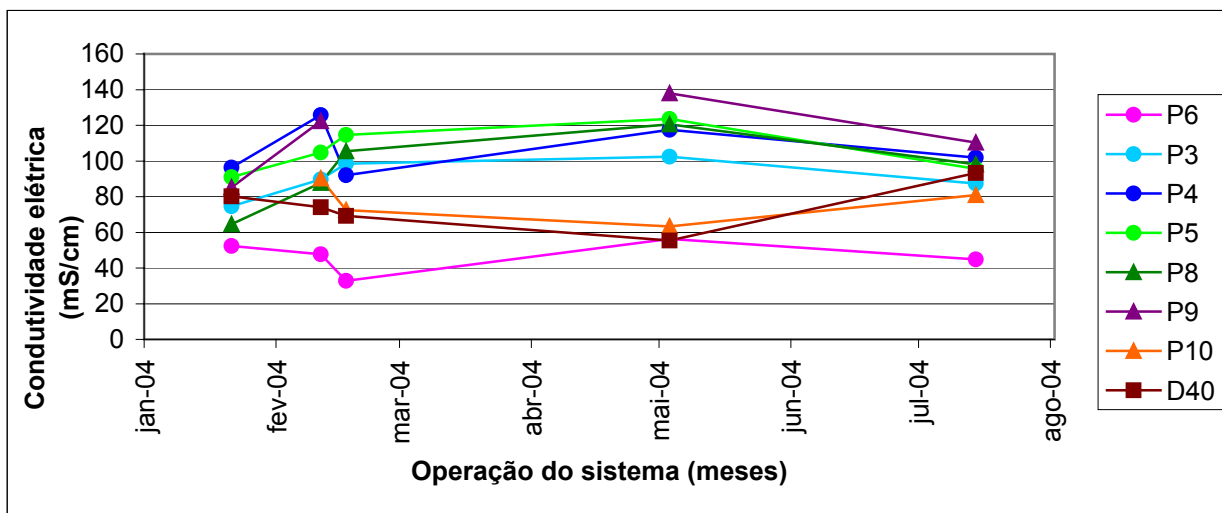


Figura 5.2 Valores de condutividade elétrica nos poços comparados ao Poço P6.

5.2.3 Bactérias heterotróficas

Os valores de bactérias heterotróficas da água subterrânea e no efluente da lagoa anaeróbia estão alocados no Anexo A12.

Os resultados mostraram que ocorreram valores superiores a 500 UFC/mL em amostras de todos os poços.

Apesar de não apresentar diferença significativa nas análises estatísticas, a média do cenário água, 413 UFC/mL, foi menor que a média do cenário efluente, 510 UFC/mL. Isso pode ser um indício de que a aplicação de efluente no solo proporcionou um aumento na concentração destes microrganismos na água subterrânea, devido ao aumento nas concentrações de matéria orgânica e nutrientes.

A comunidade de bactérias heterotróficas presentes no efluente pode não ser a responsável direta pelo aumento destes organismos na água subterrânea, isto porque a introdução de microrganismos alóctones em ambiente onde há uma comunidade microbiana autóctone, normalmente resulta na eliminação dos microrganismos introduzidos (ALEXANDER, 1977).

As amostras coletadas do poço referente ao efluente desinfectado, (D40), apresentaram a menor média, 273 UFC/mL. Entretanto, na última análise realizada, o resultado foi da ordem de 10^3 .

A análise estatística dos resultados não apresentou diferenças significativas para $P = 0,05$ em nenhuma das comparações realizadas com relação aos três cenários, como mostram as Tabelas 5.9 e 5.10.

Nas Figuras 5.3, 5.4 e 5.5 estão alocados os valores de UFC/mL de bactérias heterotróficas ao longo do período analisado.

A Portaria 1.469 (2000) recomenda que o número de bactérias heterotróficas na água para consumo humano não ultrapasse 500 UFC/mL.

Apesar das bactérias heterotróficas não serem indicadoras de contaminação fecal, elas podem produzir odores e gosto na água, além de algumas espécies agirem como patógenos oportunistas em indivíduos com sistema imunológico debilitado (CETESB, 1986).

Baseado nestes dados, o uso da água subterrânea nas condições apresentadas no presente trabalho não é recomendável sem prévia desinfecção.

Tabela 5.9 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro bactérias heterotróficas.

BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS DA ÁGUA UFC/mL							
	P3-P8		P4-P9		P5-P10		P5-P11
Total	N		N		N		N
Seca	N		N		N		N
Chuva	N		N		N		

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com $P = 0,05$

D: os resultados diferem com nível de significância com $P = 0,05$

Tabela 5.10 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço P6 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro bactérias heterotróficas.

BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS DA ÁGUA UFC/mL

	P6-P3	P6-P4	P6-P5	P6-P8	P6-P9	P6-P10
Total	N	N	N	N	N	N
Seca	N	N	N	N	N	N
Chuva	N	N	N	N	N	N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com P = 0,05

D: os resultados diferem com nível de significância com P = 0,05

Tabela 5.11 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço D40 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro bactérias heterotróficas.

BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS DA ÁGUA- UFC/mL

	D40-P3	D40-P4	D40-P5	D40-P8	D40-P9	D40-P10
Total	N	N	N	N	N	N
Seca	N	D	D	N	D	N
Chuva	N	N	N	N	N	N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com P = 0,05

D: os resultados diferem com nível de significância com P = 0,05

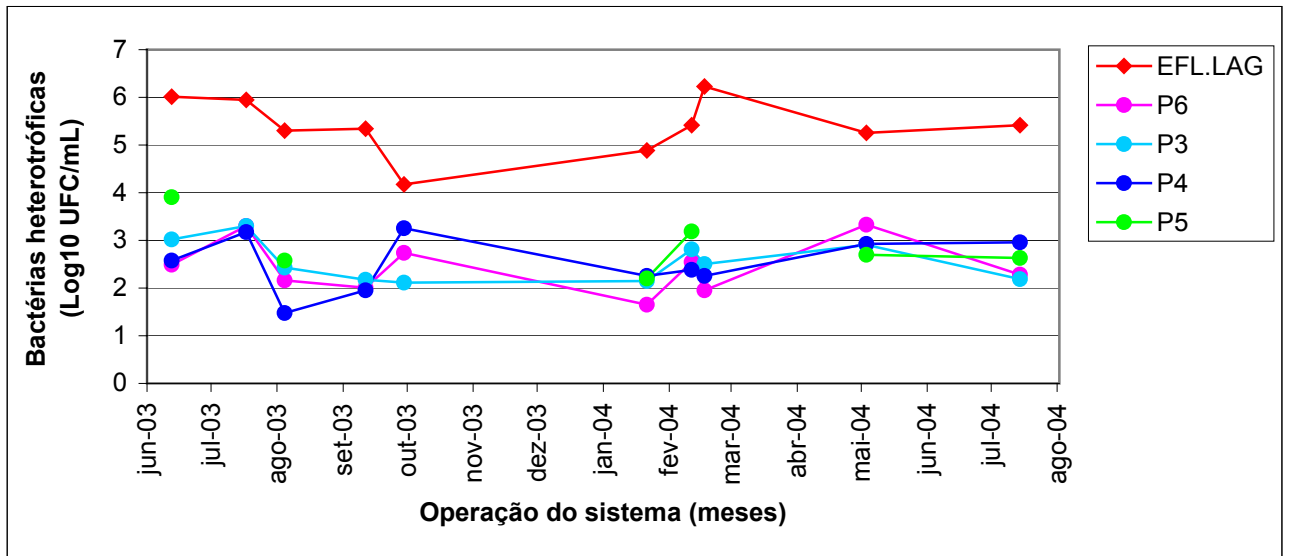


Figura 5.3 Valores de bactérias heterotróficas de P6 comparados com os poços do cenário água.

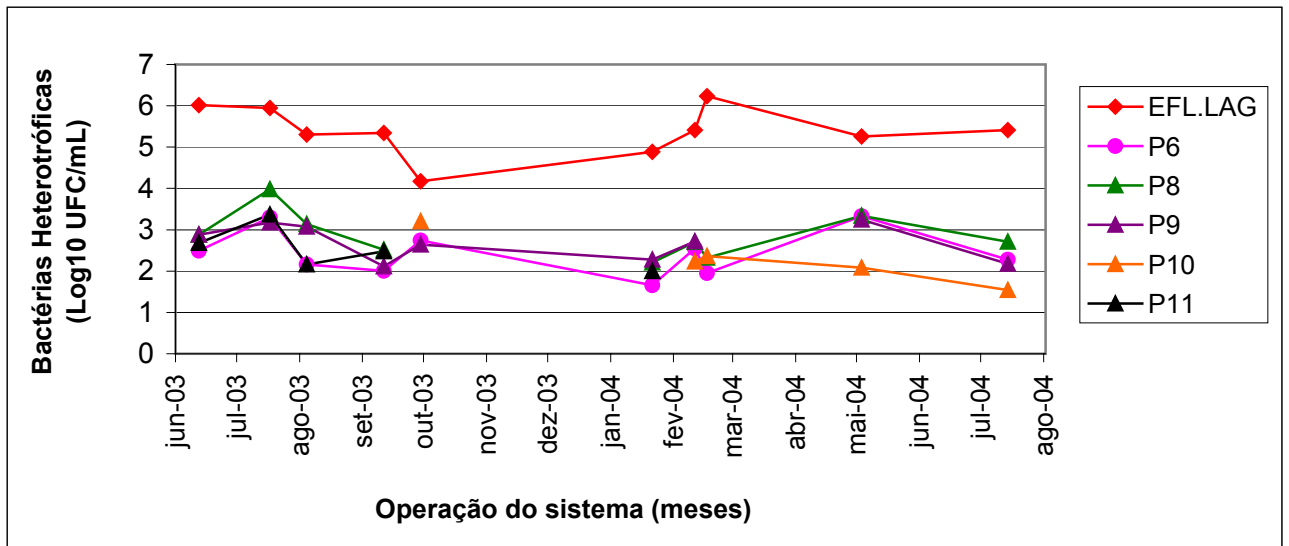


Figura. 5.4 Valores de bactérias heterotróficas de P6 comparados com os poços do cenário efluente.

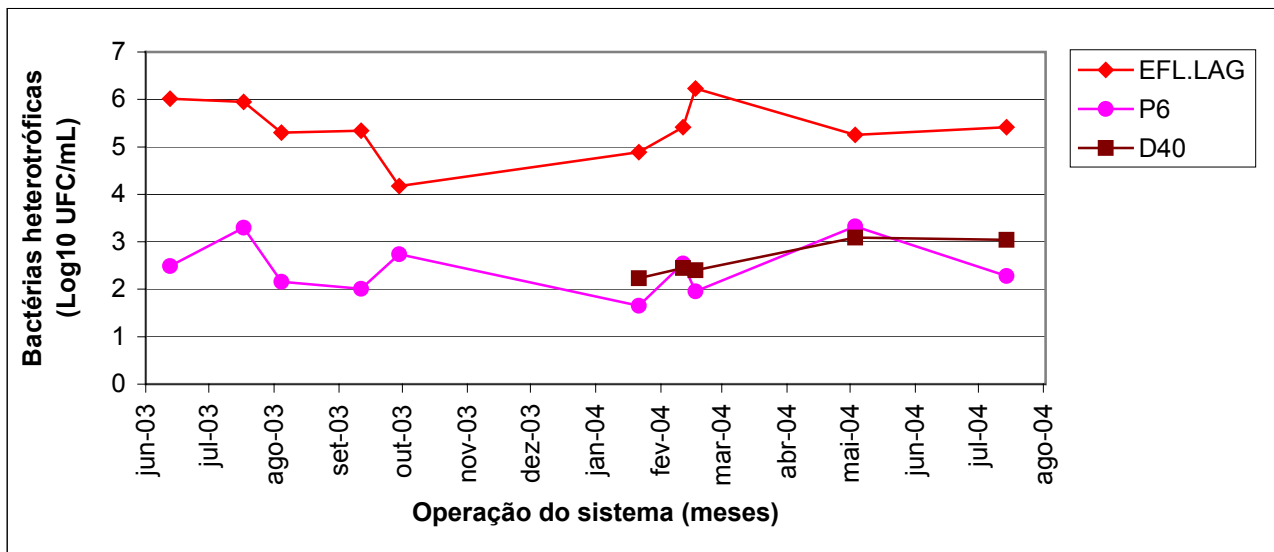


Figura 5.5 Comparação dos valores de bactérias heterotróficas entre P6 e D40.

5.2.4 *Streptococcus faecalis* (Enterococos)

Para a determinação de Enterococos, foram colhidas amostras dos poços P5 para o cenário água, P10 para o cenário efluente e D40 para o cenário desinfetado, além do poço P6 (controle).

Os poços P5 e P10 localizam-se no final da área experimental, onde apesar de serem ambos referentes às menores taxas de aplicação de efluente (0,20 m), o fluxo da água subterrânea segue em direção a eles.

A presença de Enterococos foi detectada em todos os poços em algumas amostras. Os valores referentes estão alocados no Anexo A 16.

O poço P6 apresentou contaminação em três das dez amostras coletadas, porém em valores considerados baixos, visto que não há referência na legislação sobre limites para Enterococos.

O poço P5 apresentou contaminação freqüente por Enterococos, sendo que a última amostra coletada apresentou um valor da ordem de 10^3 . Isso pode ser

relacionado à localização do poço, que recebe o fluxo da água subterrânea associado ao maior tempo de vida dos Enterococos no solo quando comparados à *E.coli* (SANCHEZ, 1999).

O teste estatístico de comparação de médias entre todos os quatro poços entre si, mostrou diferença significativa entre os poços P5 e P10 para o período chuvoso, isso pode ter ocorrido devido ao arraste destes microrganismos pela água das chuvas freqüentes, associada às aplicações de efluente no solo.

O maior tempo de vida dos Enterococos no solo, pode ter favorecido um acúmulo destes microrganismos na área onde se localiza o poço P5, que além de estar no final da área experimental e recebendo o fluxo da água subterrânea, fica entre duas parcelas de aplicação de efluente.

Apesar de não ser um indicador de contaminação fecal presente na legislação, os Enterococos são bons indicadores alternativos, pois são habitantes comuns do trato intestinal de humanos e animais (TORTORA et al, 2003) e não ocorrem em áreas não poluídas (SANCHEZ, 1999).

Os valores obtidos indicam que a água não é indicada para consumo humano sem desinfecção prévia.

Tabela 5.12 Comparação entre os poços para o parâmetro Enterococos

***Streptococcus faecalis*(ENTEROCOCOS) - NMP/100 mL**

	P6-P5	P6-P10	P6-D40	P5-P10	P5-D40	P10-D40
Total	N	N	N	N	N	N
Seca	N	N	N	N	N	N
Chuva	N	N	N	D	N	N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com P = 0,05

D: os resultados diferem com nível de significância com P = 0,05

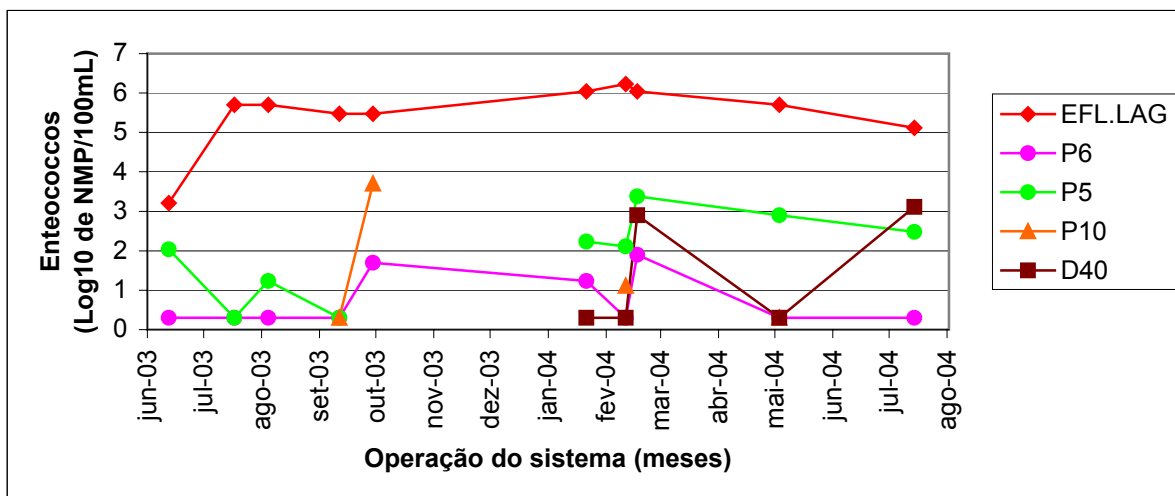


Figura 5.6 Comparação dos valores de Enterococos entre os poços dos cenários água, efluente e efluente desinfetado.

5.2.5 Coliformes totais

A contaminação por coliformes totais ocorreu em amostras de todos os poços de monitoração durante o período analisado, tendo ocorrido também no poço de controle (P6), como é mostrado no Anexo A11.

Os coliformes totais são um grupo de microrganismos que inclui gêneros diferentes. Dentro deste grupo estão os gêneros como *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, comuns em solos e plantas, não sendo de origem exclusivamente fecal, sendo que a sua sobrevivência em poços está relacionada com fatores ambientais (BITTON e GERBA, 1984).

Os valores estão representados nas Figuras 5.7, 5.8 e 5.9.

A análise estatística dos dados mostrou diferença significativa entre o cenário água e o cenário efluente nos poços P5 e P10 no período chuvoso (Tabela 5.13), confirmando a hipótese apresentada nos resultados de Enterococos. Isso pode ter ocorrido possivelmente devido à proximidade deste poço com parcelas de aplicação de efluente localizadas acima, causando um arraste de contaminação.

Nas comparações entre as demais parcelas dos cenários água e esgoto, não houve diferença estatisticamente significativa.

A comparação dos dados das análises do poço D40, referente à aplicação de efluente desinfectado, com os demais poços, não apresentou diferença significativa nem no período de seca, nem no período chuvoso, Tabela 5.15.

Os Coliformes totais estiveram presentes em quase todas as amostras em valores que atingiram a ordem de 10^5 NMP/100mL, o que já torna a água imprópria para o consumo humano, sendo que a única diferença significativa estatisticamente foi detectada no período chuvoso, entre os poços P5 e P10. Mesmo no poço referente à aplicação de efluente desinfectado, (D40), os valores de C. totais estiveram próximos aos encontrados nos demais poços.

Apesar das poucas diferenças significativas entre a comparação das médias dos valores das amostras, as análises mostraram que a presença de coliformes totais foi detectada na água subterrânea em quase todas as amostras, nos três tipos de tratamento. Isso torna a água subterrânea imprópria para o consumo humano com relação ao parâmetro coliformes totais.

Tabela 5.13 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro coliformes totais.

COLIFORMES TOTAIS - NMP/100 mL							
	P3-P8		P4-P9		P5-P10		P5-P11
Total	N		N		N		N
Seca	N		N		N		N
Chuva	N		N		D		N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com $P = 0,05$

D: os resultados diferem com nível de significância com $P = 0,05$

Tabela 5.14 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço P6 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro coliformes totais

COLIFORMES TOTAIS - NMP/100 mL

	P6-P3	P6-P4	P6-P5	P6-P8	P6-P9	P6-P10	P6-P11
Total	N	N	N	N	N	N	N
Seca	N	N	N	N	N	N	N
Chuva	N	N	N	N	N	N	N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com $P = 0,05$

D: os resultados diferem com nível de significância com $P = 0,05$

Tabela 5.15 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço D40 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro coliformes totais

COLIFORMES TOTAIS NMP/100mL

	D40-P3	D40-P4	D40-P5	D40-P8	D40-P9	D40-P10
Total	N	N	N	N	N	N
Seca	N	N	N	N	N	N
Chuva	N	N	N	N	N	N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com $P = 0,05$

D: os resultados diferem com nível de significância com $P = 0,05$

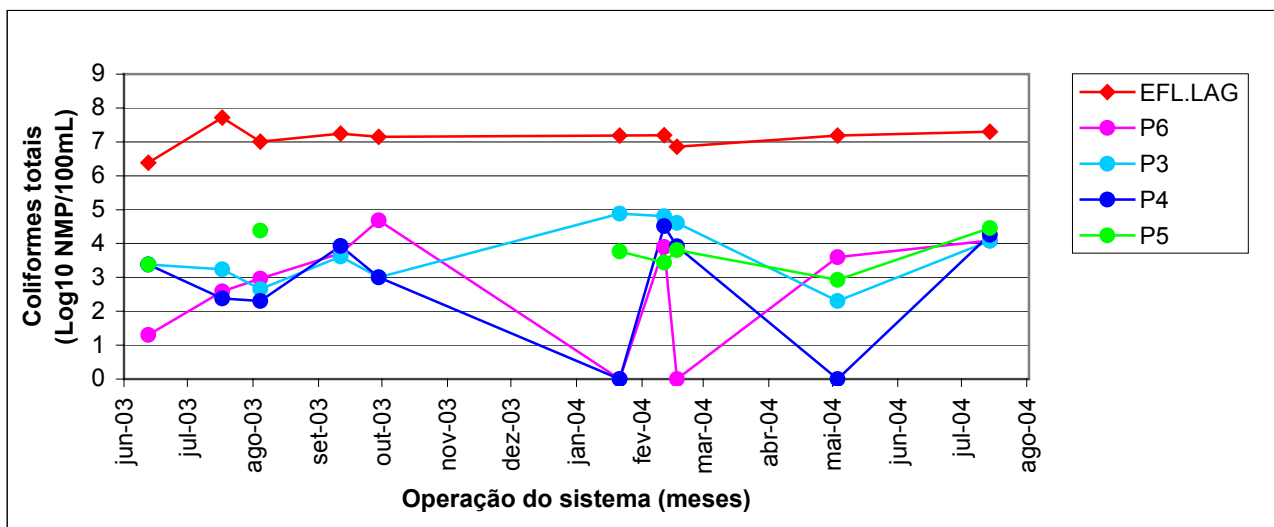


Figura 5.7 Valores de coliformes totais de P6 comparados com os poços do cenário água.

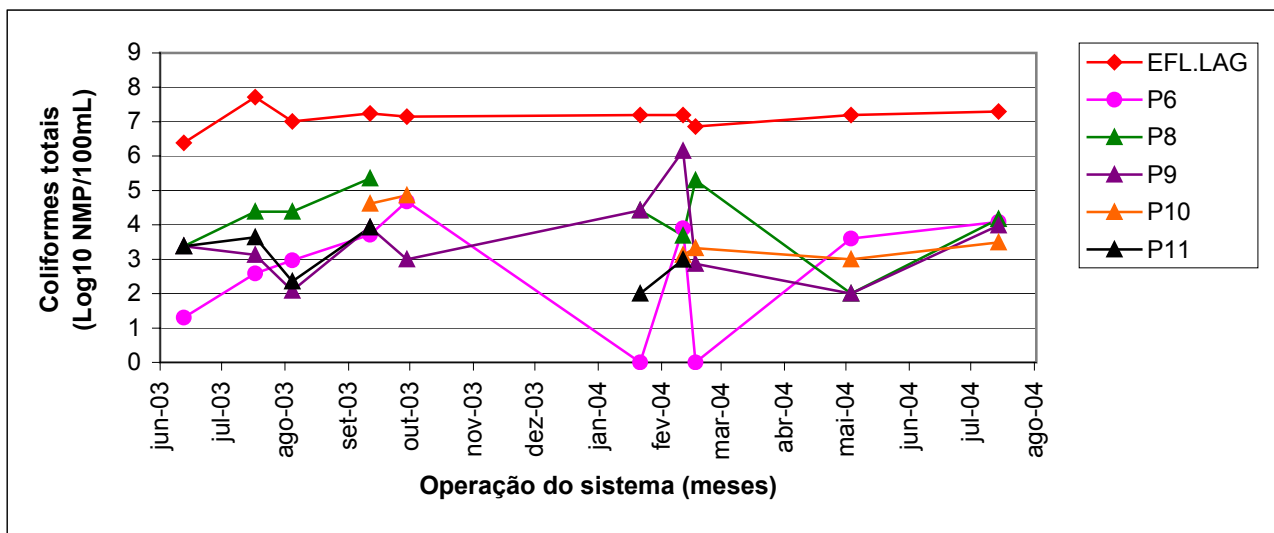


Figura 5.8 Valores de coliformes totais de P6 comparados com os poços do cenário efluente.

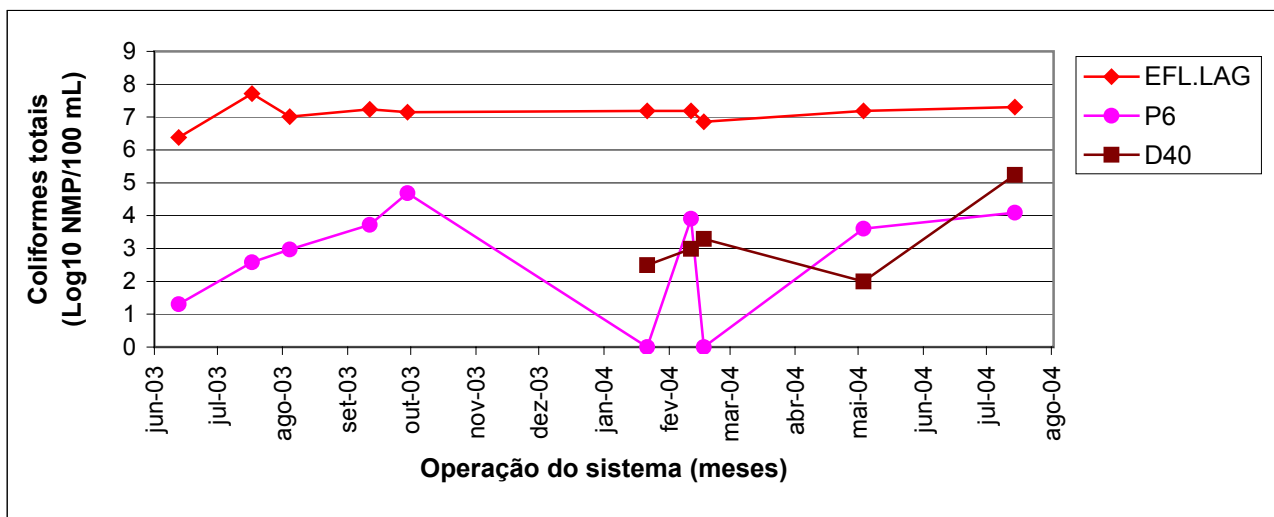


Figura 5.9 Comparação dos valores de coliformes fecais entre P6 e D40.

5.2.6 *Escherichia coli*

Com relação ao parâmetro *E.coli*, verificou-se a ausência em todas as amostras analisadas no poço de controle (P6).

Nos demais poços, foram detectadas estas bactérias nos três cenários analisados: cenários água, efluente e efluente desinfectado.

Os valores de *E.coli* estão alocados no Anexo A14.

Durante a estação chuvosa foram encontrados os maiores valores para este parâmetro, chegando a valores da ordem de 10^3 , inclusive nos poços P3 e P4, referentes ao cenário de aplicação de água. Isso provavelmente ocorreu pelo arraste provocado pela penetração da água da chuva no solo.

As análises estatísticas não mostraram diferenças significativas na comparação entre as médias dos poços do cenário água e do cenário efluente, nem na estação seca e nem na estação chuvosa Tabelas 5.16, 5.17 e 5.18.

A comparação de médias entre P6 e os demais poços não apresentou diferenças significativas para $P = 0,05$, Tabela 5.12.

Com relação ao poço referente efluente desinfectado, D40, a comparação estatística também não mostrou diferenças significativas com nenhum dos outros poços dos cenários água e efluente, como mostra a Tabela 5.13.

Com base na presença de *E.coli* nas amostras analisadas, a água não é adequada para o consumo. A portaria 1.469 (2000) determina a ausência de *E.coli* em 100 mL de amostra em água para consumo humano, assim como a nova Portaria 518 de 25/03/2004 que entrará em vigor a partir de 2005.

Tabela 5.16 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro *E.coli*.

***Escherichia coli* - NMP/100mL**

	P3-P8		P4-P9		P5-P10		P5-P11
Total	N		N		N		N
Seca	N		N		N		N
Chuva	N		N		N		

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com $P = 0,05$

D: os resultados diferem com nível de significância com $P = 0,05$

Tabela 5.17 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço P6 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro *E.coli*.

<i>Escherichia coli</i> - NMP/100mL							
	P6-P3	P6-P4	P6-P5	P6-P8	P6-P9	P6-P10	P6-P11
Total	N	N	N	N	N	N	N
Seca	N	N	N	N	N	N	N
Chuva	N	N	N	N	N	N	N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com $P = 0,05$

D: os resultados diferem com nível de significância com $P = 0,05$

Tabela 5.18 Resultados do teste estatístico da comparação das médias entre o poço D40 e os poços nas parcelas água e efluente para o parâmetro *E.coli*.

<i>Escherichia coli</i> NMP/100mL						
	D40-P3	D40-P4	D40-P5	D40-P8	D40-P9	D40-P10
Total	N	N	N	N	N	N
Seca	N	N	N	N	N	N
Chuva	N	N	N	N	N	N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com $P = 0,05$

D: os resultados diferem com nível de significância com $P = 0,05$

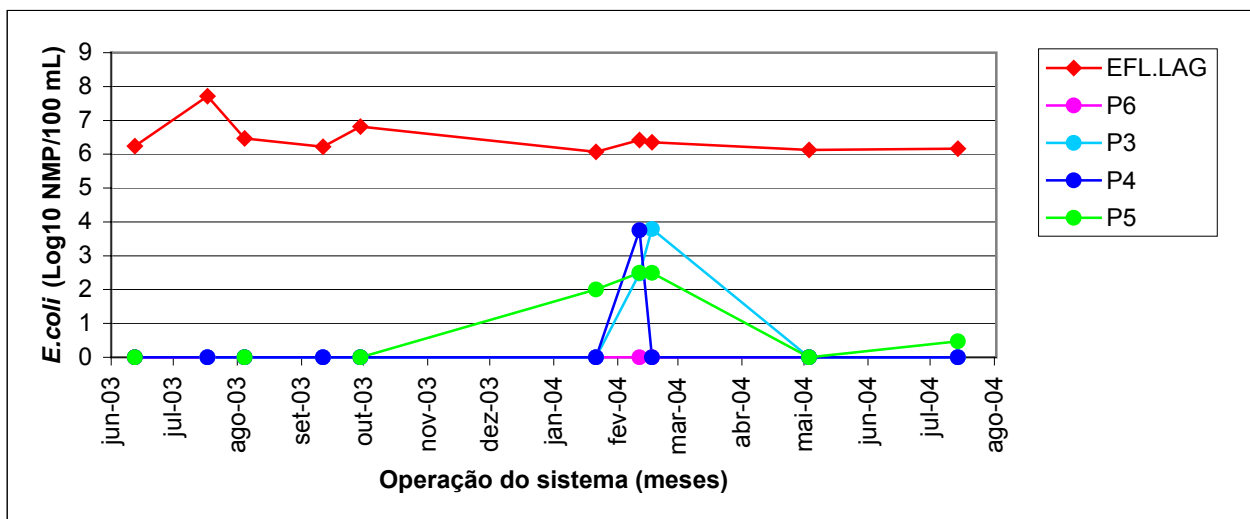


Figura 5.10 Valores de *E.coli* de P6 comparados com os poços do cenário água

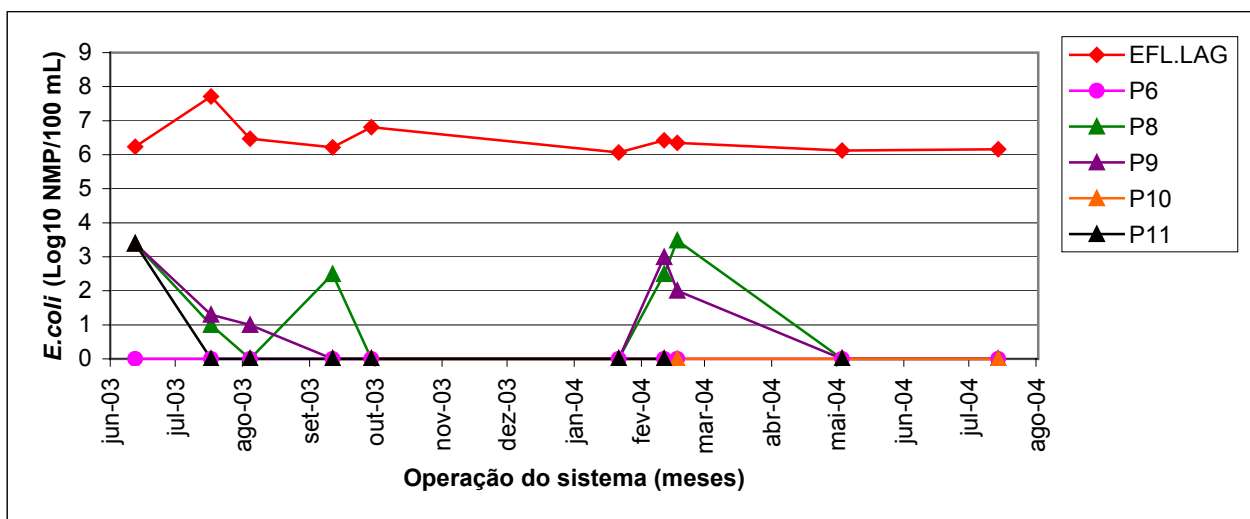


Figura 5.11 Valores de *E.coli* de P6 comparados com os poços do cenário efluente.

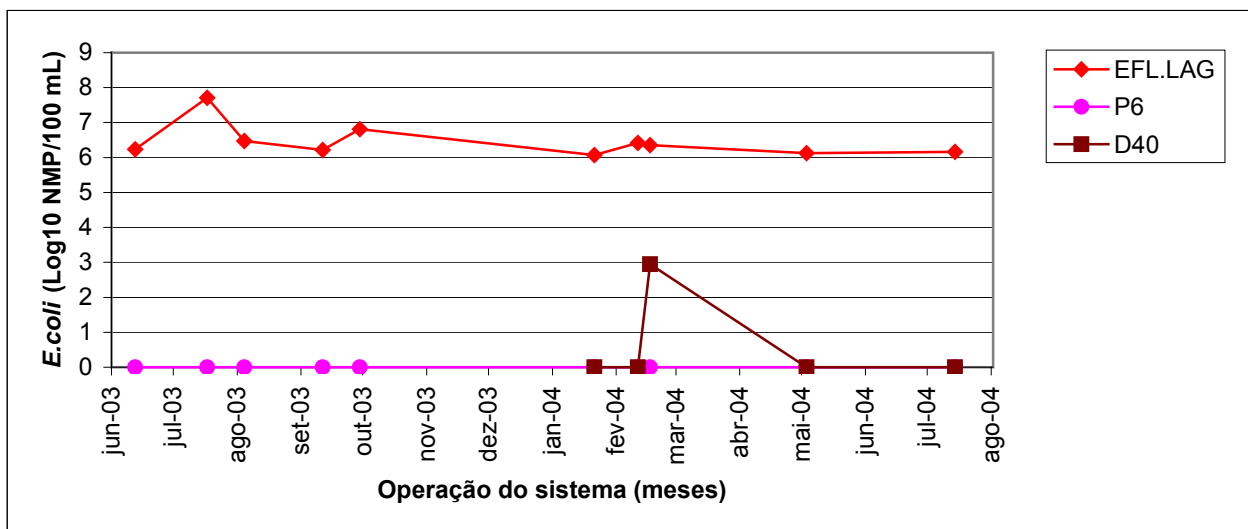


Figura 5.12 Comparação dos valores de *E.coli* entre P6 e D40.

5.2.7 Ovos de Helmintos e Cistos de Protozoários

As análises realizadas para a determinação de ovos de helmintos e cistos de protozoários mostraram que a infiltração destes organismos no solo é muito baixa. Em quase todas as amostras analisadas de todos os poços referentes aos três tipos de efluentes aplicados no solo, foi detectada a ausência de ovos e cistos.

Nas duas últimas análises da água do poço P5, foi encontrado 1 ovo de *Ascaris lumbricoides*, 1 ovo de *Hymenolepsis nana* (tênia anã) e 5 larvas de nematodas, que apesar de não se enquadrarem como ovo ou cisto, merecem ser citadas.

Os valores de ovos de helmintos e cistos de protozoários estão alocados no Anexo A17 e na Figura 5.13.

No poço P6 foi encontrado um único cisto de *Endolimax nana* na última análise realizada.

Na legislação vigente não há referência a limites permitidos para ovos e cistos. Porém na portaria 518 de 25/03/2004, que entrará em vigor a partir do ano de 2005, é recomendada a pesquisa sobre este parâmetro, o que indica que

futuramente ovos de helmintos e cistos de protozoários possam ser considerados indicadores de contaminação fecal.

Como apenas um ovo ou cisto pode-se infectar um ser humano, o uso desta água para consumo humano não é aconselhável.

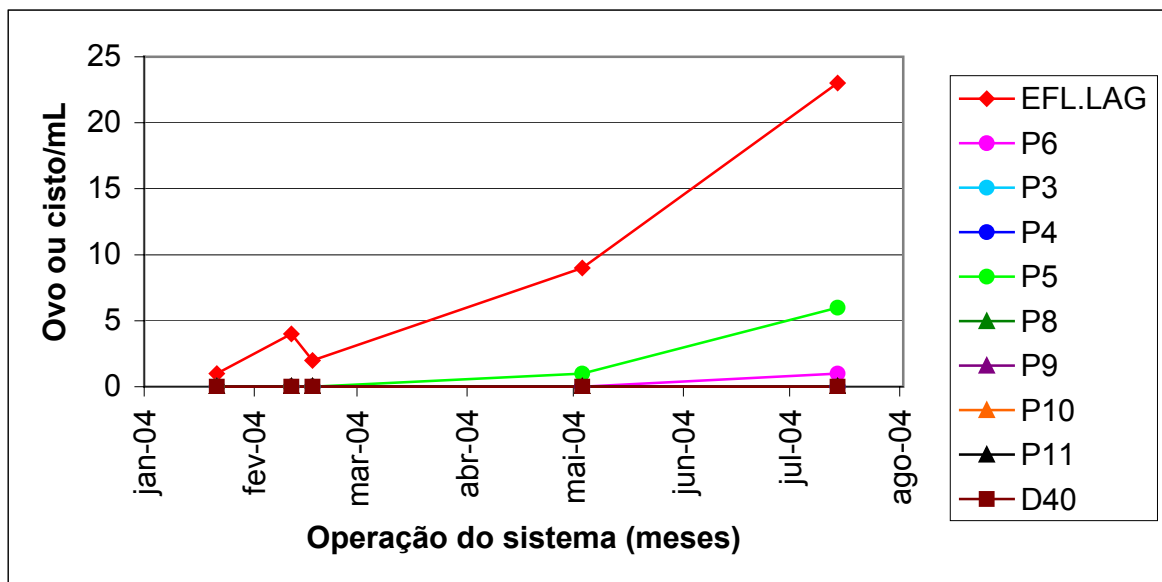


Figura 5.13 Valores de Ovos de helmintos e cistos de protozoários.

5.2.8 Bactérias heterotróficas e Fungos totais do solo

A aplicação de efluente no solo não mostrou diferenças significativas entre as parcelas água e efluente nem no período de seca e nem no chuvoso.

Como foi citado anteriormente, a introdução de uma comunidade microbiana alóctone, em um ambiente onde já existe outra estabelecida, acarreta na eliminação dos microrganismos introduzidos.

Isso ocorre devido às características ambientais às quais a comunidade autóctone já está adaptada.

Os resultados de bactérias heterotróficas e fungos totais estão alocados nos anexos A13 e A15, respectivamente.

A comunidade introduzida não chega a crescer, permanecendo em estado latente, e termina por ser eliminada pela ação predatória de protozoários e também por relações ecológicas de antagonismo, parasitismo e competição por nutrientes (ALEXANDER, 1977).

As parcelas foram comparadas em paralelo, onde A2, D2 e E2 representam as parcelas de aplicação de água, efluente, e efluente desinfectado com taxa de 0,2 m, respectivamente. O mesmo para as taxas de aplicação de 0,40 m e 0,60 m (Figura 4.3)

A comparação estatística das médias das amostras mostrou diferenças significativas entre as parcelas de efluente desinfectado com relação às parcelas E2 e D2, E4 e D4 e também A2 e D2 (Tabela 5.19)

Essa diferença com relação ao efluente desinfectado pode estar relacionada à presença de cloro residual, visto que o número de bactérias heterotróficas por grama de solo nas parcelas de efluente desinfectado foi menor do que nas demais parcelas.

Com relação aos fungos totais, não houve diferença significativa na análise estatística das médias dos valores obtidos, Tabela 5.20. Estes valores estiveram entre 10^3 e 10^6 , normalmente encontrados utilizando-se a técnica de contagem de microrganismos do solo em placas (SIVIERO, 1995).

As Figuras 5.14 e 5.19 representam os valores dos três tipos de tratamento no solo nas três taxas de aplicação de efluente no solo referentes à bactérias heterotróficas e fungos totais, respectivamente.

Com base nos dados obtidos tanto para fungos como para bactérias heterotróficas, pode-se dizer que a aplicação de esgoto doméstico não afetou significativamente a flora microbiana presente no solo.

Tabela 5.19 Comparação entre as parcelas de aplicação nos três cenários para o parâmetro bactérias heterotróficas.

BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS DO SOLO- UFC/g									
	A2-E2	A4-E4	A6-E6	E2-D2	E4-D4	E6-D6	A2-D2	A4-D4	A6-D6
Total	N	N	N	D	D	N	D	N	N
Seca	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Chuva	N	N	N	N	N	D	N	N	N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com P = 0,05

D: os resultados diferem com nível de significância com P = 0,05

Tabela 5.20 Comparação entre as parcelas de aplicação nos três cenários para o parâmetro fungos totais.

FUNGOS TOTAIS DO SOLO - UFC/g									
	A2-E2	A4-E4	A6-E6	E2-D2	E4-D4	E6-D6	A2-D2	A4-D4	A6-D6
Total	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Seca	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Chuva	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Obs: N: os resultados não diferem com nível de significância com P = 0,05

D: os resultados diferem com nível de significância com P = 0,05

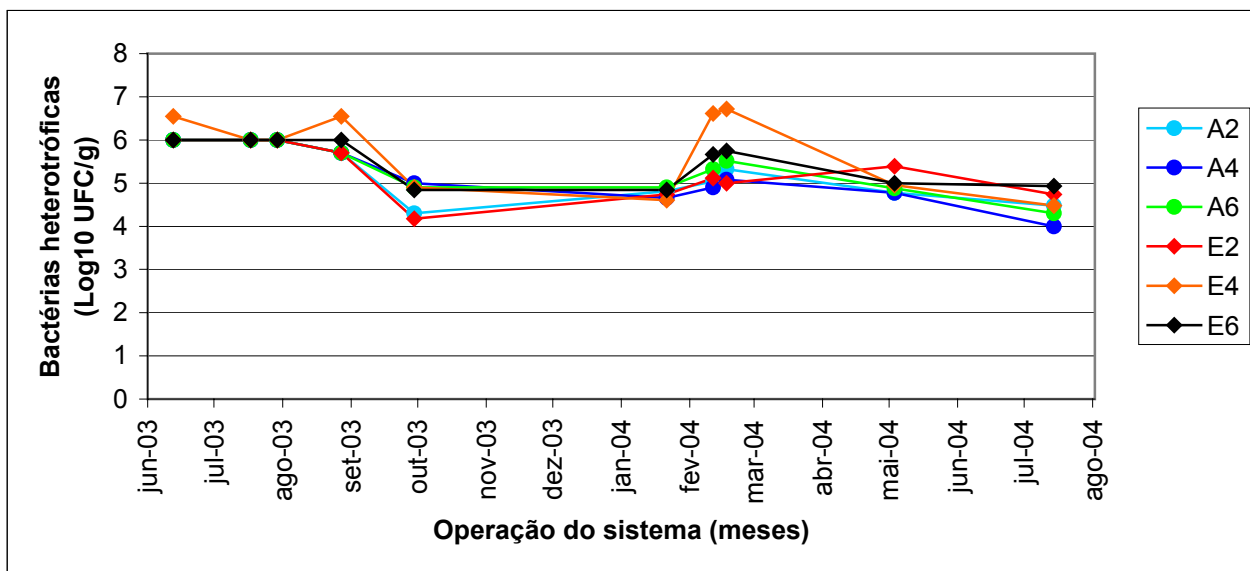


Figura 5.14 Parcelas de solo do cenário água comparadas às parcelas do cenário efluente para o parâmetro bactérias heterotróficas.

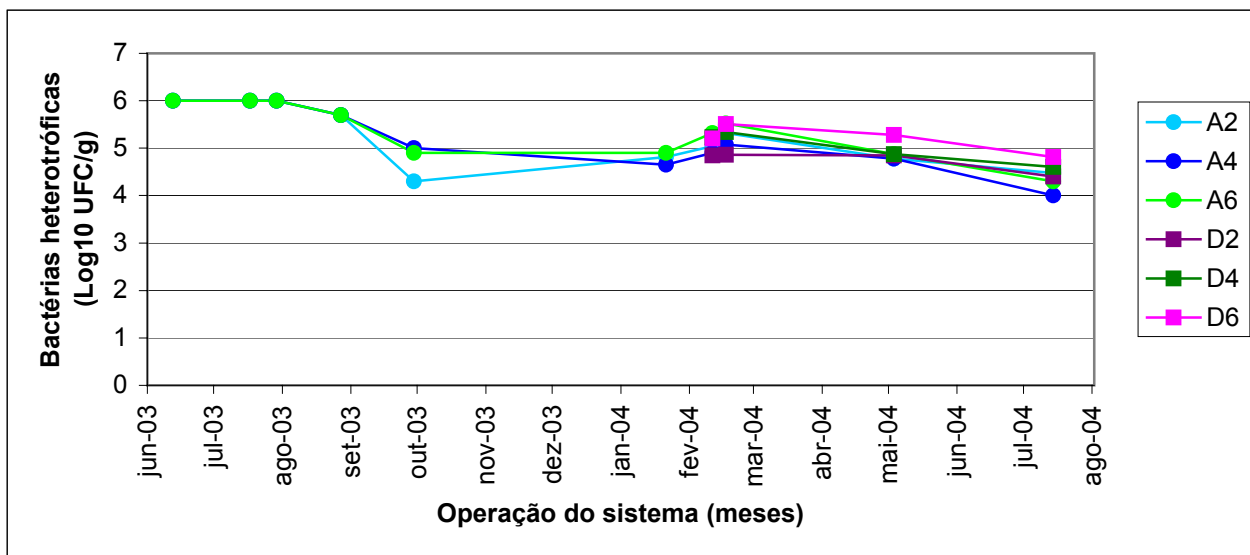


Figura 5.15 Parcelas de solo do cenário água comparadas às parcelas do cenário efluente desinfetado para o parâmetro bactérias heterotróficas.

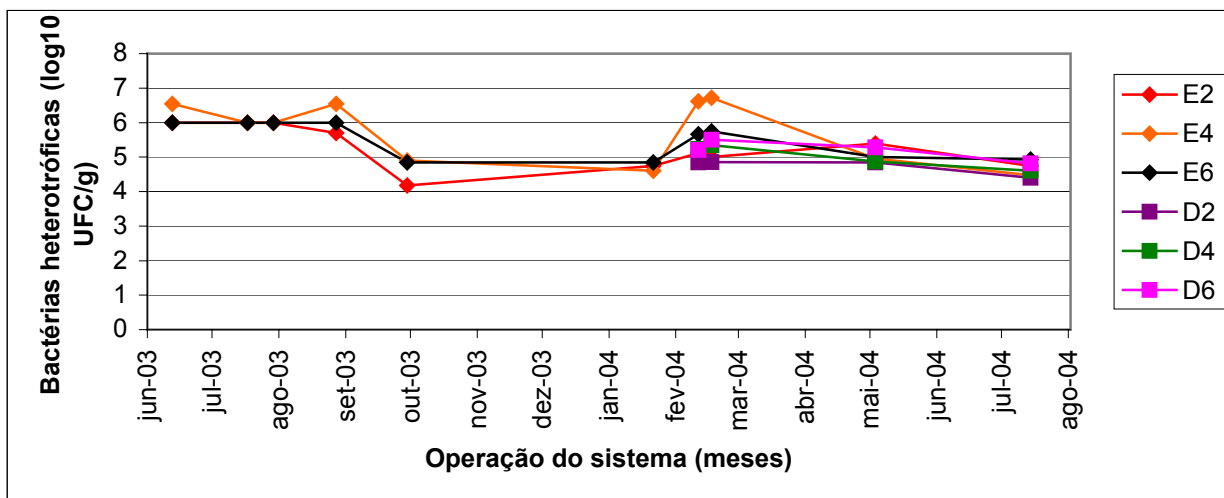


Figura 5.16 Parcelas de solo do cenário efluente comparadas às parcelas do cenário efluente desinfetado para o parâmetro bactérias heterotróficas.

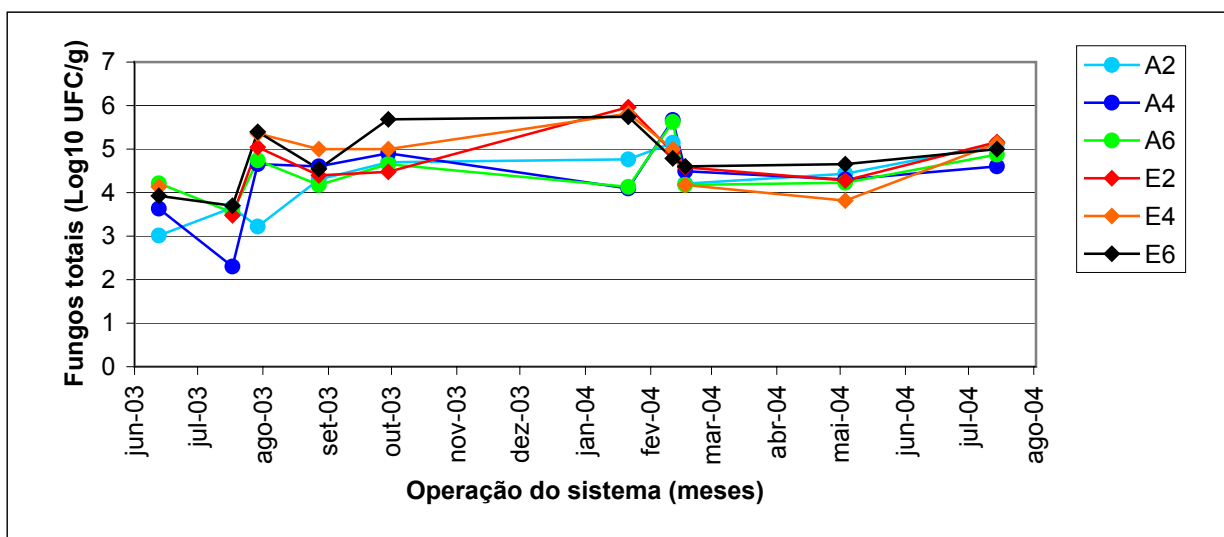


Figura 5.17 Parcelas de solo do cenário água comparadas às parcelas do cenário efluente para o parâmetro fungos totais.

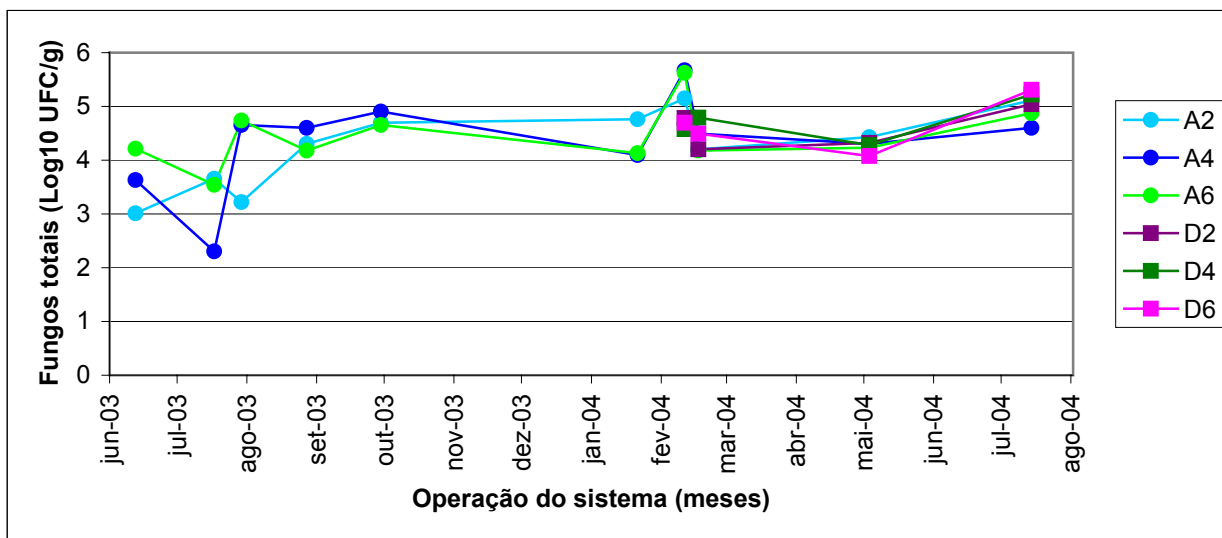


Figura 5.18 Parcelas de solo do cenário água comparadas às parcelas do cenário efluente desinfetado para o parâmetro fungos totais.

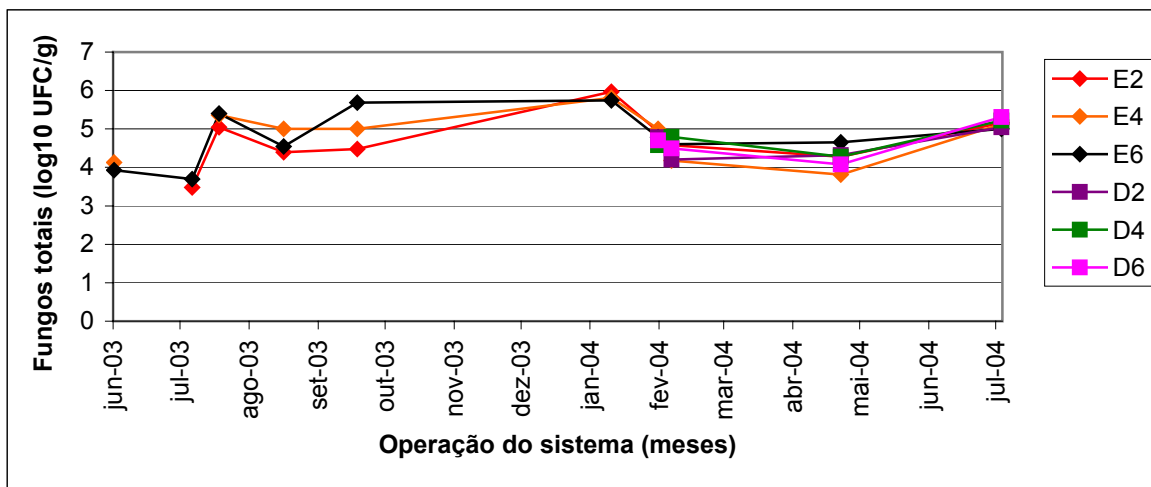


Figura 5.19 Parcelas de solo do cenário efluente comparadas às parcelas do cenário efluente e efluente desinfetado para o parâmetro fungos totais.

6 Conclusão

O Poço 6 (controle) demonstrou contaminação em certas amostras, com relação a Coliformes totais e Bactérias heterotróficas, mostrando valores acima do permitido pela legislação, quando comparados aos estabelecidos pela Portaria 1.469 (2000). Os Coliformes totais atingiram valores da ordem de 10^4 , enquanto que na maioria das amostras o valor das bactérias heterotróficas foi superior ao valor máximo de 500 UFC/mL. Apesar de serem organismos presentes naturalmente no solo, foram detectados em valores acima do permitido.

A presença de Bactérias heterotróficas em todas as amostras dos poços, tanto de efluente quanto de água, indicando que a qualidade da água subterrânea da área experimental não atinge o padrão de potabilidade estabelecido por lei.

Não houve diferença significativa do ponto de vista estatístico, tendo os resultados variando próximos ao limite tolerado pela legislação, ora o superando e ora mantendo-se ligeiramente abaixo de 500 UFC/100mL.

As maiores contaminações da água subterrânea por *E. coli* ocorreram no período chuvoso, demonstrando o efeito potencializador da chuva sobre a penetração de patógenos no solo, tanto nos poços referentes à aplicação de água quanto efluente, possivelmente devido ao alto índice pluviométrico, ocorrido nos meses de Dezembro de 2003, Janeiro e Fevereiro de 2004 (Anexo A6).

Os *Streptococcus fecalis* (Enterococos) também estiveram presentes em amostras do Poço 6 (controle) e Poço D40 (efluente desinfetado). Sua presença também foi detectada nos poços referentes à água e a efluente. Embora não tenha demonstrado ser influenciado diretamente pela precipitação, seu maior tempo de vida no solo quando comparado à *E.coli*, pode ser um fator que favoreça sua penetração no solo.

Os microrganismos do solo analisados no presente trabalho, bactérias heterotróficas e fungos totais, não demonstraram sofrer influência significativa em decorrência da aplicação de efluente no solo, onde provavelmente atuaram eliminando a microflora introduzida e convertendo a matéria orgânica presente no efluente para formas acessíveis ao milho.

Os parâmetros físico-químicos analisados, como pH e condutividade elétrica da água e umidade do solo, não apresentaram diferenças significativas ou influência direta sobre os microrganismos analisados.

A utilização de água de poços rasos para consumo humano, onde há reuso de efluente doméstico na forma de aplicação neste tipo de solo não é recomendado do ponto de vista microbiológico. Por outro lado, a aplicação de efluente doméstico na lavoura é uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos e principalmente à demanda de água. Portanto é necessário que seja realizado um processo eficaz de desinfecção antes da aplicação deste efluente no solo.

ANEXOS

Resultados das análises químicas do solo da área experimental

Resultados da análise química do solo coletado na linha de plantio.

Tratamento	pH	MO g kg ⁻¹	P mg kg ⁻¹	K	Ca	Mg	Na	H+Al	SB ⁽¹⁾ mmol _c kg ⁻¹	CTC ⁽²⁾	V ⁽³⁾ (%)
<i>Lâmina 0,20 m</i>											
Efluente	5,1	13,2	4,8	0,3	22	11	0,4	41	33,6	74,5	48
Adubo	4,9	12,0	12,0	0,4	22	8	0,4	36	30,7	66,7	47
Água	6,0	10,8	6,0	0,5	29	15	0,3	18	44	62	69
Lâmina 0,40 m											
Efluente	5,2	13,2	5,4	0,8	25	13	0,4	30	39,1	69,1	57
Adubo	5,0	12,6	10,2	0,7	25	11	0,4	31	36,4	67,7	54
Água	6,0	8,4	6,0	0,6	23	11	0,3	13	35	48	72
Lâmina 0,60 m											
Efluente	5,1	12	4,8	0,7	20	10	0,4	28	31,3	59,2	52
Adubo	5,5	11,4	7,8	0,6	27	12	0,3	22	39,3	61,1	64
Água	6,0	12	4,8	0,3	30	16	0,4	19	46	65	70

⁽¹⁾ SB = K + Ca + Mg + Na; ⁽²⁾ CTC = SB + (H+Al); ⁽³⁾ V% = (SB/CTC)*100

O teor de matéria orgânica teve pequeno incremento em relação ao tratamento adubo e ao tratamento água, sendo que maiores aumentos foram verificados nas lâminas 0,20 e 0,40 m, tanto na linha da cultura quanto no sulco de aplicação. Maiores teores foram observados na linha de cultivo, indicando a movimentação lateral da água no sulco de irrigação.

Anexo A1 – Resultados das análises químicas do solo.

Resultados da análise química do solo coletado na entrelinha (sulco de irrigação).

Tratamento	pH	MO g kg ⁻¹	P mg kg ⁻¹	K	Ca	Mg	Na	H+Al	SB ⁽¹⁾ mmol _c kg ⁻¹	CTC ⁽²⁾	V ⁽³⁾ (%)
<i>Lâmina 0,20 m</i>											
Efluente	4,5	7,2	2,4	0,2	8,0	3,0	0,6	41	10,8	52,0	21
Adubo	4,5	5,4	3,0	0,1	7,0	2,0	0,4	37	9,8	46,7	24
Água	5,0	6,0	2,4	0,2	9,0	5,0	0,3	31	14	45	32
Lâmina 0,40 m											
Efluente	4,6	9,0	2,4	0,2	10	5,0	0,8	39	15,6	55,1	28
Adubo	4,6	9,6	3,6	0,7	12	6,0	0,3	38	18,7	57,2	33
Água	5,0	4,8	3,0	0,2	13	7,0	0,3	17	21	39	55
<i>Lâmina 0,60 m</i>											
Efluente	4,5	7,2	1,8	0,2	9,0	4,0	0,6	35	13,2	48,0	28
Adubo	4,6	6,6	2,4	0,3	10	4,0	0,3	35	14,6	50,2	29
Água	5,0	7,2	2,4	0,3	12	7,0	0,4	28	18	46	40

⁽¹⁾ SB = K + Ca + Mg + Na; ⁽²⁾ CTC = SB + (H+Al); ⁽³⁾ V% = (SB/CTC)*100

Desinfecção utilizando hipoclorito de sódio

Data de coleta:28/01

Data da análise:28 e 29/01

pH: 7,23

Turbidez: 158 NTU

Resultados Coliformes totais e fecais

<u>[mg/l].Hipoclorito- Na</u>	<u>Diluição</u>	CT-- NMP/100ml	CF -- NMP/100ml
10 mg/l	<u>10¹</u>	49,48----->2,419x10 ⁴	49,44-----1,553x10 ⁴
10 mg/l	<u>10³</u>	49,26-----4,88x10 ⁵	37,21-----1,10x10 ⁵
13 mg/l	<u>10¹</u>	49,48-----2,419x10 ⁴	40,11-----1,01x10 ³
13 mg/l	<u>10³</u>	49,17-----2,90x10 ⁵	34,12-----7,6x 10 ⁴
15 mg/l	<u>10²</u>	49,25-----4,61x10 ⁴	30,08-----5,7x10 ³
15 mg/l	<u>10³</u>	44,11-----1,29x10 ⁵	11,01-----1,3x10 ⁴
Efluente sem desinfec.	<u>10⁴</u>	49,29-----4,35x10 ⁶	37,10-----8,4x10 ⁵

*Conc. Cloro livre-amostra sem desinfecção:2,607 mg/l (minimizar concentração de monocloramina)

Concentração (hipoclorito de sódio)= 15 mg/l

10 L amostra----- Volume (hipoclorito de sódio)=1,5 ml

Cl⁻ inicial= 2.827 mg/l

Cl⁻ final = 0,396 mg/l (adição de 30 ml solução de **Bissulfito de sódio** para 10 ml amostra -31,2 g p/ 100ml de água)

1) Volume Hipoclorito de sódio

-Vamos utilizar uma concentração de **16mg/l** de hipoclorito de sódio (10%).

-Para 10 Litros de amostra -----Volume de Hipoclorito de sódio = 1,6 ml

-Para 1000 Litros de amostra-----Volume de Hipoclorito de sódio = 160 ml

2) Volume da solução de Bissulfito de sódio

-Para 10ml de amostra clorada utilizou-se 30 ml da solução de **Bissulfito de sódio**.

-Para 1 Litro da amostra clorada utiliza-se 3 Litros da solução de Bissulfito de sódio.

-Para 1000 Litros utilizaremos 3000 Litros da solução de Bissulfito de sódio.

-Modo de preparo da solução de Bissulfito de sódio:

31,2 g para 100 ml de água destilada.

Anexo A4– Tratamento de desinfecção aplicado ao efluente anaeróbio.

Meios de cultura microbiana utilizados

Seguem as composições dos meios de cultura utilizados.

Meio de cultura para Bactérias Heterotróficas

Plate Count Agar – PCA

Triptona	5,0 g
Extrato de levedura	2,5 g
Glicose	1,0 g
Agar	9,0 g
Água destilada	1000 mL
pH final	7,0 ± 0,2 a 25 ° C

Meio de cultura para Fungos Totais

Sabouroaud Dextrose Agar

Peptona micológica	10,0 g
Glicose	40,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000 mL
pH final	5,6 ± 0,2 a 25 °C

Anexo A5– Meio de cultura utilizados nas análises laboratoriais.

Meio de cultura para *Streptococcus faecalis* para o ensaio presuntivo

Caldo Azida Dextrose

Peptona	20,0 g
Glicose	5,0 g
Cloreto de Sódio	5,0 g
Fosfato mono-ácido de potássio	2,7 g
Fosfato di-ácido de Potássio	2,7 g
Azida Sódica	0,2 g
pH final	7,2 ± 0,2 a 25 °C

Meio de cultura para *Streptococcus faecalis* para o ensaio confirmativo

Bile Esculin Azida Agar

Extrato de levedura	4,5 g
Proteose peptona nº 3	3,0 g
Triptona	17,0 g
Bacto oxgall	10,0 g
Bacto esculin	1,0 g
Citrato de ferro amoniacal	0,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Azida Sódica	0,5 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000 mL
pH final	7,2 ± 0,2 a 25 °C

Anexo A6– Meio de cultura utilizados nas análises laboratoriais.

Água de diluição

Peptona bacteriológica

Nitrogênio total	14 %
Nitrogênio amínico	2,6 %
Cloreto de sódio	1,6 %
pH final	6,8 a 25 ° C

A concentração final de peptona deve ser de 0,1 % preparado segundo EATON (1998) em 9550 C.

Anexo A7– Água de diluição das amostras utilizada nas análises laboratoriais.

Equações utilizadas na comparação de Médias de duas amostras (MILLER,1993)

1. Quando $n_1 = n_2$

Determina-se o desvio padrão (s^2) da amostra por:

$$s^2 = \{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2\} / (n_1 + n_2 - 2)$$

Determina-se o t calculado (t) e o grau de liberdade (GL) da amostra por:

$$t = (x_1 + x_2) / s \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}$$

$$GL = n_1 + n_2 - 2$$

2. Quando $n_1 \neq n_2$

Determina-se o t calculado (t) e o grau de liberdade (GL) da amostra por:

$$t = (x_1 + x_2) / s \sqrt{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)}$$

$$GL = \{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2) / [((s_1^2/n_1) / (n_1 + 1)) + ((s_2^2/n_2) / (n_2 + 1))]\} - 2$$

Precipitação nos anos de 2003 no Município de Limeira – SP

Dia	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Dia
01												103.5	01
02													02
03					25.5							0.8	03
04	82.1		7.1			3.5						9.2	04
05	24.1	0.6		10.9		2.1						4.2	05
06	4.9		1.6		10.1	1.4					1	22.7	06
07			5	12.3				3.8			1.4	1.4	07
08		14.9	32.9					2.1		12.5	2.3	20.5	08
09			1.6			0.7		1.3				12.2	09
10								2.4		2.5		3.7	10
11				0.9			0.6		4	28.3			11
12	10.8		10.8	0.7						19.1	5.1	5.1	12
13	21.5	37.1	1.4						0.6		9.5		13
14	3.7	13.9	8.1								2.5		14
15												19.8	15
16		14.2											16
17	7.5	9.9							12.5		43.2	3	17
18		1.7									38.5		18
19	15.6	8.8									2.8		19
20			2.1	7.1									20
21		24.2	3.7	9.3									21
22	65.4		2.5							1		16.7	22
23	7.8											23	23
24	13.9				12.3						7.4		24
25											8.2		25
26	0.6							5.5					26
27	0.6		3.1						2.7	1.7	2.8		27
28	16.4		5							4.5	4.8	2.3	28
29	40.9									2.1			29
30	19.4									1			30
31	14.6												31
Total Mensal	349.8	125.3	84.9	41.2	47.9	7.7	0.6	15.1	19.8	72.7	129.5	248.1	
Total Anual	1142.6												

Precipitação nos anos de 2004 no Município de Limeira – SP

Dia	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Dia
01	16.5					1.6							01
02	33.1	0.14											02
03						8.8							03
04		9.2	5.7			32.2							04
05		1.7											05
06		6.4			5.4								06
07	52.1		16	38.7	5.7								07
08					3.5								08
09	31.7		22.1										09
10	11.3												10
11							28.3						11
12													12
13				0.5		12							13
14					1								14
15	21.5	36.4	3	7.8	8.4	9.6							15
16	1.4			6.4	7.6								16
17				1.13									17
18					2.7								18
19							4.5						19
20			9.2	30	0.6		35.6						20
21							0.8						21
22		8.9			7.1	0							22
23		107.7				0							23
24	6.5	2.1			10.8	0							24
25		26.4		39.9	10.5								25
26	39.8	16.4		5	12.9	3							26
27	27.2		1.4										27
28	26.2												28
29	1		1										29
30													30
31					1								31
Total Mensal	268.3	215.3	58.4	129.4	77.2	67.2	69.2						
Total Anual	885.1												

Anexo A10– Precipitação nos anos de 2004 no Município de Limeira - SP

Resultados de Coliformes totais NMP/100 mL

DATA DE COLETA	EFLUENTE LAGOA	P6	P3	P4	P5	P8	P9	P11	P10	D40
12/06/03	$>2,41 \times 10^6$	$1,60 \times 10^1$	$>2,41 \times 10^3$	$>2,41 \times 10^3$	$>2,41 \times 10^3$	$>2,41 \times 10^3$	$>2,41 \times 10^3$	$>2,41 \times 10^3$		
17/07/03	$5,17 \times 10^7$	$3,85 \times 10^2$	$1,73 \times 10^4$	$2,38 \times 10^2$	seco*	$>2,41 \times 10^4$	$1,33 \times 10^3$	$4,35 \times 10^3$		
04/08/03	$1,02 \times 10^7$	$9,33 \times 10^2$	$4,55 \times 10^2$	$2,01 \times 10^2$	$>2,41 \times 10^4$	$>2,41 \times 10^4$	$1,21 \times 10^2$	$2,26 \times 10^2$		
11/09/03	$1,70 \times 10^7$	$5,20 \times 10^3$	$4,10 \times 10^3$	$8,80 \times 10^3$	seco*	$2,24 \times 10^5$	$8,50 \times 10^3$	$4,28 \times 10^2$	seco*	
29/09/03	$1,40 \times 10^7$	$4,80 \times 10^4$	$1,00 \times 10^3$	$1,00 \times 10^3$	seco*	seco*	$1,00 \times 10^3$	seco*	$7,12 \times 10^4$	
21/01/04	$1,55 \times 10^7$	< 1	$7,70 \times 10^4$	< 1	$5,88 \times 10^3$	$2,61 \times 10^4$	< 1	$1,00 \times 10^2$	seco*	$3,10 \times 10^2$
11/02/04	$2,60 \times 10^5$	$8,00 \times 10^3$	$6,48 \times 10^5$	$3,25 \times 10^4$	$2,72 \times 10^3$	$4,90 \times 10^3$	$1,41 \times 10^6$	seco*	$1,35 \times 10^3$	$9,80 \times 10^2$
17/02/04	$7,24 \times 10^6$	< 1	$4,10 \times 10^4$	$8,31 \times 10^3$	$6,44 \times 10^3$	$1,98 \times 10^5$	$7,40 \times 10^2$		$2,10 \times 10^3$	$1,98 \times 10^3$
03/05/04	$1,55 \times 10^7$	$4,10 \times 10^3$	$2,00 \times 10^2$	< 1	$8,50 \times 10^2$	$2,18 \times 10^3$	$1,76 \times 10^3$	$1,22 \times 10^3$	$1,20 \times 10^2$	$1,22 \times 10^3$
14/07/04	$2,00 \times 10^7$	$1,22 \times 10^4$	$1,21 \times 10^4$	$1,83 \times 10^4$	$2,85 \times 10^5$	$1,48 \times 10^4$	$9,60 \times 10^3$		$3,10 \times 10^3$	$1,72 \times 10^5$

* Poço seco

Anexo A11 – Resultados de Coliformes totais (NMP/100 mL) dos poços de monitoração.

Resultados de Bactérias Heterotróficas UFC/ mL

DATA DE COLETA	EFLUENTE LAGOA	P6	P3	P4	P5	P8	P9	P11	P10	D40
12/06/03	1,03x10 ⁶	3,10x10 ²	1,04x10 ³	3,80x10 ²	8,00x10 ³	7,60x10 ²	7,60x10 ²	4,80x10 ²		
17/07/03	8,90x10 ⁵	2,00x10 ³	2,00x10 ³	1,50x10 ³	seco**	9,50x10 ³	1,50x10 ⁴	2,33x10 ⁴		
04/08/03	2,00x10 ⁵	1,45x10 ²	2,70x10 ²	3,00x10 ¹	3,75x10 ²	1,38x10 ³	1,18x10 ³	1,45x10 ²		
11/09/03	2,20x10 ⁵	1,02x10 ²	1,50x10 ²	9,00x10 ¹	seco**	3,30x10 ²	1,30x10 ²	3,00x10 ²	seco**	
29/09/03	1,50x10 ⁴	5,50x10 ²	1,30x10 ²	1,80x10 ³	seco**	seco**	4,40x10 ²	seco**	1,60x10 ³	
21/01/04	7,70x10 ⁴	4,50x10 ¹	1,40x10 ²	1,80x10 ²	1,60x10 ²	1,60x10 ²	1,90x10 ²	1,00x10 ²	seco**	1,70x10 ²
11/02/04	2,60x10 ⁵	3,50x10 ²	6,50x10 ²	2,40x10 ²	1,55x10 ³	5,00x10 ²	5,20x10 ²	seco**	1,70x10 ²	2,80x10 ²
17/02/04	1,70x10 ⁶	9,00x10 ¹	3,20x10 ²	1,80x10 ²	2,10x10 ²		2,30x10 ²	2,50x10 ²
03/05/04	1,80x10 ⁵	2,12x10 ³	8,10x10 ²	8,50x10 ²	5,00x10 ²	2,18x10 ³	1,76x10 ³		1,20x10 ²	1,22x10 ³
14/07/04	2,00x10 ⁵	1,90x10 ²	1,55x10 ²	9,15x10 ²	4,25x10 ²	5,10x10 ²	1,50x10 ²		3,50x10 ¹	1,10x10 ³

* : Placa contaminada

**seco : Poço seco

Anexo A12 – Resultados de Bactérias heterotróficas (UFC/ mL) dos poços de monitoração.

Resultados de Bactérias Heterotróficas do solo UFC/ g

DATA DE COLETA	A 20	A 40	A 60	E 20	E 40	E 60	D 20	D 40	D 60
12/06/03	$> 10^6$	$> 10^6$	$1,00 \times 10^6$	$> 10^6$	$3,50 \times 10^6$	$> 10^6$			
17/07/03	$< 10^6$	$1,00 \times 10^6$	$< 10^6$	$1,00 \times 10^6$	$1,00 \times 10^6$	$1,00 \times 10^6$			
29/07/03	$1,00 \times 10^6$	$< 10^6$	$< 10^6$	$1,00 \times 10^6$	$1,00 \times 10^6$	$< 10^6$			
27/08/03	$< 10^6$	$5,00 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5$	$3,50 \times 10^6$	$1,00 \times 10^6$			
29/09/03	$2,00 \times 10^4$	$< 10^4$	$8,00 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$8,00 \times 10^4$	$7,00 \times 10^4$			
21/01/04	$6,50 \times 10^4$	$4,50 \times 10^4$	$8,00 \times 10^4$	$5,50 \times 10^4$	$4,00 \times 10^4$	$7,00 \times 10^4$	$6,00 \times 10^4$	$5,50 \times 10^4$	$6,50 \times 10^4$
11/02/04	$1,10 \times 10^5$	$8,00 \times 10^4$	$2,10 \times 10^5$	$1,30 \times 10^5$	$4,10 \times 10^6$	$4,60 \times 10^5$	$6,1 \times 10^4$	$3,80 \times 10^4$	$5,00 \times 10^4$
17/02/04	$2,10 \times 10^5$	$1,20 \times 10^5$	$3,30 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$	$5,20 \times 10^6$	$5,60 \times 10^5$	$7,20 \times 10^4$	$2,20 \times 10^5$	$3,20 \times 10^5$
03/05/04	$6,00 \times 10^4$	$6,00 \times 10^4$	$7,50 \times 10^4$	$2,45 \times 10^5$	$9,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^5$	$7,00 \times 10^4$	$7,50 \times 10^4$	$1,90 \times 10^5$
14/07/04	$3,00 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$	$2,00 \times 10^5$	$5,50 \times 10^5$	$3,00 \times 10^5$	$8,50 \times 10^5$	$2,50 \times 10^5$	$4,00 \times 10^5$	$6,50 \times 10^5$

Anexo A13 – Resultados de Bactérias heterotróficas (UFC/g) das amostras de solo.

Resultados de *Escherichia coli* NMP/100 mL

DATA DE COLETA	EFLUENTE LAGOA	P6	P3	P4	P5	P8	P9	P11	P10	D40
12/06/03	1,73x10 ⁶	< 1	< 1	< 1	< 1	>2,41x10 ³	>2,41x10 ³	>2,41x10 ³		
17/07/03	5,17x10 ⁷	< 1	< 1	< 1	seco*	1,00x10 ¹	2,00 x10 ¹	< 1		
04/08/03	2,95x10 ⁶	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	1,00x10 ¹	< 1		
11/09/03	1,66x10 ⁶	< 1	< 1	< 1	< 1	3,10x10 ³	< 1	< 1	seco*	
29/09/03	6,50x10 ⁶	< 1	< 1	< 1	seco*	seco*	< 1	seco*	< 1	
21/01/04	1,17x10 ⁶	< 1	< 1	< 1	1,00x10 ²	< 1	< 1	< 1	seco*	< 1
11/02/04	2,64x10 ⁶	< 1	3,00x10 ²	5,72x10 ³	3,10x10 ²	3,10x10 ²	9,70x10 ²	seco*	< 1	< 1
17/02/04	2,24x10 ⁶	< 1	6,20x10 ³	< 1	3,10x10 ²	3,00x10 ³	1,00x10 ²		< 1	8,86x10 ³
03/05/04	1,33x10 ⁶	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1		< 1	< 1
14/07/04	1,45x10 ⁶	< 1	< 1	< 1	3,00x10 ³	< 1	< 1		< 1	1,00x10 ³

* Poço seco

Anexo A14 – Resultados de *Escherichia coli* (NMP/100 mL) dos poços de monitoração.

Fungos totais do solo UFC/ g

DATA DE COLETA	A 20	A 40	A 60	E 20	E 40	E 60	D 20	D 40	D 60
12/06/03	1,03x10 ⁴	4,30 x10 ³	1,63 x10 ⁴	< 10 ³	1,35 x10 ⁴	8,5 x10 ³			
17/07/03	4,50 x10 ³	2,00 x10 ³	3,50 x10 ³	3,00 x10 ³	< 10 ³	5,00 x10 ³			
29/07/03	1,65 x10 ⁵	4,50 x10 ⁴	5,50 x10 ⁴	1,10 x10 ⁵	2,30 x10 ⁵	2,50 x10 ⁴			
27/08/03	2,00 x10 ⁴	4,00 x10 ⁴	1,50 x10 ⁴	2,50 x10 ⁴	1,00 x10 ⁵	3,50 x10 ⁴			
29/09/03	5,00 x10 ⁴	8,00 x10 ⁴	4,50 x10 ⁴	3,00 x10 ⁴	1,00 x10 ⁵	4,80 x10 ⁵			
21/01/04	5,80 x10 ⁴	1,25 x10 ⁵	1,35 x10 ⁵	9,20 x10 ⁵	6,50 x10 ⁵	5,50 x10 ⁵	7,20 x10 ⁵	8,80 x10 ⁵	4,50 x10 ⁵
11/02/04	1,40 x10 ⁵	4,70 x10 ⁵	4,20 x10 ⁵	8,60 x10 ⁴	1,00 x10 ⁵	6,10 x10 ⁴	6,10 x10 ⁴	3,80 x10 ⁴	5,00 x10 ⁴
17/02/04	3,80 x10 ⁴	1,50 x10 ⁴	4,00 x10 ⁴	1,60 x10 ⁴	3,10 x10 ⁴	1,50 x10 ⁴	1,60 x10 ⁴	6,20 x10 ⁴	3,10 x10 ⁴
03/05/04	2,70 x10 ⁴	2,00 x10 ⁴	1,70 x10 ⁴	1,90 x10 ⁴	6,50 x10 ³	4,50 x10 ⁴	2,10 x10 ⁴	1,90 x10 ⁴	1,20 x10 ⁴
14/07/04	1,30x10 ⁶	4,00x10 ⁵	7,50x10 ⁵	1,45x10 ⁶	1,35x10 ⁶	1,00x10 ⁶	1,10x10 ⁶	1,65x10 ⁶	2,05x10 ⁶

Anexo A15 – Resultados de Fungos totais (UFC/g) das amostras de solo.

Resultados de *Streptococcus faecalis* (Enterococos) NMP/100 mL

DATA DE COLETA	EFLUENTE LAGOA	P6	P5	P10	D40
12/06/03	$>1,60 \times 10^3$	< 2	$1,10 \times 10^2$		
17/07/03	$5,00 \times 10^5$	< 2	seco*		
04/08/03	$5,00 \times 10^5$	< 2	$1,17 \times 10^1$		
11/09/03	$3,00 \times 10^5$	< 2	seco*	seco*	
29/09/03	$3,00 \times 10^5$	$5,00 \times 10^1$	$3,00 \times 10^1$	$5,00 \times 10^3$	
21/01/04	$1,10 \times 10^6$	< 2	$8,00 \times 10^2$	seco*	2
11/02/04	$1,70 \times 10^6$	< 2	$3,00 \times 10^2$	$1,30 \times 10^1$	< 2
17/02/04	$1,10 \times 10^6$	$1,70 \times 10^1$	$1,70 \times 10^1$	$5,00 \times 10^1$	$9,00 \times 10^1$
03/05/04	$5,00 \times 10^5$	< 2	$1,30 \times 10^1$	4	2
14/07/04	$1,30 \times 10^5$	$8,00 \times 10^1$	$2,40 \times 10^3$		$1,30 \times 10^1$

* Poço seco

Anexo A16– Resultados de Enterococos (NMP/100 mL) dos poços de monitoração.

Resultados de ovos de Helmintos e cistos de Protozoários N° de OVO ou CISTO/ mL

DATA DE COLETA	EFLUENTE LAGOA	P6	P3	P4	P5	P8	P9	P11	P10	D40
21/01/04	Cisto de <i>Endolimax nana</i>	0	0	0	0	0	0	0	seco*	0
11/02/04	Cisto de <i>Endolimax nana</i> Cisto de <i>Giardia sp</i> Ovo de <i>Hymenolepsis diminuta</i> (2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17/02/04	Cisto de <i>Endolimax nana</i> Cisto de <i>Entamoeba coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
03/05/04	Cisto de <i>Giardia sp</i> (6) Ovo de <i>Hymenolepsis nana</i> (3)	0	0	0	Ovo de <i>Hymenolepsis nana</i> (1)	0	0	0	0	0
14/07/04	<i>Giardia sp</i> (3) Cisto de <i>Entamoeba coli</i> (17) Protozoário de vida livre (2) Protozoário de não ciliado de vida livre (2)	Cisto de <i>Endolimax nana</i> (1)	0	0	Larva de nematoda (5) Ovo de <i>Ascaris lumbricoides</i> (1)	0	0	0	0	0

Anexo A17 – Resultados de ovos de Helmintos e cistos de Protozoários N° de OVO ou CISTO/ mL dos poços de monitoração.

Resultados da condutividade elétrica da água $\mu\text{S}/\text{cm}$

TA DE COLETA	EFLUENTE LAGOA	P6	P3	P4	P5	P8	P9	P10	D40
21/01/04	4882	52,3	74,6	96,3	91	64,6	85,2		80,2
11/02/04	6158	47,8	89,6	125,7	104,7	87,8	122,4	90,2	74
17/02/04	5114	32,8	98,4	92,1	114,6	105,4		72,5	69,3
03/05/04	6210	56,4	102,4	117,4	123,6	120,6	138	63,4	55,5
14/07//04	6950	44,9	87,4	101,8	95,6	98,1	110,3	80,9	93,2

Anexo A18– Resultados da condutividade elétrica da água $\mu\text{S}/\text{cm}$ dos poços de monitoração.

Resultados do pH da água

DATA DE COLETA	EFLUENTE LAGOA	P6	P3	P4	P5	P8	P9	P10	D40
21/01/04	7,07	4,9	4,73	4,3	5,11	4,62	4,66		4,65
11/02/04	6,82	4,78	5,31	4,36	5,2	5,06	4,48	4,75	4,76
17/02/04	7,02	4,67	5,02	4,26		4,85		4,45	4,72
03/05/04	6,4	4,47	4,61	4,46	4,48	4,57	4,32	4,44	5,44
14/07//04	6,71	4,67	4,65	4,3	5,14	4,72	4,57	4,3	4,66

Anexo A19 – Resultados do pH da água dos poços de monitoração.

Umidade do solo

DATA DE COLETA	A 20	A 40	A 60	E 20	E 40	E 60	D 20	D 40	D 60
12/06/03	15,21	18,34	14,55	14,94	16,55	17,23			
17/07/03	13,20	16,14	17,45	18,01	14,27	16,12			
29/07/03	15,29	15,39	12,17	13,29	13,86	14,85			
27/08/03	22,16	12,37	11,45	11,09	15,43	14,65			
29/09/03	10,72	13,20	10,25	11,97	10,61	10,60			
21/01/04	1,22	1,00	1,25	1,45	1,40	2,20			
11/02/04	10,11	14,30	18,12	12,88	10,85	17,79	12,07	13,55	49,88
17/02/04	10,56	13,45	15,26	17,47	16,22	14,85	16,87	18,21	14,47
03/05/04	12,82	14,42	16,85	21,37	17,04	13,84	15,85	18,64	15,00
14/07/04	18,39	16,55	17,74	15,21	19,15	18,64	18,39	18,91	14,43

Anexo A20 – Umidade do solo

REFERÊNCIAS

ABNT, norma NBR 13895 **Construção de poços de monitoramento e amostragem**, junho de 1997.

ALEXANDER,M., **Introduction to soil microbiology**, 2^a ed. New York,1977,467p

ARNADE,L.J., **Seazonal correlation of well contamination and septic tank distance**, Ground Water, vol 37, 920-923 pp ,1999.

ASANO,T.,COTRUVUO,J.A., **Groundwater recharge with reclaimed municipal wastewater: health and regulatory considerations**, Water Research, vol 38, 1941-1951 pp, 2004,.

AWUAH,E.,LUBBERDING,H.J.,ASANTE,K.,GIJZEN,H.J., **The effect of pH on enterococci removal in *Pistia*, duckweed-and algae basedstabilization ponds for domestic wastewater treatment**, Water Science and Tecnology, vol 45, n° 1, 67-74 pp, 2002.

BERG,L.R. **Introductory botany**, Ed. Willey-Liss, New York, 1997, 466 p

BITTON, G.; GERBA, C.P., **Groundwater pollution microbiology**, Ed. Willey-Liss, New York, 1987, 377 p.

BRASIL, CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – NT 08 – **Análises microbilógicas de águas, L5.201 – Bactérias Heterotróficas. Contagem em placas**, Normalização Técnica Saneamento Ambiental, São Paulo, 1986.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 20 de 18 de junho de 1986**. (Publicado no D.O.U. de 30/07/86), Brasília. 1986.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria 1469, de 29 de dezembro de 2000. (Republicada no D.O. nº 1 de 2/01/2001), Brasília. 2000.

Disponível em:<http://www.mma.gov/port/conama/res/res86/res2086.html>.

CAMPOS,J.R., et al. **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**, PROSAB, RECOPE - Rede cooperativa de pesquisas, Rio de Janeiro, 1999, 435 p.

CAMPOS,C.,ORON,G.,SALGOT,M.,GILLERMAN,L.,CASALS,G., **Attenuation of microorganisms in the soil during drip irrigation with waste stabilization pond effluent**, Water Science and Technology, vol 42, n ° 10 – 11, 2000, 387-392 pp.

CARACCIOLO,A.B.,GIULIANO,G.,DI CORCIA, A., CRESCENZI, C., SILVESTRI, C. **Microbial degradation of terbutylazine in surface soil and subsoil at two different temperatures**, Bulletin of environmental contamination and toxicology, vol 67, 2001, 815-820 pp.

EATON, A.D., GREENBERG, A.E., CLESCERI, L.S., **Standard methods for examination of water and wastewater**. APHA. Washington DC, 20 ed., 1998.

FASCILOLO,G.E.,MECA,M.I.,GABRIEL,E.,MORÁBITO,J., **Effects on crops of irrigation with treated municipal wastewaters**, Water Science and Technology, vol 45, n° 1, 2002, 133 – 138 pp.

GANTZER, C et al., **Adsorption and survival of fecal coliforms, somatic Colifages and F – specific RNA fages in soil irrigated with wastewater**, Water Science and Technology, vol 43, nº 12, pp 117 – 124, 2001.

GAUTHIER,F., ARCHIBALD,F. **The ecology of fecal indicator bacteria commonly found in pulp and paper mill water systems**, Water Research, vol 35, n 9, p 2207 – 2217, 2001.

GILPIN,B.,JAMES,T.,NOUROZI,F.,SAUNDERS,D.,SCHOLES,P.,SAVILL,M.,
The use of chemical and molecular microbial indicators for faecal source identification, Water Science and Technology, vol 47, nº 3, 39-43 pp, 2003.

GODINHO,M.V.,CHERNICHARO,C.A.L.,HONÓRIO,K.B., **Caracterização de lodos gerados em sistemas de tratamento de esgotos quanto à presença de ovos de helmintos**, 22º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES, 2003.

KRAFT,G.J.,STITES,W.,MECHENICH,D.J., **Impacts of irrigated vegetable agriculture on a humid North-Central U.S. sand plain aquifer**, Ground Water, vol 37, nº 4, 572-579 pp, 1999.

KUMAR SINGH,B.,WALKER,A.,WRIGHT,D.J., **Persistence of chlorpyrifos, fenamiphos, chlorothalonil, and pendimethalin in soil and their effects on soil microbial characteristics**, Bulletin of environmental contamination and toxicology, vol 69,181-188 pp, 2002.

LEARMONTH,J.J.,IONAS,G.,PITA,A.B.,COWIE,R.S., **Identification and genetic characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* strains in humans and dairy cattle in the Waikato region of New Zeland**, Water Science and Technology, vol 47, nº 3, 21-26 pp, 2003.

LEDERBERG, J. **Encyclopedia of microbiology**, vol 2, Academic press inc, New York, 1992.

LEDERBERG, J. **Encyclopedia of microbiology**, vol 4, Academic press inc, New York, 1992.

MASCHER,F.,DELLER,S.,PICHLER-SEMMELOCK, F.F., ROEHM, S., MARTH, E. **The significance of sunlight for the elimination of bacteria in small-scale bathing ponds in central Europe**, Water Science and Tecnology, vol 47, n° 3, 211-213 pp, 2003.

METCALF e EDDY. **Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse**, 3ª ed, Rio de Janeiro, New Dheli, MacGraw-hill Book Co, 1991, 1334p.

MITCHELL,R. **Environmental microbiology** , Willey-Liss, New York, 411p.

MUHAMMETOGLU,H., MUHAMMETOGLU,A.,SOYUPAK,S., **Vulnerability of ground water to pollution from agricultural diffuse sources: a case study** Water Science and Tecnology, vol 45, n° 9, 1-7 pp, 2002.

NOLA, M. et al. **Faecal coliforms and faecal streptococci community in the underground water in an equatorial area in Cameroon: The Importance of some environmental chemical factors**, Water Research, vol 36, n 13, p 3287 – 3297, 2002.

ODUM,E.P., **Ecologia**, Guanabara - Koogan S.A. Rio de Janeiro-RJ, 1988

PELCZAR Jr.,J.M.;REID,R.;CHAN,E.C.S., **Microbiologia conceitos e aplicações**, vol 1, 2ª ed, Ed Makron Books do Brasil, São Paulo – SP, 1996.

PELCZAR Jr.,J.M.;REID,R.;CHAN,E.C.S., **Microbiologia conceitos e aplicações**, vol 2, 2ª ed, Ed Makron Books do Brasil, São Paulo – SP, 1996.

PESSOA, S.B.,MARTINS.A V., **Parasitologia Médica**,11^a ed., Ed. Guanabara - Koogan S.A. Rio de Janeiro-RJ, 1982.

OBI,C.L.,POTGIETER,N.,BESSONG,P.O.,MATSAUNG,G., **Scope of potential bacterial agents of diarrhea and microbial assessment of quality of river water sources in rural Venda communities in South Africa**, Water Science and Tecnology, vol 47, n° 3, 59-64 pp, 2003.

REED,S.C.,CRITES,R.W.,MIDDLEBROOKS,E.J., **Natural systems for management and treatment**, 2^o ed, MacGraw-Hill, New York, 1995, 433 p.

SIQUEIRA, J.O. et al., **Microrganismos e processos biológicos do solo**, EMBRAPA – SPI , Brasília – DF, 1994, 142 p.

SIVIERO, A.R., **Influência da aplicação no solo do resíduo da indústria cítrica sobre fungos e bactérias e avaliação da sua toxicidade sobre *Daphnia similis***, Universidade Estadual de São Paulo, Tese de Doutorado em microbiologia, Rio Claro,1995, 112p.

STOTT,R.,MAY,E.,RAMIREZ,E.,WARREN,A., **Predation of *Cryptosporidium oocystis* by protozoa and rotifers: implications for water quality and public health**, Water Science and Tecnology, vol 47, n° 3, 77-83 pp, 2003.

THORN,R.H.,COXON,C.E., **Hidrogeological aspects of bacterial contamination of some western Ireland karstic limestone aquifers**, Environmental Geological Water Science, vol 20, n° 1, 65-72 pp, 1992.

TORTORA,G.J.,FUNKE,B.R.,CASE,C.L., **Microbiologia**, 6^o ed, Artmed, 2002, 827p.

VENDEMIATTI,J.A.S., Avaliação físico-química e microbiológica da água Subterrânea em área irrigada com efluente de filtro anaeróbio, Universidade Estadual de Campinas, Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil, Campinas, 2003, 130 p.

VIEIRA,D.B. Engenharia de irrigação, Limeira – Faculdade de Engenharia civil de Limeira, UNICAMP,1983, 423 p.

VICTORETTI,A.B., Contribuição ao emprego de lagoas de estabilização como processo para depuração de esgotos domésticos, CETESB, 1973, 131 p.

VICTORICA,J.,GALVÁN,M., Preliminary testing of a rapid coupled methodology for quantification/ viability determination of helminth eggs in raw and treated wastewater, Water Research, vol 37, n ° 6,1278 – 1287 pp, 2003.

VON SPERLING, M. Lagoas de estabilização, Departamento de engenharia sanitária e ambiental, UFMG, vol 3, Belo Horizonte, 1996, 136 p.

VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos, Departamento de engenharia sanitária e ambiental, UFMG, vol 3, Belo Horizonte, 1996, 243 p.

WALLIS,J.L.,TAYLOR,H.D., Phenotypic population characteristics of the enterococci in wastewater and animal faeces: implications for the new European directive on the quality of bathing waters, Water Science and Technology, vol 47, n° 3, 27-32 pp, 2003.