



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO TECNOLÓGICO

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

KÉZYA CRISTINA FRIZZERA NUNES

CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* EM ÁGUA CINZA
VISANDO O REUSO

VITÓRIA

2019

KÉZYA CRISTINA FRIZZERA NUNES

CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* EM ÁGUA CINZA
VISANDO O REUSO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Desenvolvimento Sustentável da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia e Desenvolvimento Sustentável.

Orientador: Sérgio Túlio Cassini

VITÓRIA

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

N972c Nunes, Kézya Cristina Frizzera, 1982-
Crescimento e sobrevivência de *Escherichia coli* em água
cinza visando o reuso / Kézya Cristina Frizzera Nunes. - 2019.
102 f. : il.

Orientador: Sérgio Túlio Cassini.
Dissertação (Mestrado em Engenharia e Desenvolvimento
Sustentável) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro
Tecnológico.

1. Água cinza. 2. Água - reuso. 3. *Escherichia coli*. I. Cassini,
Sérgio Túlio. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro
Tecnológico. III. Título.

CDU: 628|

KÉZYA CRISTINA FRIZZERA NUNES

**CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* EM
ÁGUA CINZA VISANDO REUSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Desenvolvimento Sustentável (Modalidade Profissional) da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Desenvolvimento Sustentável na área de concentração Saneamento Ambiental e Saúde Pública.

Aprovada em 27 de fevereiro 2019.

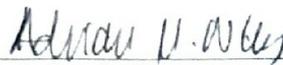
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. D.Sc. Sérgio Tullio Alves Cassini
Orientador - PPGES / CT / UFES



Prof. D.Ing. Ricardo Franci Gonçalves
Examinador Interno - PPGES / CT / UFES



Profª. D.Sc. Adriana Márcia Nicolau Korres
Examinadora Externa - IFES

Agradecimentos

Agradeço acima de tudo à Deus, pelo dom da vida, por todas as oportunidades que me foram dadas, por todas as provações, e por sempre me mostrar que depois da tempestade vem a bonança.

A minha mãe Gyslene, por ter me dado apoio, por ter aguentado todas as minhas crises de choro e por ter me ensinado a nunca desistir dos meus sonhos. A minha avó Geralda por todo amor, carinho, dedicação e por todos os puxões de orelhas para que eu aprendesse a tabuada. Ao meu irmão Matheus, por todo apoio e todas as caronas, principalmente nos fins de semana e feriados.

A todos os meus amigos de pesquisa: Laila, sem você esse trabalho não seria possível, obrigada pelas aulas de microbiologia, pela paciência e pelos puxões de orelha, tudo que conquistei devo a você, Graciele, pela parceria no desespero e na luta para que tudo desse certo, Luiza, por todas as vidrarias lavadas, pelas saídas após o dia de trabalho e por todo carinho (ainda bem que você nunca mais foi embora), Danielsan, que saiu especialista em fazer placas, abriu mão das suas férias, mas não nos abandonou, Marina, a mais linda de todas, por toda sua alegria, obrigada por ter me ensinado a ter uma auto estima super elevada, NatanaETE, por toda sua alegria, mesmo quando tudo dava errado, estava rindo da própria desgraça. por sempre acreditarem em mim, e nunca me deixarem desistir. Aline e Cris obrigada por toda as ajudas nas análises, de fato elas não são uma receita de bolo, e sem vocês não conseguiria fazer nenhuma delas.

Ana Bia Lobo obrigada por ter me aguentado desde o início, a primeira pessoa conheci nesse mundo estranho que é o mestrado, obrigada por todos os ensinamentos e conselhos.

A todos meus colegas do Labsan: Larissa, Barcellos, Paulo, Rodrigo, Lucas, Yohanna, Cristiano obrigada pelo carinho, paciência, pelas comidas, pelos churrascos, esses momentos estarão sempre comigo.

Agradeço em especial ao professor Sérgio Tulio pela oportunidade que me foi dada, obrigada pela experiência e pela confiança. A banca examinadora professor Ricardo Franci e professora Adriana Korres pela disponibilidade.

RESUMO

As águas cinzas são definidas como águas residuárias produzidas nos chuveiros, banheiras, lavatórios, máquinas de lavar, pias de cozinha e tanques. Patógenos na água cinza ocorrem em menor quantidade do que na águas residuárias domésticas. No entanto, a água cinza pode ter uma elevada carga de compostos orgânicos facilmente degradáveis, o que pode favorecer o crescimento de bactérias entéricas, como os indicadores de contaminação fecal. A sobrevivência de bactérias fecais em ambientes aquáticos depende de sua capacidade de tolerar uma série de estresses biológicos dentre eles a disponibilidade de nutrientes como fósforo e nitrogênio sendo esses nutrientes biologicamente necessários para a sobrevivência de bactérias, como a *Escherichia coli*. O presente trabalho visa avaliar a crescimento/sobrevivência de *Escherichia coli* em amostras de água cinza destinada ao reuso. Para tanto foi avaliado a influência de nutrientes (fósforo, nitrogênio e glicose) no crescimento/sobrevivência de *Escherichia coli* em água cinza. Foram desenvolvidas curvas de crescimento/sobrevivência em água cinza bruta e água cinza bruta estéril inoculada. Utilizou-se uma cepa de *Escherichia coli* isolada da água cinza bruta, e a mesma foi utilizada para inoculação na água cinza bruta estéril e água cinza bruta estéril acrescida de suplementação com fósforo, nitrogênio e glicose. As curvas foram traçadas com correlação entre o tempo (horas) e o número de células viáveis. Quanto a influência de nutrientes no crescimento/sobrevivência de *Escherichia coli* em água cinza bruta estéril temos que a suplementação com fósforo nas concentrações testadas não fez diferença significativa no crescimento da bactéria analisada. Por outro lado, quando a água cinza bruta estéril foi suplementada com diferentes concentrações de nitrogênio observou-se diferença no crescimento/sobrevivência da *Escherichia coli*. A amostra com suplementação de glicose apresentou maior crescimento da população de *Escherichia coli*, mesmo a dextrose não sendo uma fonte mais apropriada para suplementação da glicose, porém, esse aumento demonstra a enorme capacidade da *Escherichia coli* em absorver carbono do meio em que se encontra.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, reuso, água cinza, nutrientes

ABSTRACT

Gray water is defined as wastewater produced in showers, bathtubs, sinks, washing machines, sinks and tanks. Pathogens in gray water occur in less quantity than in domestic wastewater. However, gray water may have a high load of easily degradable organic compounds, which may favor the growth of enteric bacteria, such as fecal contamination indicators. The survival of fecal bacteria in aquatic environments depends on their ability to tolerate a number of biological stresses among them the availability of nutrients such as phosphorus and nitrogen being these nutrients biologically necessary for the survival of bacteria, such as *Escherichia coli*. The present work aims to evaluate the growth/survival of *Escherichia coli* in samples of gray water destined for reuse. The influence of nutrients (phosphorus, nitrogen and glucose) on the growth/survival of *Escherichia coli* in gray water was evaluated. Growth/survival curves were developed in raw gray water and sterile inoculated crude gray water. A strain of *Escherichia coli* isolated from crude gray water was used, and it was used for inoculation in sterile crude gray water and sterile crude gray water supplemented with phosphorus, nitrogen and glucose. The curves were plotted with correlation between the time (hours) and the number of viable cells. Regarding the influence of nutrients on the growth/survival of *Escherichia coli* in sterile crude gray water we have that the phosphorus supplementation at the concentrations tested did not make a significant difference in the growth of the bacteria analyzed. On the other hand, when sterile crude gray water was supplemented with different concentrations of nitrogen, a difference in growth/survival of *Escherichia coli* was observed. The glucose supplementation sample showed higher *Escherichia coli* population growth, even dextrose not being a more appropriate source for glucose supplementation, but this increase demonstrates the enormous capacity of *Escherichia coli* to absorb carbon from the environment in which it is found.

Key words: *Escherichia coli*, reuse, gray water, nutrients.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros para reuso de águas residuárias.....	7
Tabela 2: Classificação e respectivos valores dos parâmetros exigidos pela NBR 13969.....	8
Tabela 3: Parâmetros de qualidade de água de reuso apresentados na norma intitulada “Usos de Fontes Alternativas de Água Não Potável em Edificações e liberada para consulta pública pela ABNT em maio/2018 (texto provisório).....	9
Tabela 4: Composição geral da água cinza.....	12
Tabela 5: Valores de contaminação de <i>Eshcerichia coli</i> e coliformes totais.....	15
Tabela 6: Indicadores, infecção/finalidade e faixa encontrada de microrganismos presentes na água cinza.....	16
Tabela 7: Composição dos meios de cultura para bactérias com exigências nutricionais diferentes.....	19
Tabela 8: Definição de indicador e microrganismo índice e modelo.....	21
Tabela 9: Metodologias aplicadas para caracterização físico-química e microbiológica das amostras de água cinza. Parâmetros, unidade, número de amostra realizadas por análise (N), método e referências.....	27
Tabela 10: Resultados do monitoramento da qualidade da água cinza bruta. Dados estatísticos (média, desvio padrão, máximo e mínimo, número de análises realizadas para cada parâmetro (N) e correlação de alguns dados com base nos estudos já existentes.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Valores de DQO e DBO indicativos de tratabilidade de um efluente.....	13
Figura 2: Esquema da ETAC.....	26
Figura 3: Comportamento da <i>Escherichia coli</i> em água cinza bruta (A) água cinza bruta, (B) água cinza bruta acrescida de <i>Escherichia coli</i> isolada do meio.....	41
Figura 4: Comportamento da <i>Escherichia coli</i> isolada do meio. (A) Meio A1, (B) água cinza bruta estéril + Meio A1, (C) água cinza bruta estéril.....	44
Figura 5: Ensaio de avaliação de sobrevivência de <i>Escherichia coli</i> isolada do meio em água cinza bruta estéril com suplementação de nutrientes - (A) controle negativo.....	46
Figura 6: Ensaio de avaliação de sobrevivência de <i>Escherichia coli</i> isolada do meio em água cinza bruta estéril com suplementação de nutrientes (A) fósforo, (B) nitrogênio, (C) glicose.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
2.1	OBJETIVO GERAL.....	4
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1	FONTES ALTERNATIVAS DE ÁGUA	5
3.2	LEGISLAÇÃO DE REUSO DE ÁGUA.....	6
3.3	ÁGUA CINZA.....	10
3.3.1	Caracterização físico química da água cinza	11
3.3.2	Composição	12
3.3.3	Relação DQO/DBO	13
3.3.4	Fósforo e nitrogênio na água cinza	14
3.4	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA.....	15
3.4.1	Componentes	15
3.4.2	<i>Escherichia coli</i>	17
3.4.3	<i>Escherichia coli</i> e suplementação de nutrientes	18
3.4.4	Bioindicadores	20
3.5	RECRESCIMENTO.....	23
3.6	BACTÉRIAS VIÁVEIS, MAS NÃO CULTIVÁVEIS (VBNC).....	23
4	METODOLOGIA	25

4.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	25
4.2 SISTEMA DE TRATAMENTO.....	25
4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DA ÁGUA CINZA.....	26
4.4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DE ÁGUA CINZA BRUTA.....	27
4.4.1 Quantificação da <i>Escherichia coli</i>.....	27
4.4.2 Isolamento e confirmação da <i>Escherichia coli</i> isolada do meio.....	28
4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA CINZA BRUTA.....	28
4.5.1 Esterilização da água cinza bruta.....	28
4.5.2 Testes de sobrevivência.....	29
4.6 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> EM ÁGUA CINZA BRUTA.....	29
4.6.1 Meio A1 acrescido de <i>Escherichia coli</i> isolada do meio.....	29
4.6.2 Comportamento da <i>Escherichia coli</i> em água cinza bruta.....	30
4.6.3 Água cinza bruta acrescida de <i>Escherichia coli</i> isolada do meio.....	31
4.6.4 Água cinza bruta estéril acrescida de <i>Escherichia coli</i> isolada do meio.....	31
4.6.5 Água cinza bruta estéril + Meio A1 acrescido de <i>Escherichia coli</i> isolada do meio.....	32
4.7 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> EM ÁGUA CINZA BRUTA ESTÉRIL COM SUPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES.....	32
4.7.1 Controle negativo.....	33

4.7.2 Água cinza bruta estéril acrescida de <i>Escherichia coli</i> isolada do meio com suplementação de fósforo.....	33
4.7.3 Água cinza bruta estéril acrescida de <i>Escherichia coli</i> isolada do meio com suplementação de nitrogênio.....	34
4.7.4 Água cinza bruta estéril acrescida de <i>Escherichia coli</i> isolada do meio com suplementação de glicose.....	35
4.7.5 Água cinza bruta estéril acrescida de <i>Escherichia coli</i> isolada do meio com suplementação de fósforo e nitrogênio.....	36
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DA ÁGUA CINZA.....	38
5.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA.....	40
5.3 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> EM ÁGUA CINZA BRUTA.....	40
5.3.1 Comportamento da <i>Escherichia coli</i> isolada do meio em água cinza bruta.....	40
5.3.2 Comportamento da <i>Escherichia coli</i> isolada do meio em Meio A1 e em água cinza bruta estéril.....	43
5.4 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> EM ÁGUA CINZA BRUTA ESTÉRIL COM SUPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES.....	46
5.4.1 Água cinza bruta estéril acrescida de <i>Escherichia coli</i> isolada do meio com suplementação de nutrientes.....	46
5.4.2 Água cinza bruta estéril acrescida de <i>Escherichia coli</i> isolada do meio com suplementação de 0,2 g/L de fósforo e suplementação de 1,0 g/L de nitrogênio.....	53

6 CONCLUSÕES.....	56
7 RECOMENDAÇÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXOS/APÊNDICES.....	73

1. INTRODUÇÃO

O Fórum Econômico Mundial realizado em 2014 classificou a escassez de água como um dos três riscos sistêmicos globais de maior preocupação mundial (WEF, 2014). Essa escassez pode ser observada através do declínio dos lençóis freáticos, fluxos fluviais reduzidos, poluição das águas, além do custo cada vez maior no fornecimento e tratamento de água e os conflitos gerados por ela (WEF, 2014).

Os principais motivos da crescente demanda global por água são o aumento da população mundial, a melhoria dos padrões de vida, mudança nos padrões de consumo e a expansão da agricultura irrigada, entre outros (ERCIN e HOEKSTRA, 2014).

Uma das formas de se prevenir a escassez é a estimulação de uma gestão integrada do recurso água, para que ocorra o seu uso racional e o desenvolvimento de sistemas sustentáveis. Uma das ações de uso racional de água é a conservação de água nas edificações, podendo-se diminuir a demanda de água utilizada no abastecimento e, como consequência reduzir o volume de esgoto gerado.

Conforme estudos de Ferreira e Ghisi (2007) a reutilização de água cinza em uma residência pode gerar uma economia de 25 a 30% no consumo de água potável. Estudos afirmam que cerca de 41 a 91% do uso de toda água doméstica utilizada se transforme em água cinza dependendo do país (BOYJOO *et al.*, 2013). Água cinza é classificada como a parte não sanitária do escoamento de águas residuais domésticas provenientes do chuveiro, banheira, máquina de lavar, tanques, pias e lavabos, excluindo a água da pia da cozinha e sanitários. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2006), a composição e o volume de água cinza dependem diretamente do estilo de vida dos moradores, idade, tamanho das famílias, hábitos alimentares e de higiene. A qualidade da água cinza depende da fonte de abastecimento de água, do tipo de sistemas de distribuição de água e das atividades domésticas (ERIKSSON *et al.*, 2002). Boyjoo *et al.*, (2013) afirmam também que localização geográfica, infraestrutura disponível além dos hábitos causam variações de qualidade e quantidade da água cinza. Além disso a economia em sua reutilização é viável em uma escala nacional e doméstica (GROSS *et al.*, 2015). Porém, mesmo com todos seus benefícios a reutilização de água cinza traz riscos associados que não podem ser ignorados e que devem ser atenuados para a reutilização mais segura (MAIMON e GROSS, 2018).

Os desafios associados à reutilização de água cinza são geralmente divididos em riscos para a saúde, a partir dos microrganismos patogênicos e riscos ambientais devido à presença de poluentes como o sódio, pH, surfactantes e micro poluentes (MAIMON e GROSS, 2018). Os microrganismos patogênicos associados aos riscos microbianos na água cinza incluem a presença de patógenos originados de contaminação fecal, pele, muco e preparo de alimentos, como a *Escherichia coli*, Rotavírus, *Legionella ssp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* entre outros (MAIMON e GROSS, 2018). Essa contaminação geralmente resulta de atividades como lavagens de roupa contaminada fecalmente (fraldas, roupas íntimas), tomar banho e lavar as mãos após contato com superfícies potencialmente contaminada. Conforme Penn *et al.*, (2012), a maior produção de água cinza em uma residência ocorre durante a manhã e à noite. Devido a isso os sistemas de reuso de água cinza coletam e armazenam a água cinza bruta por várias horas, ou até mesmo dias, antes da mesma ser tratada e reutilizada (GROSS *et al.*, 2007). Birks e Hills (2007) afirmam que as temperaturas e as concentrações de poluentes, incluindo as cargas bacterianas, variam durante esse tempo, devido a diferentes fluxos de água cinza (quantidade de banho, quantidade de roupa sendo lavadas) além do volume que é introduzido no sistema. O mesmo estudo também afirma que os níveis de bactérias indicadoras fecais, incluindo *Escherichia coli*, enterococos e coliformes totais, aumentam após 7 horas de armazenamento. Outros estudos também comprovam a alteração na qualidade da água cinza devido ao tempo de armazenamento prolongado. March e Gual (2009) e Tal *et al.*, (2011) encontraram um aumento nos parâmetros oxigênio dissolvido, amônia, nitrogênio e sólidos suspensos após 24 e 48 horas de armazenamento. O armazenamento prolongado da água cinza pode alterar radicalmente a composição bacteriana da mesma, pois as baixas condições de oxigênio permitem o crescimento estável e a dominação de bactérias anaeróbias, comprovando que o armazenamento pode afetar a eficácia do tratamento (KEELY *et al.*, 2015).

Muito se sabe a respeito da *Escherichia coli* em condições laboratoriais, porém a sua ecologia em ambientes abertos ainda é bem desconhecida (JANG *et al.*, 2017). Devido ao seu uso como bactéria indicadora fecal (FIB) para avaliar a qualidade da água, sua sobrevivência e seu crescimento no ambiente levantam preocupações em relação a essa bactéria e o seu uso (JANG *et al.*, 2017).

Como *Escherichia coli* geralmente reside nos intestinos de animais de sangue quente, acreditava-se que ela não sobrevivesse bem fora do hospedeiro, pois seria incapaz de se replicar nos ambientes (WINFIELD e GROISMAN, 2003). Porém estudos de Ishii e Sadowsky (2008), mostraram que a *Escherichia coli* pode sobreviver longos períodos fora do trato intestinal e se reproduzir no solo, areia e sedimentos em climas tropicais, subtropicais e temperados.

Além das cepas comensais, a *Escherichia coli* inclui também as cepas patogênicas que podem causar uma grande variedade de doenças humanas (KAPER *et al.*, 2004). As cepas potencialmente patogênicas também possuem a capacidade de sobreviver e crescer em ambientes naturais (JANG *et al.*, 2017).

Conforme Rochelle-Newall *et al.*, (2015) o crescimento e sobrevivência da *Escherichia coli* em ambientes naturais são influenciados por fatores bióticos e abióticos. Fatores abióticos incluem temperatura, disponibilidade de água e nutrientes, pH e radiação solar, já os bióticos incluem a presença de outros microrganismos e a capacidade da *Escherichia coli* adquirir nutrientes. Com isso o presente trabalho pretendeu avaliar o comportamento da *Escherichia coli* na água cinza destinada ao reuso de um edifício residencial. Objetivou ainda monitorar o crescimento da *Escherichia coli* em amostras de água cinza bruta, estéril e com alterações nutricionais do meio.

2. OBJETIVOS

2.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta pesquisa é avaliar a sobrevivência de *Escherichia coli* em amostras de água cinza destinada ao reuso.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para tal, serão implementados os seguintes objetivos específicos:

- Quantificar a presença *Escherichia coli* em águas cinzas;
- Estabelecer os padrões de crescimento de *Escherichia coli* em água cinza;
- Avaliar a influência de nutrientes no crescimento/sobrevivência de *Escherichia coli* em água cinza.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FONTES ALTERNATIVAS DE ÁGUA

Conforme o Programa Mundial de Avaliação da Água (WWAP), a demanda de água deve crescer em todos os setores nos próximos anos (WWAP, 2015). Devido esse aumento, calcula-se uma escassez global de água de 40% até 2030 (WRG, 2009).

Tundisi (2008) a regulamentação do uso da água no Brasil se baseia na demanda e disponibilidade em corpos hídricos superficiais e subterrâneos.

Smith *et al.*, (2018) as fontes convencionais de água utilizadas em áreas urbanas são as águas superficiais de origem local e águas subterrâneas, em locais onde essas fontes já se encontram esgotadas, uma solução é utilizar fontes alternativas de água, como a dessalinização da água do mar, aproveitamento de água pluvial, reuso de água cinza e instalação de componentes economizadores de água (NBR 15527/07) . A prática de reuso de água tem sido muito utilizada atualmente com isso grandes volumes de água potável são poupados pelo reuso para atendimento das atividades menos nobres de uso de água (BENASSI, 2007).

Outro ponto favorável em se utilizar fontes alternativas de água é a economia gerada, dados da Agência Nacional de Água (ANA, 2012) mostram que o setor urbano consome 26% de toda água bruta do país, além disso, os vasos sanitários, em uma edificação residencial convencional, consomem 70% de toda água utilizada. Em uma pesquisa realizada pelo Conselho Brasileiro de Construção Sustentável (2012) apontam que ao se utilizar fontes alternativas de água em substituição a água potável pode se reduzir de 30 a 40% desse valor, diminuindo assim os impactos gerados no meio ambiente com o uso de água para fins não nobres. Além da economia, o reuso de água também traz redução da demanda de águas superficiais e subterrâneas, com isso o reuso eficiente de água garante uma economia para consumidores, empresas e sociedade (SANTOS, 1993).

Uma fonte alternativa de água muito utilizada é o reuso de água de chuva para fins não potáveis, estudos afirmam que pode se economizar até 15% do serviço de abastecimento público de água com o reuso de água de chuva para o uso residencial e comercial (TOMAZ, 2005).

No Brasil, na ilha de Fernando de Noronha, encontra-se instalado uma fonte de conservação de água mais antiga do país, empregando técnicas de captação e reaproveitamento de água de chuva (GUANAYEM, 2001).

O sistema de reaproveitamento de água chuva é muito utilizado em áreas de escassez de abastecimento, alto custo de exploração subterrânea e alto índice pluviométrico (SOARES, 1999). Consiste em um sistema que coleta a água da chuva pela cobertura da edificação, a mesma é transportada por condutores e armazenada em reservatórios específicos. Dependendo do seu uso final, a mesma deverá sofrer algum tipo de tratamento (VIANNA, 2017).

Uma outra forma de se poupar água é a utilização de componentes economizadores, também chamados de equipamentos ou dispositivos economizadores de água, que possuem a função de contribuir para a redução do consumo de água (NBR 15527/07). Outra fonte muito utilizada para reuso é a água cinza. Zhang *et al.*, (2009), realizaram uma comparação entre o uso de água de chuva e água cinza para redução da demanda de água potável em um edifício residencial. Foi constatado que a água cinza proporcionou uma fonte mais adequada, pois o seu suprimento é constante quando comparado a água da chuva.

3.2 LEGISLAÇÃO DE REUSO DE ÁGUA

É fundamental que existam leis e normas para o reuso de água cinza. Os países desenvolvidos possuem legislação mais avançada, já o Brasil tem estimulado o reuso e incentivado estudos nessa área. Além disso o estabelecimento de normas e regulamentação relacionadas a qualidade da água cinza é importante para minimizar os riscos para o usuário (COUTO *et al.*, 2015). Deve-se avaliar também critérios coerentes para que não sejam estabelecidos limites muito altos e a exigência de alta tecnologias de tratamentos, o que pode tornar o reuso mais difícil e encarecendo o sistema (COUTO *et al.*, 2015).

A ONU considera o reuso uma importante estratégia de conservação dos recursos hídricos (MONTE e ALBUQUERQUE, 2010). Flórida, Califórnia, OMS e Austrália possuem as legislações e recomendações mais conhecidas sobre os parâmetros para o reuso, porém, os valores são muito restritivos, fazendo com que ocorra uma dificuldade em se realizar essa prática (ALMEIDA, 2007). Na Tabela 1 encontram-se as principais recomendações para reuso de águas residuárias a nível mundial.

Tabela 1: Parâmetros para reuso de águas residuárias.

Instituição	Tipo de reuso	Diretrizes
OMS	Irrigação de parques públicos	Coliformes termotolerantes <1000/100 mL
USEPA	Reuso urbano	pH: entre 6 e 9 DBO: < 10 mg/L Turbidez: <2 NTU Coliformes termotolerantes: não detectáveis em 100 mL Cloro residual: ≥1 mg/L

Fonte: Adaptado USEPA – United States Environmental Protection Agency (2004), OMS (2000).

O “Guia para Reuso Seguro de Águas Residuais, excreta e Água Cinzas” da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006) é uma normatização que mais contribui para o reuso de água em todo o mundo, principalmente em países que não possuem normatização própria. Esse guia possui regulações, aspectos políticos, avaliação de risco no reuso entre outros aspectos.

O Brasil ainda carece de uma legislação voltada exclusivamente para o reuso. A Resolução do Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH) nº 54/05 (BRASIL, 2005), é a primeira a abordar sobre o reuso no Brasil. Ela estabelece modalidades, diretrizes e critérios gerais que regulamentam e estimulam a prática de reuso não potável de água.

A resolução adota algumas definições:

- Água residuária: esgoto, água descartada, efluentes líquidos de edificações, indústrias, agroindústrias e agropecuária, tratados ou não;
- Reuso de água: utilização de água residuária;
- Água de reuso: água residuária, que se encontra dentro dos padrões exigidos para sua utilização nas modalidades pretendidas;
- Reuso direto de água: uso planejado de água de reuso, conduzida ao local de utilização, sem lançamento ou diluição prévia em corpos hídricos superficiais ou subterrâneos;
- Produtor de água de reuso: pessoa física ou jurídica, de direito público ou privado, que produz água de reuso;
- Distribuidor de água de reuso: pessoa física ou jurídica, de direito público ou privado, que distribui água de reuso; e
- Usuário de água de reuso: pessoa física ou jurídica, de direito público ou privado, que utiliza água de reuso.

Além disso a resolução descreve quatro modalidades para prática de reuso direto não potável: para fins agrícolas, ambientais, indústrias e aquicultura.

A NBR 13969 (ABNT, 1997) trata dos “Tanques sépticos – Unidades de tratamento complementar e disposição final efluentes líquidos – Projeto, construção e operação”. É a primeira norma a abordar o tema reuso desde o tratamento até o treinamento dos operadores do sistema. Ela ainda indica os seus usos e a qualidade exigida de água não potável e sanitariamente segura. Para cada uso é destinado uma classificação da água e os valores dos parâmetros. A tabela 2 mostra a classificação, o destino e os valores dos parâmetros exigidos pela norma.

Tabela 2: Classificações e respectivos valores de parâmetros exigidos pela NBR 13969:

Parâmetro	Valores conforme a classe			
	Classe 1: Lavagem de carros e outros usos que requerem o contato direto do usuário com a água, com possível aspiração de aerossóis pelo operador incluindo chafarizes	Classe 2: Lavagens de pisos, calçadas e irrigação dos jardins, manutenção dos lagos e canais para fins paisagísticos, exceto chafarizes	Classe 3: Reuso nas descargas dos vasos sanitários:	Classe 4: Reuso nos pomares, cereais, forragens, pastagens para gados e outros cultivos através de escoamento superficial ou por sistema de irrigação pontual.
pH	Entre 6 e 8	-	-	-
Turbidez	< 5	< 5	< 10	-
Sólidos dissolvidos totais	< 200 mg/L	-	-	-
Cloro residual	Entre 0,5-1,5 mg/L	> 0,5 mg/l	-	-
Coliforme fecal	< 200 NMP/100 ml	< 500 NMP/ 100 ml	< 500 NMP/ 100 ml	< 5000 NMP/100ml
Oxigênio dissolvido	-	-	-	> 2 mg/l

Fonte: Norma ABNT 13.969 / 97.

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) criou a norma NBR 15527/07 “Aproveitamento de água de chuva para áreas urbanas e fins não potáveis”, estabelecendo limites máximos permitidos para aproveitamento de água de chuva e outras providências.

Devido ao aumento do interesse em reuso de água em edificações, e o uso de fontes alternativas de água (potável ou não potável), a ABNT divulgou os textos bases de duas normas a serem publicadas, atualmente em vias de consulta pública: “Norma de Conservação de Água em Edificações” e “Norma de Uso de Fontes Alternativas de Água Não Potável em Edificações” (ABNT/CB-02). Nesses documentos estão

inseridos terminologias, requisitos, procedimentos, diretrizes, projetos, gestão, execução, manutenção e operação de sistemas de aproveitamento e reuso de água em edificações no Brasil. A tabela 3 apresenta as novas diretrizes de qualidade de água de reuso para os usos propostos nesta norma.

Tabela 3: Parâmetros de qualidade de água de reuso apresentados na norma intitulada “Uso de Fontes Alternativas de Água Não Potável em Edificações” e liberada para consulta pública pela ABNT em março/2018 (texto provisório).

Parâmetros	Limites máximos permitidos*
ph	6,0 a 9,0
<i>Escherichia coli</i>	< 200NMP/100ml
Turbidez	≤ 5 NTU
DBO _{5,20}	≤ 20 mg O ₂ /L
CRL (cloro residual livre)	Mínimo de 0,5 mgCl ₂ /L e máximo de 2,0 mgCl ₂ /L
SDT ou condutividade elétrica	≤ 2000 mg/L ou 3200 µS/cm
Carbono Orgânico Total	< 4 mg/L

*Limites máximos permitidos para reuso em irrigação de jardins, lavagem de pisos e carros, descarga sanitária, uso ornamental, sistemas de resfriamento e arrefecimento de telhados.

Além disso o Ministério das Cidades e o Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura elaboraram o relatório técnico intitulado “Elaboração de proposta do plano de ação para instituir uma política de reuso e efluente sanitário tratado no Brasil – Produto IV – Avaliação do potencial de reuso (RP01C, 2017)”, contendo o levantamento nacional referentes às potencialidades de reuso de efluentes sanitários tratados no Brasil e a discussão sobre as questões institucionais relacionadas ao reuso de efluente sanitário tratado no Brasil. O objetivo principal desse relatório foi realizar o levantamento nacional referente às potencialidades do reuso de efluente sanitário tratado no Brasil, por região geográfica para diferentes modalidades de reuso, mostrando seus desafios técnicos e institucionais e destacando os impactos positivos e negativos. No ano de 2016 o mesmo relatório abordou o tema ““Elaboração de proposta do plano de ação para instituir uma política de reuso e efluente sanitário tratado no Brasil – Produto II – Experiências de reuso (RP01A, 2016)”, relatando levantamento e descrição de experiências nacionais e internacionais relevantes sobre o reuso de água.

3.3 ÁGUA CINZA

Água cinza pode ser definida como as águas residuárias sem contribuição de efluentes de bacias sanitárias, ou seja, são as água residuárias provenientes de chuveiros, lavatórios, banheiras, máquina de lavar, pias de cozinha e tanques (AL-GHEETHI *et al.*, 2016, NOUTSOPOULOS *et al.*, 2018) porém alguns autores não incluem o efluente oriundo de pia de cozinha por ser altamente poluído, com maior concentração de matéria orgânica em relação a outros efluentes domésticos (AL-JAYYOUSI, 2003; LAMINE *et al.*, 2007; ORON *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2015).

Para que essas fontes possam ser utilizadas faz-se necessário a segregação das águas residuárias produzidas e da água fornecida pela concessionária.

Devido sua baixa carga orgânica, a água cinza tem sido a mais utilizada para reuso (GIDEON *et al.*, 2008). Porém, para se reutilizar a água cinza deve-se cumprir quatro critérios principais de segurança, higiene, estética e tolerância ambiental (NOLDE, 2000). Além disso é necessário a utilização de ferramentas de avaliação de riscos para que seja estabelecida uma linha geral de padronização e avaliação das regulamentações existentes (VUPPALADADIYAM *et al.*, 2018)

Estudos da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 2006) mostram que, para cada 100 litros de água consumida, são produzidos 80 litros de esgoto doméstico no Brasil. Em média 24% do consumo de água potável em residências é consumida em descargas de sanitários, sendo que para esse fim, não é necessário potabilidade da água (BARRETO, 2008).

O reuso da água cinza inclui tanto o uso interno quanto o externo. O uso interno são as descargas de sanitários (TEH *et al.*, 2015), já o uso externo inclui irrigação de jardins e campos de golfe, lavagens de áreas comuns, lavagem de veículos, uso em extinção de incêndios, água de caldeira e manutenção de zonas úmidas (CHRISPIM e NOLASCO, 2017; COUTO *et al.*, 2015). Aproximadamente 40% da água consumida em uma residência são destinados a fins não potáveis, logo, com uma rede de abastecimento dupla, uma potável e outra de reuso, irá garantir a redução de consumo de água potável para fins não tão nobres (GONÇALVES, 2006).

Noutsopoulos *et al.*, (2018) mostram em seus estudos que uma pessoa produz em média, diariamente, 98 litros de água cinza, representando de 70-75% aproximadamente da produção total das águas residuárias domésticas.

Uma grande vantagem da utilização da água cinza para reuso em residência é que raramente sua demanda será interrompida devido falta de oferta. Conforme Zhu *et al.*, (2017) devido ao baixo nível de contaminação da água cinza em comparação a outras fontes alternativas de água, como o esgoto doméstico, por exemplo, e sua demanda contínua, o reuso de água cinza vem se tornando uma fonte ideal para esse fim.

Porém, mesmo com todas as vantagens do reuso de água cinza, a mesma quando não tratada corretamente, possui uma elevada concentração de compostos com efeitos potencialmente prejudiciais ao solo e meio ambiente (TRAVIS *et al.*, 2010). Seu uso por muito tempo também pode elevar a alcalinidade do solo, a condutividade elétrica e a taxa de adsorção do sódio (PINTO *et al.*, 2010), além disso, a água cinza possui uma grande quantidade de surfactantes e emulsificadores, com isso a exposição a longo prazo a água cinza não tratada pode reduzir a permeabilidade à água e capilaridade (VUPPALADADIYAN, 2018).

3.3.1 Caracterização físico química da água cinza

A água cinza devidamente tratada é considerada adequada para fins não potáveis, principalmente para descargas de sanitários (DONNER *et al.*, 2010) e irrigação (FINLEY *et al.*, 2009). A quantidade de água cinza pode variar de um local para outro. Números de habitantes na residência, idade, classe social são alguns dos fatores que influenciam na produção de água cinza. O volume produzido pelo lavatório e chuveiro consome 64% de água potável, produzindo um volume de 92,9 L/hab/dia de águas cinzas (GONÇALVES, 2009).

A maior parte do efluente produzido na água cinza é proveniente da máquina de lavar roupa, representando 35% de toda água cinza produzida em uma residência, esse efluente também é responsável por contribuir com a maior parcela de contaminantes como fósforo, nitrogênio amoniacal, matéria orgânica, proveniente dos detergentes (ERIKSSON *et al.*, 2002). Quando não há a utilização desse efluente as principais fontes de contaminação são os shampoos e produtos de higiene pessoal, além dos resíduos corporais como cabelo, pelos, óleos corporais e urina.

Diversos materiais sólidos podem ser encontrados na água cinza como partículas de terra, cabelo e fibras de roupas. No uso de sistemas de tratamento de águas cinzas deve-se verificar o risco de problemas relacionados a obstrução de tubulações.

3.3.2 Composição

A tabela 4 apresenta a composição geral da água cinza com os valores dos seus principais parâmetros.

Tabela 4: Composição geral da água cinza.

Parâmetro	Intervalo geral
pH	6-9
Turbidez (NTU)	20-440
Condutividade (mS/m)	1-700
Sólidos totais (mg/L)	520-2700
Sólidos suspensos totais (mg/L)	10-630
DBO (mg/L)	40-4450
DQO (mg/L)	60-1340
Fósforo total (mg/L)	1-50
Nitrogênio total (mg/L)	7-60
Coliformes totais (NMP)	$5,1 \times 10^6$
<i>Escherichia coli</i> (NMP)	$13-4 \times 10^6$

Fonte: adaptado de Vuppaladadiyam (2018).

As características físicas mais importantes a serem avaliadas na água cinza são temperatura, pH, cor, turbidez, sólidos totais dissolvidos e sólidos suspensos totais (BOYJOO *et al.*, 2013). O pH geralmente sofre influência das características gerais da água de abastecimento, geralmente encontra-se bem próximo da neutralidade, porém, o uso de produtos sanitários pode fazer com que ocorra alterações em seus valores (KNUPP, 2013). Temperaturas elevadas podem favorecer o crescimento microbiano. Já a turbidez e os sólidos suspensos mostram o teor de partículas, que na presença de detergentes, podem se solidificar, comprometendo o tratamento ou ainda causar obstrução das tubulações. Esses sólidos são originados de resíduos corporais e produto de higiene (WINWARD *et al.*, 2008b). Os parâmetros químicos mais importantes são a DBO₅, DQO, além de nutrientes como fósforo e nitrogênio (WINWARD *et al.*, 2008b). Porém esses parâmetros se modificam com o tempo, as características da água cinza fresca e da água cinza armazenada diferem em grandes quantidades (DIXON *et al.*, 1999).

A maior parte da DQO encontrada em água cinza é devido a produtos de limpeza e detergentes encontrados nas residências.

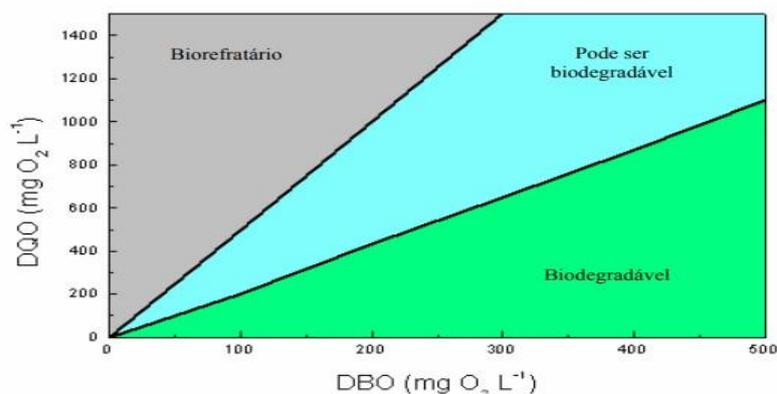
Os valores dos parâmetros são bem variados, DQO, turbidez, sólidos suspensos totais, NTK e coliformes totais variam de 180-650 mg/L, 15-240 NTU, 50-700 mg/L, 5-15 mg-N/L e 10^2 - 10^7 NMP/100 mL respectivamente (FRIEDLER, 2011).

Nutrientes como fósforo e nitrogênio são encontrados em quantidades menores na água cinza quando comparado com o esgoto sanitário. Esse fato pode ser explicado devido à baixa concentração de urina humana encontrada na água cinza, além de vários produtos terem reduzidos a quantidade desses nutrientes em sua composição (KNUPP, 2013).

3.3.3 Relação DBO/DQO

A qualidade do tratamento de um efluente é avaliada pelo parâmetro Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO_5), quanto maior esse parâmetro, maior a variabilidade dos compostos orgânicos presentes nesse efluente, já a presença dessa mesma carga orgânica é medida pelo parâmetro Demanda Química de Oxigênio (DQO), devido a oxidação drástica da matéria orgânica (JARDIM e CANELA, 2004). A figura 1 mostra a relação DQO/DBO e os indicativos de tratabilidade de um efluente.

Figura 1: Valores de DQO e DBO indicativos de tratabilidade de um efluente:



Fonte: Jardim e Canela (2004).

A figura 1 mostra que em um dado efluente quando a relação $DQO/DBO < 2,5$ o mesmo é biodegradável, quando essa relação está na faixa $5,0 < DQO/DBO < 2,5$ deve-se submeter este efluente a um tratamento biológico para remoção da carga orgânica, já em uma relação $DQO/DBO > 5,0$ o processo biológico já não terá muita eficiência, deve-se empregar a oxidação química como um processo alternativo (JARDIM e CANELA, 2004).

Para águas residuais de origem doméstica, as relações entre DQO/DBO variam de 1,7 a 2,4. Em um tratamento biológico a tendência é essa relação aumentar, devido à redução da fração biodegradável (VON SPERLING, 1996).

3.3.4 Fósforo e nitrogênio na água cinza

Do volume total de água cinza produzida, a contribuição de nutrientes varia de 9 a 14% de nitrogênio, 20 a 32% de fósforo e 29 a 62% de matéria orgânica (KUJAWA-ROELEVELD e ZEEMAN, 2006).

Fósforo (P) e nitrogênio (N) são nutrientes biologicamente necessários para o crescimento/sobrevivência de bactérias (KIRCHMAN *et al.*, 1994).

Kirchman *et al.*, (1994), afirmam que bactérias naturais possuem uma necessidade maior de fósforo ao nitrogênio, estudos realizados demonstram que bactérias não fecais mostraram estimulação a partir de adição de fósforo, o mesmo não ocorreu com adições de nitrogênio (CHRZANOWSKI *et al.*, 1995; SUNDARESHWAR *et al.*, 2003). Toothman *et al.*, (2009) afirmam que as bactérias fecais em sedimentos de riachos geralmente não são limitadas por fósforo ou nitrogênio, mas em áreas onde as concentrações de fósforo do sedimento são baixas, as adições experimentais de fósforo estimulam significativamente as abundâncias bacterianas fecais. Embora as bactérias coliformes fecais não sejam muito bem adaptadas para a vida aquática, as adições de nutrientes podem aumentar a chance de sobrevivência e prolongar seu tempo de sobrevivência (MURR *et al.*, 1995).

Além disso Johannes (1964) e Pomeroy (1970) apontaram que “as bactérias aeróbicas tendem a absorver todo o fósforo disponível” esboçando assim o papel das bactérias contra os protozoários na remineralização.

Estudos indicam que a absorção de NO_3^- pelas bactérias heterotróficas é geralmente baixa, o que é esperado, dado o alto custo energético de reduzir o NO_3^- ao estado de oxidação do nitrogênio nos aminoácidos. Consistente com baixa absorção de NO_3^- por bactérias é a hipótese de que as taxas de crescimento bacteriano são limitadas pela energia, não necessariamente apenas pelo carbono em pelo menos águas oceânicas.

3.4 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA

3.4.1 Componentes

A quantidade de patógenos na água cinza é menor do que nas águas residuárias domésticas. A presença desses patógenos pode ter origem de três fontes diferentes: contaminação fecal, patógenos oportunistas (derivados do nariz e da boca) e manejo inadequado de alimentos (BIRKS e HILLS, 2007). A contaminação fecal da água cinza é resultado de atividades como lavagem de roupas contaminadas fecalmente, lavagem de mãos após contato com alguma superfície contaminadas (GILBOA e FRIEDLER, 2008). Essa contaminação é estimada através da concentração de *Escherichia coli*, que pode variar de não-detectável até 10^9 NMP/100mL. A tabela 5 apresenta a variação da contaminação por coliformes totais e *Escherichia coli* encontrados em diversos estudos.

Tabela 5: Valores de contaminação de *Escherichia coli* e coliformes totais:

Autor	Coliformes totais (NMP/100 mL)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/100mL)
Valentina, 2009	$5,21 \times 10^0$	$4,36 \times 10^3$
Vaz, 2009	$4,24 \times 10^0$	$4,36 \times 10^3$
Gonçalves, Simões e Wanke, 2010	$5,21 \times 10^0$	$4,36 \times 10^3$
Mandal et. al., 2011	$3,72 \times 10^4$	$3,74 \times 10^4$
Knupp, 2013	$8,5 \times 10^2$	$2,2 \times 10^4$
Katukiza et. al., 2015	$3,6 \times 10^8$	$8,5 \times 10^9$
Leong, Chong e Poh, 2018	$1,9 \times 10^5$	$3,3 \times 10^6$

Fonte: próprio autor

Além disso a água cinza também pode conter patógenos oportunistas da pele e do muco como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* nas concentrações de 10^2 e 10^5 UFC/mL, respectivamente (GILBOA e FRIEDLER, 2008). Vários estudos mostram a presença de uma grande variedade de microrganismos presentes na água cinza. A tabela 6 apresenta a concentração de alguns microrganismos encontrados na água cinza.

Tabela 6 – Indicadores, infecção/finalidade e faixa encontrada de microrganismos presentes na água cinza.

Indicador	Infecção/finalidade	Faixa encontrada	Autor
Coliformes totais	Indicador de contaminação bacteriana	$2.4 \times 10^3 - 10^8$	Leonard <i>et al.</i> , 2016
Indicador <i>Escherichia coli</i>	Indicador de contaminação fecal	$10^0 - 10^8$	Birks e Hills, 2007; Friedler <i>et al.</i> , 2006; Gilboa e Friedler, 2008; Jong <i>et al.</i> , 2010
Enterococos fecais	Indicador de contaminação fecal; certas espécies causam infecções do trato urinário, bacteremia, endocardite, meningite, infecções de feridas	$10^0 - 10^5$	Birks e Hills, 2007; Ottoson e Stenstrom, 2003; Winward <i>et al.</i> , 2008a
<i>Escherichia coli</i> patogênica	Diarreia	Presente	O'Toole <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pele, pulmão, olho e infecções do trato urinário	$10^1 - 10^4$	Benami <i>et al.</i> , 2016; Casanova <i>et al.</i> , 2001; Gilboa e Friedler, 2008; Winward <i>et al.</i> , 2008a
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infecções cutâneas	$10^1 - 10^3$	Gilboa e Friedler, 2008; Jong <i>et al.</i> , 2010; Winward <i>et al.</i> , 2008a
<i>Salmonella spp.</i>	Algumas espécies causam salmonelose, bacteremia, gastroenterite, febre entérica	$0 - 10^6$	Benami <i>et al.</i> , 2016; Birks e Hills, 2007; Jong <i>et al.</i> , 2010; Katukiza <i>et al.</i> , 2015; Kotut <i>et al.</i> , 2011; Winward <i>et al.</i> , 2008a
<i>Legionella spp.</i>	Doença respiratória	$0 - 10^1$	Birks <i>et al.</i> , 2004; Blanky <i>et al.</i> , 2015

Fonte: Adaptado de Benami, 2016.

Conforme Zancheta (2007), a urina humana é totalmente estéril na bexiga, porém ao ser eliminada ocorre o arraste de várias bactérias, fazendo com que ocorra a contaminação da mesma, com isso é recomendável separar a urina da água do banheiro para evitar contaminação de patógenos como *Salmonella typhi*, *Schistosoma haematobium* e *Leptospira* na água cinza (ERIKSSON *et al.*, 2009).

Um estudo realizado por Zimmerman (2014), avaliou amostras de água cinza de pré-lavagem e amostras de lavagem final de roupas, identificou a presença de microrganismo como *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter*, *Propionibacterium* e *Paracoccus*, representando 46% dos totais da leitura do estudo (foram realizadas 268,672 leituras), além disso foram encontrados também *Vibrio* (46% das leituras) na água cinza do primeiro enxague e na água cinza da lavagem final (40% das leituras).

Alguns estudos ainda relatam a existência de patógenos protozoários (*Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*) em água cinza já tratada (AJONINA *et al.*, 2015; GENNACCARO *et al.*, 2003).

O'toole *et al.*, (2012) também comprovou a presença de norovírus e rotavírus em água cinza. Devido sua resistência a desinfecção convencional, os vírus patogênicos podem sobreviver por um período prolongado sob baixas temperaturas e grande faixa de pH (FONG e LIPP, 2005).

Com isso surge a importância de uma desinfecção de qualidade, para que sejam mantidas a qualidade da água cinza.

3.4.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma enterobactéria, e está incluída no grupo coliforme, possui forma de bastonete, não esporulada e fermentadora de lactose, produz ácido e gás em período de incubação de 24 a 48 horas entre 35 a 37°C (WINFIELD e GROISMAN *et al.*, 2003; TING *et al.*, 2013). É classificada como um coliforme termotolerante, possuindo capacidade de fermentar a lactose ente 44 a 45°C, capacidade essa que a distingue de outros coliformes e enterobactérias (ROMPRÉ *et al.*, 2002). Possui cerca de 2 µm de comprimento de 0,5 µm de diâmetro, com volume celular de 0,6 – 0,7 µm (KUBITSCHEK, 1990). Existem várias razões para a escolha desse grupo de bactérias como indicadores de contaminação da água, entre elas, é que as mesmas estão presentes nas fezes de animais de sangue quente, inclusive seres humanos, sua presença na água possui uma relação direta com o grau de contaminação fecal e são facilmente detectáveis e quantificáveis por técnicas simples e economicamente viáveis, em qualquer tipo de água (FUNASA, 2006).

São organismos indicadores utilizados para indicar a ocorrência de contaminação fecal direta ou indireta (ABDOLLAHZADEH, 2014; EL-BAKRY, 2104), porém, a ausência desses indicadores não garante que patógenos, dentre eles, bactérias, esporos de fungos, ovos de helmintos, cistos/ocistos de protozoários e vírus não estejam presentes (IGNOTO, 2010).

A maioria das cepas de *Escherichia coli* são inofensivas, porém, alguns sovars, como o sorotipo O157:H7, apresentam potencial patogênico, sendo capazes de causar infecções intestinais (EL-BAKRY, 2104). A dose infectante considerada para adultos é de 10⁵ a 10⁸ UFC/g, porém, essa dose varia de acordo com o estado imune, idade

do indivíduo exposto, bem como a patogenicidade específica da cepa ingerida (ABDOLLAHZADEH, 2014). As infecções causadas por *Escherichia coli* são caracterizadas por diarreia aquosa, náuseas, vômitos, cólicas abdominais e febre baixa ou ausente (MELO, 2015).

O crescimento e sobrevivência de *Escherichia coli* são dependentes de uma série de parâmetros ambientais intrínsecos e extrínsecos. Parâmetros intrínsecos podem ser definidos como o pH, atividade de água (*aw*), e o tipo/teor de nutrientes. Enquanto, os parâmetros extrínsecos são aqueles relacionados com o ambiente de armazenamento, como a atmosfera, a temperatura, a umidade, entre outros (KOCHARUNCHITT, 2012). *Escherichia coli* por ser uma bactéria mesófila cresce a temperaturas entre 20° C e 45° C, apresentando um crescimento ótimo entre 30° C e 40° C, porém, pode crescer e sobreviver a temperaturas elevadas e temperaturas mais baixas em comparação com outras bactérias mesófilas, como demonstra um estudo efetuado por Murata *et al.* (2011). Sendo assim, *Escherichia coli* é capaz de manter um crescimento equilibrado de 8° C a 49° C com um valor ótimo de crescimento nos 37° C. A taxa de crescimento fica mais lenta a temperaturas acima de 40° C ou a temperaturas abaixo de 20 ° C (JAY, 2000).

Estudos de Barrett *et al.*, (1997), demonstram que em alimentos os métodos tradicionais utilizados para isolar *Escherichia coli* não foram eficientes para isolar cepas patogênicas, pois, elas diferem consideravelmente das *Escherichia coli* não patogênicas nos padrões de crescimento. Normalmente as cepas patogênicas apresentam crescimento tardio (44° a 45,5°C), principalmente se presentes em baixas concentrações (GRIFFIN, 1991).

Na água cinza a concentração de *Escherichia coli* pode variar consideravelmente, pois quanto mais fontes de água cinzas coletadas na edificação, maior será a contribuição dos usuários do sistema. Devido à grande quantidade de compostos orgânicos facilmente degradáveis presentes na água cinza, o crescimento de bactérias, como os de indicadores fecais pode ser favorecido (VAZ, 2009). Devido a isso imediatamente após a desinfecção elas devem estar ausentes, pois a sua presença indica um tratamento inadequado (APDA, 2012; APHA, 2005).

3.4.3 *Escherichia coli* e suplementação de nutrientes

Os mecanismos pelos quais a *Escherichia coli* é capaz de persistir na água doce não são claros. A sobrevivência de bactérias fecais em ambientes aquáticos depende de sua capacidade de tolerar uma série de estresses biológicos, físicos e químicos. Estes incluem a influência da temperatura, radiação UV, predação e disponibilidade de nutrientes (FLINT, 1987)

Fósforo (P) e nitrogênio (N) são nutrientes biologicamente necessários para a sobrevivência de bactérias, como a *Escherichia coli* (KIRCHMAN *et al.*, 1994).

As atividades humanas têm cada vez mais aumentado a disponibilidade de nitrogênio e fósforo (VITOUSEK *et al.*, 1997; BENNETT *et al.*, 2001), essas mudanças nas cargas dos nutrientes nos ecossistemas afetam as transformações do carbono e nutrientes (SUNDARESHWAR, 2003).

Carbono também é um elemento essencial para a sobrevivência bacteriana, mais de 50% da biomassa celular é constituída por carbono ou nitrogênio, que são essenciais para a produção de proteínas, RNA e DNA (TAYMAZ-NIKEREL *et al.*, 2010)

Para que ocorra o crescimento microbiano deve-se encontrar um meio que forneça os nutrientes necessários, como carbono, nitrogênio, fósforo entre outros (TORTORA, 2012). A *Escherichia coli* é um microrganismo que necessita de um meio quimicamente definido, ou seja, um meio cuja composição exata é conhecida, contendo fatores de crescimento orgânicos que serviram de fonte de carbono e energia (TORTOTA, 2012). A tabela 7 mostra a composição de meios de cultura para bactérias com exigências nutricionais diferentes.

Tabela 7: Composição dos meios de cultura para bactérias com exigências nutricionais diferentes:

Nutrientes	<i>Leuconostoc mesenteroices</i>	<i>Escherichia coli</i>
Glicose	10 g	10 g
K ₂ HPO ₄	2 g	7 g
KH ₂ PO ₄	2 g	2 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	50 mg	-
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,05 mg	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g	0,1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	1 g
Citrato de amônio	2 g	-
Acetato de sódio	2 g	-
Aminoácidos ⁽¹⁾	100-800 mg	-
Purinas e pirimidinas ⁽²⁾	5 mg (cada)	-
Vitaminas ⁽³⁾	1 – 5 mg	-
Microelementos	Sim	Sim
Água destilada	1000 mL	1000 mL

(1) Ala, Arg, Asp, Cys, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val.

(2) Adenina, guanina, uracila, xantina.

(3) Biotina, folato, ácido nicotínico, piridoxal, riboflavina, pantotento, p-aminobenzoato.

Fonte: Trabulsi, 1999.

Conforme a tabela 7 observa-se que a exigência nutricional varia para cada microrganismo. Baseado nesses dados e nas exigências necessárias para o crescimento de *Escherichia coli*, além da quantidade de nutrientes disponível na amostra de água cinza bruta avaliada nesse estudo, foi-se definido dois valores dos nutrientes avaliados nesse estudo.

Estudos indicam que a absorção de NO_3^- pelas bactérias heterotróficas é geralmente baixa, o que é esperado, dado o alto custo energético de reduzir o NO_3^- ao estado de oxidação do nitrogênio nos aminoácidos. Consistente com baixa absorção de NO_3^- por bactérias é a hipótese de que as taxas de crescimento bacteriano são limitadas pela energia, não necessariamente apenas pelo carbono em pelo menos águas oceânicas.

3.4.4 Bioindicadores

Existem dois ambientes distintos onde a *Escherichia coli* pode ser encontrada, o ambiente primário que é o intestino grosso (cólon) de animais de sangue quente, e o ambiente secundário que é representada pela água e solo (SAVAGEAU, 1983).

O crescimento/sobrevivência da *Escherichia coli* em seu ambiente primário, que é rico em nutrientes, tem sido estudada constantemente (BETTELHEIM, 1992), porém, estudos no seu ambiente secundário, que prevalecem baixas concentrações de nutrientes, ainda carecem de informações sobre o comportamento da *Escherichia coli* nesse ambiente (VITAL *et al.*, 2008). Alguns estudos afirmam que o comportamento da *Escherichia coli* em ambientes aquáticos naturais, a mesma não era capaz de se multiplicar nessas condições de baixa concentração de nutrientes (GAUTHIER *et al.*, 1987; BOGOSIAN *et al.*, 1996; BANNING *et al.*, 2002; RAVVA e KORN, 2007).

Com isso, sempre associou que a bactéria só poderia crescer em seu habitat primário e, uma vez descartada na água, a *Escherichia coli* entraria em estado de inanição seguida de morte devido a múltiplos estresses ambientais (MORITA, 1997). A partir dessa visão, que já está estabelecida há mais de 100 anos (SCHARDINGER, 1982) e continuamente apoiado por experimentos de laboratório ao longo do tempo, resultou na implementação de *Escherichia coli* como um parâmetro índice para a poluição fecal para o monitoramento da qualidade da água potável (OMS, 1996).

Poucos estudos exploraram as propriedades de crescimento da *Escherichia coli* em meios sintéticos em baixas concentrações de nutrientes (WANNER e EGLI, 1990; CAMPER *et al.*; 1991). Esses estudos mostraram que a *Escherichia coli* é capaz de

crescer em níveis reduzidos de nutrientes, porém o estudo do crescimento da *Escherichia coli* em água natural ainda não foi caracterizado em detalhe.

Os microrganismos indicadores fecais são usados apenas para sugerir a presença de patógenos, porém, eles também podem assinalar boas práticas ou falhas no processo de fabricação e armazenamento de um alimento (TORTORELLO, 2003; ODKOR e AMPOFO, 2013).

Conforme ICMSF (2000), microrganismos indicadores fecais são bactérias de qualquer grupo taxonômico, fisiológico ou ecológico, utilizados para indicar a qualidade, estado de higiene e segurança em alimentos, água ou ambiente.

A escolha do indicador deve ser avaliada através de fatores intrínsecos e extrínsecos, além de fatores químicos e físicos e o processo e condições de armazenamento do produto (ICMSF, 2000).

Devido à dificuldade em se escolher o melhor indicador e distinguir as diferenças de funções dos indicadores, Odonkor e Ampofo (2013), sugeriram a divisão dos microrganismos indicadores em três grupos apresentados na tabela 8.

Tabela 8: Definição de indicador e microrganismo índice e modelo:

Grupo	Definição
Indicador de processo	Grupo de microrganismo que demonstra a eficácia de um processo.
Indicador fecal	Grupo de microrganismo que indica a presença de contaminação fecal. Exemplo: <i>Escherichia coli</i> . Indicam a possibilidade de possíveis patógenos estarem presentes.
Microrganismo índice e modelo	Grupo/ou espécie que indicam a presença e o comportamento patogênico. Exemplo: <i>Escherichia coli</i> como índice para <i>Salmonella</i> . Podem prever a degradação alimentar em estudos de vida útil de prateleira.

Fonte: Odonkor e Ampofo, 2013.

Os microrganismos indicadores utilizados para garantir a qualidade da água, devem garantir a qualidade da mesma, ou seja, garantir que a água pode ser consumida com risco mínimo pela população, quando o indicador não estiver presente (DANIEL, 2001). Porém, a escolha desse microrganismo indicador é complicada, pois, o mesmo, segundo Feachem (1983) deve apresentar as seguintes características:

- Devem ser membro da microbiota intestinal dos indivíduos sadios;
- Devem habitar exclusivamente o intestino e conseqüentemente ser de origem exclusivamente fecal quando encontrado no ambiente aquático;

- Devem ser exclusivamente de origem humana (não satisfeito por qualquer bactéria indicadora atualmente em uso);
- Devem estar presentes sempre que patogênicos de origem fecal estiverem presentes;
- Devem estar presentes em maior número do que os patogênicos fecais;
- Devem ser incapazes de crescer em ambiente externo ao intestino e apresentar taxa de inativação inferior aos patogênicos de origem fecal;
- Devem ser resistentes aos fatores antagônicos naturais e aos processos de tratamento de águas e esgotos em grau igual ou maior do que os patogênicos de origem fecal;
- Devem ser fáceis de serem detectados e contados;
- Não devem ser patogênicos.

Com isso é necessário definir qual uso será feito da água, para assim escolher o melhor microrganismo indicador.

Atualmente a *Escherichia coli* é considerada o melhor indicador de contaminação fecal dentre os do grupo coliformes (ICMSF, 2000).

A utilização de *Escherichia coli* como um indicador de contaminação fecal foi sugerida por Shardingier em 1892 (Jay et al., 2005), pois ela se encontra disseminada em fezes e geralmente não pode ser encontrada com outros habitats.

Para avaliar a qualidade da água utiliza-se as bactérias indicadoras fecais (FIB), para determinar a presença potencial de vírus entéricos, bactérias e patógenos de protozoários que podem estar relacionados a contaminação fecal (USEPA, 2012).

Na água cinza, devido a diferença de contaminação em cada fonte, determinar a sua contaminação microbiológica pode se tornar uma tarefa bem complicada (BIRKS e HILLS, 2007). Um estudo realizado por Zimmerman et al., (2014), identificou bactérias relacionadas a pele como *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium* como principais grupos microbianos presentes na água cinza estudada, além disso, após análise de qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa) observaram que as amostra analisadas o *Staphylococcus ssp.* apresentava uma média de 3 a 5 ordens de magnitude maior que os marcadores de fontes fecais, entre eles a *Escherichia coli*. Além disso, devido ao contato direto da roupa com a pele humana, o *Staphylococcus aureus* pode estar presente na água cinza em concentrações até 5×10^5 CFU/100mL (GILBOA e FRIEDLER, 2008). Assim, na água cinza, *Staphylococcus aureus*, patógenos entéricos e FIB podem estar presentes em concentrações variadas

(OTTOSSON e STENSTROM, 2003). Com isso surge a necessidade de se avaliar o uso da *Escherichia coli* como indicador de contaminação em água cinza utilizada para reuso.

3.5 RECRESIMENTO

Uma forma de prevenir o recrescimento de microrganismo em efluentes é a utilização de cloro no processo de desinfecção (DANIEL, 2001). O cloro possui a capacidade de inativar os microrganismos patogênicos, incluindo bactérias e vírus (SHUVAL, 1973). Porém vários estudos recentes relataram o recrescimento de bactérias nos sistemas de distribuição de água (DE LUCA *et al.*, 2013; RYU *et al.*, 2005; THAYANUKUL *et al.*, 2013). Estudos de Al-Jayyousi (2003) demonstram um aumento no número de contagem de coliformes totais em água cinza armazenada, $10^0/100\text{mL}$ para $10^5/100\text{mL}$. Dixon *et al.* (1999) apud Al-Gheethi (2015) apresentaram o aumento de 2 logNMP/100 L de coliformes totais após 24 horas de armazenamento.

Uma das razões apresentadas por TAL *et al.*, (2011) para o recrescimento bacteriano em água cinzas cloradas é a possível reatividade do cloro com outros nutrientes e com a matéria orgânicas, que podem acelerar o decaimento do cloro. Outros autores afirmam também a resistência microbiana a materiais de reação química e radiação ionizada (DUNGENI *et al.*, 2010; AL-GHEETHI *et al.*, 2016).

Algumas bactérias, entre elas a *Escherichia coli*, *Enterococcus* e *Salmonella* podem apresentar um estado viável, mas não cultivável (VBNC) durante o processo de tratamento de desinfecção de água residuárias, tanto desinfecção por cloro, ozônio e UV (BJERGBAEK e ROSLEV, 2005; TREVORS, 2011). Esse fenômeno permite que as bactérias nos efluentes tratados podem entrar nos sistemas de distribuição de água servindo para que ocorra o recrescimento, o que trará riscos potenciais a saúde quando a água tratada for usada, logo, deve-se monitorar não só as bactérias cultiváveis, mas também as bactérias VBNC em efluentes tratados e nos pontos de água recuperada.

3.6 BACTÉRIAS VIÁVEIS, MAS NÃO CULTIVÁVEIS (VBNC).

Algumas bactérias podem não ser detectadas nos meios de análises convencionais, pois elas não são capazes de produzir um crescimento visível em meios de cultura

bacteriológicas convencionais (PINTO *et al.*, 2011). Apesar disso elas mantêm suas funções celulares como respiração (OLIVER e BOCKIAN, 1995), transcrição (LLEÒ *et al.*, 2000), síntese de proteínas (RAHMAN *et al.*, 1994), entre outros.

A VNBC torna-se uma estratégia adaptativa de bactérias não esporuladas em condições adversas, logo, as bactérias no estado VNBC tendem a deixar esse estado e voltar a ser cultiváveis quando o meio for propício ao seu crescimento (PINTO *et al.*, 2011). Essa transição do estado VBNC para um estado cultivável é chamado de ressuscitação.

A indução do estado VBNC em *Escherichia coli*, já foi relatada sob baixo pH (ZHAO e MATTHEWS, 2000), radiação UV em combinação com alta salinidade (POMMEPUY *et al.*, 1996) baixa condições de nutrientes (condições de fome) (SMITH *et al.*, 1994), baixa disponibilidade de água (ARTZ *et al.*, 2006), alta salinidade (ROTH *et al.*, 1988) e altas concentrações de cobre (GRAY e STECK, 2001).

Estudos mostram ainda que muitos desinfetantes utilizados para erradicar bactérias patogênicas na água potável são indutores do estado VBNC. Zhang *et al.*, (2015) afirmam que a desinfecção UV poderia induzir *Escherichia coli* e *P. aeruginosa* ao estado VBNC, já Liu *et al.*, (2009) induziram células de *Escherichia coli* O157:H7 cultiváveis em um estado VBNC com água da torneira clorada.

4 METODOLOGIA

4.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no período de janeiro a setembro de 2018. As coletas de água cinza foram realizadas em um edifício residencial de alto padrão onde se encontra construída a Estação de Tratamento de Água Cinza (ETAC) e o sistema de reuso. As análises foram realizadas no LABSAN – UFES. Foi realizada a caracterização qualitativa (físico-química e biológica) das águas cinza produzida.

O edifício é uma construção habitacional de alto padrão, localizado no Bairro Barro Vermelho em Vitória, Espírito Santo. A habitação deste prédio iniciou-se em agosto de 2007, é do tipo residencial multifamiliar, com dois apartamentos por andar. A edificação é constituída por 20 pavimentos, sendo: 1 térreo, 1 pavimento técnico, 2 pavimentos de garagem, 15 pavimentos de apartamentos e 1 cobertura, totalizando 8.427,03 m² de área de construção.

4.2 SISTEMA DE TRATAMENTO

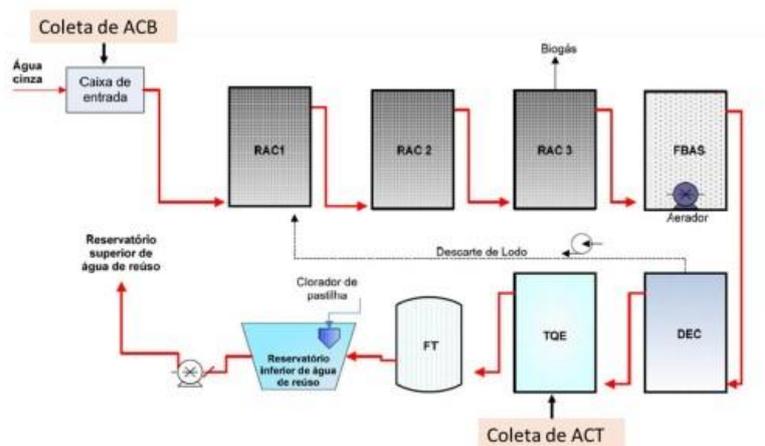
A estação de tratamento de água cinza (ETAC) localiza-se no pavimento técnico (correspondente ao primeiro pavimento) ocupando uma área total de 27m². Cada apartamento possui 147,51 m² sendo constituído por 4 quartos, 3 banheiros, 1 lavabo, 1 sala, área de serviço, cozinha, dependência, circulação e 3 varandas. O edifício foi construído com sistema hidro sanitário compreendendo a segregação das águas residuárias. As águas cinzas (provenientes do chuveiro, tanques e lavabos) são conduzidas a tratamento diferenciado por tubulações distintas, enquanto o restante das águas residuárias é descartada na rede coletora de esgoto. Atualmente não se coleta mais água da máquina de lavar roupa para produção de água cinza, devido à grande quantidade de espuma produzida pela mesma.

O edifício conta com uma rede dupla de abastecimento, sendo uma de água potável, destinada a atender a lavatórios, chuveiros, tanque, máquina de lavar roupa e pia de cozinha, e outra de água de reuso, que abastece as bacias sanitárias. A água de reuso também é utilizada para limpeza das áreas comuns do edifício (área de lazer, garagens e escadas) além da rega de jardins.

A ETAC é composta por um Reator Anaeróbico Compartimentado (RAC) de três câmaras (RAC1, RAC2 e RAC3), um Filtro Biológico Aerado Submerso (FABS), um Decantador (DEC), um Tanque de Equalização de Vazão (TQE), um Filtro Terciário (FT) e um reservatório inferior de água de reuso com Cloração (CLOR) (Fig 2).

A água cinza entra pela parte superior do primeiro compartimento do RAC e é encaminhada por meio de tubulação vertical até 10 cm do fundo, de onde segue em fluxo ascendente até a parte superior da segunda câmara. O efluente segue para as demais câmaras da mesma forma. A vazão de alimentação varia de acordo com os usos dos lavatórios e chuveiros dentro do edifício, com uma vazão média de 12m³/dia e a população atendida média é de 70 pessoas/dia.

Figura 2: Esquema da ETAC:



Fonte: Valentina, 2009

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DA ÁGUA CINZA

Para a caracterização físico-química da água cinza produzida pela ETAC foram realizadas coletas que se iniciaram em janeiro de 2018. Foram realizadas coletas simples semanais no seguinte ponto:

1) Na caixa de entrada da ETAC – ACB (água cinza bruta), logo após a passagem da água cinza pelo gradeamento presente dentro da caixa de entrada;

As amostragens seguiram o procedimento recomendado pelo Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (CETESB, 2012) (vide Anexo A).

As técnicas utilizadas para análise dos parâmetros seguiram o disposto no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater – 21ª edição (APHA, 2005) (tabela 9).

Tabela 9: Metodologias aplicadas para caracterização físico-química e microbiológica das amostras de água cinza. Parâmetros, unidade, número de amostras realizadas por análise (N), métodos e referências.

Parâmetro	Unidade	N	Método
Cloro livre	mg/L	8	DPD- Standard Methods 4500 -CL F
Turbidez	NTU	11	Nefelométrico – Standard Methods 2130 B
pH	-	11	pHmetro – Standard Methods 4500 – H ⁺ B.
Oxigênio Dissolvido	mg/l	11	Eletrodo de membrana – Standard Methods 4500 O G
Condutividade	mS/cm	11	Eletrométrico – Standard Methods 2510 B
NTK (Nitrogênio Total Kjeldhal)	mg/L	9	Macro Kjeldhal – Standard Methods 4500 – N _{org} B
N – amoniacal	mg/L	10	Titrimétrico – Standard Methods 4500 – NH ₃ C.
Fósforo Total	mg/L	8	Digestão manual e análise da injeção de fluxo para fósforo total – Standard Methods – 4500 P H.
DQO	mg/L	11	Digestão em Refluxo Fechado – Colorimétrico – Standard Methods 5220 D.
DBO ₅	mg O ₂ /L	9	Respirométrico – Standard Methods 5210 D.
<i>Escherichia coli</i>	NMP/100mL	9	Substrato cromogênico. Colilert®
Coliformes Totais	NMP/100mL	9	Substrato cromogênico. Colilert®
Sólidos Totais	mg/L	10	Seco a 105°C– Standard Methods 2540 G
Sólidos Suspensos totais	mg/L	10	Seco a 103-5°C– Standard Methods 2540 D
Sólidos Dissolvidos Totais	mg/L	10	Seco a 180°C– Standard Methods 2540 C
Sólidos Sedimentáveis	mg/L	10	Sedimentáveis – Standard Methods 2540 F

Fonte: Adaptado de APHA, 2005.

4.4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* DE ÁGUA CINZA BRUTA

4.4.1 Quantificação da *Escherichia coli*

A densidade de *Escherichia coli* foi avaliada através da determinação do número mais provável (NMP/mL), utilizando a técnica do substrato cromofluorogênico (Colilerte®), com quantificação por meio de cartela segundo o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – 21ª edição (APHA, 2005).

Conforme definição de Manafi (2000) e Perry e Freydiere (2007) os meios cromogênicos (origina mudança de cor) e fluorogênicos (conduz à emissão de fluorescência), são meios de crescimento microbiológicos. Quando em contato com população microbiana, a mesma, através de enzimas específicas produziram reações que conduziram ao metabolismo do substrato enzimático liberando assim o cromogêneo/fluorogênico originando a mudança de cor e/ou fluorescência sob luz ultravioleta (UV).

O meio Colilert® tem como base a DST (Defined Substrate Technology), técnica baseada no princípio do fornecimento de nutrientes aos microrganismos alvo e não

fornecer sustento para outras bactérias (GROSSI *et al.*, 2013). É utilizado para detecção e enumeração de *Escherichia coli* em amostras de água, através da hidrólise enzimática de substratos específicos, a ONPG e o MUG. O ONPG é específico para a enzima construtiva GAL presentes nos coliformes, já o MUG é utilizado especificamente para *Escherichia coli*, pois ela possui a enzima GUD (BUCKALEW *et al.*, 2006; LOPEZ-ROLDAN *et al.*, 2013). Após a mistura do Colilert® com a amostra e sua incubação, a mesma adquire a coloração amarela quando os coliformes metabolizarem o nutriente indicador ONPG, essa mudança de cor é devido a produção do ácido ONP resultante da hidrólise do ONPG, a amostra emitirá fluorescência sob luz UV (336 nm) quando houver a presença de *Escherichia coli*, devido a metabolização do indicador de nutriente MUG, liberando o composto 4-MU (IDEXX, 2011; LUSTER-TEASLEY e IVES, 2013).

4.4.2 Isolamento e confirmação da *Escherichia coli* isolada do meio

Após a realização da análise para quantificação de *Escherichia coli* segundo o método cromofluorogênico, os poços que foram identificados amarelos e fluorescentes, e assim contendo *Escherichia coli*, foram selecionados. Desses poços foram retiradas alíquotas de 100 µL de amostra utilizando seringa de insulina estéril 1mL com agulha 13x0,45 mm (Descarpac®) e plaqueados em meio ágar MacConkey (acumedia®). Após 24 horas de incubação a 37°C, as colônias típicas e atípicas de *Escherichia coli* foram submetidas a testes bioquímicos confirmatórios (IMViC – Indol, vermelho de Metil, Voges-Proskauer e Citrato), e posteriormente estocadas pelo método de criopreservação com glicerol, a 20°C e meio TSA (Ágar Triptona de Soja) (acumedia®), meio de cultivo, isolamento e manutenção de microrganismos.

4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA CINZA BRUTA

4.5.1 Esterilização da água cinza bruta

O processo de esterilização da água cinza bruta foi realizado através de filtração por membrana. Foram filtrados a vácuo 100 mL da amostra através de uma membrana filtrante de nitrocelulose (Sartorius®) (com porosidade controlada de 0,45 µm), onde ficaram retidas células de possíveis bactérias contaminantes. Após esse

procedimento foi realizado teste meio ágar HPC (acumedia[®]) (meio de contagem de organismos heterotróficos), para confirmação da ausência de bactérias heterotróficas no meio. Caso tenha sido observado a presença de alguma colônia no meio ágar HPC, repetiu-se a filtração até a ausência total de colônias.

4.5.2 Testes de sobrevivência

Os testes de crescimentos descrito a seguir foram desenvolvidos utilizando-se a cepa de *Escherichia coli* isolada da água cinza bruta.

Todas as curvas foram traçadas com correlação entre o tempo (horas) e o número de células viáveis, considerando colônias típicas de *Escherichia coli*. As análises descritas a seguir foram realizadas por duas metodologias: contagem de placas (UFC/mL) ou método cromofluorogênico (NMP/mL) (TORTORA, 2012).

A quantificação celular foi estimada através da avaliação da densidade óptica, com comprimento de onda de 600 nm (a Seção Apêndice apresenta os valores da DO encontrada em cada hora). Para a montagem das curvas, o número de células viáveis por mL, foi utilizado os valores das menores diluições que possibilitaram sua contagem, caso o experimento tenha sido realizado em placas, foram consideradas somente as placas contendo entre 30 a 300 colônias (TORTORA, 2012). Todos os erlenmeyer foram armazenados em estufa a 37°C e foram revestidos para evitar a entrada de luz.

Uma colônia de *Escherichia coli* isolada do meio, preservada em glicerol e meio TSA foi colocada em um tubo de ensaio contendo 10mL de meio A1 (o meio A1 é um meio seletivo utilizado para detecção de coliformes em água e alimentos, é um meio capaz de acelerar a recuperação de *Escherichia coli*, reduzindo a incidência de culturas falso positivas (ANDREWS, 1975)), em banho maria a 37° em over night. Em todos os ensaios foram acrescidos de 2 log₁₀ NMP/mL da *Escherichia coli* isolada do meio.

4.6 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DE SOBREVIVÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* EM ÁGUA CINZA BRUTA

4.6.1 Meio A1 acrescido de *Escherichia coli* isolada do meio

Após o período de incubação em banho maria a 37° em over night, a *Escherichia coli* isolada do meio foi transferida assepticamente para um erlenmeyer contendo 1000 mL de Meio A1. Uma alíquota de 1 mL do meio foi analisada em espectrofotômetro de absorção (Ultrospec 1000 – Pharmacia Biotech®) para determinação da DO em 600nm. A cada 10 minutos foi realizado a agitação manual do meio para auxiliar a oxigenação. A cada hora foram coletadas 2 alíquotas, sendo uma alíquota para determinação da DO e outra alíquota para determinação da UFC/mL. 100 µL do inóculo foram retirados e colocados em eppendorf com 900 µL de água fosfatada estéril. As alíquotas foram agitadas em Vortex Mixer (Vision Scientific Co.®) e diluídas de 10⁻¹ até 10⁻⁶. Nas amostras de 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶, foram tomadas alíquotas de 0,1 mL dessas diluições e a mesmas foram espalhadas com uma alça de drigalski nas placas de ágar MacConkey. Após o período de incubação (24 horas a 37°C), as colônias formadas em cada placa, foram contadas de modo a realizar o cálculo de UFC/mL. Para efeito do cálculo foram tomadas somente placas contendo entre 30 e 300 colônias. Dessa forma, o número de bactérias presente no erlenmeyer no tempo t da amostragem: UFC/mL = número de colônias contadas na placa x diluição da amostra.

Esse experimento possibilitou o conhecimento do comportamento da *Escherichia coli* isolada do meio, com isso foi possível associar as fases lag, log e estacionária com suas respectivas DO, a partir disso foi possível isolar os inóculos para que os próximos experimentos fossem realizados.

4.6.2 Comportamento da *Escherichia coli* em água cinza bruta

Foi coletado, em frasco estéril, 1000 mL de água cinza bruta. Uma alíquota de 1 mL da água cinza bruta foi analisada em espectrofotômetro de absorção para determinação da DO em 600nm. A cada 10 minutos foi realizada a agitação manual do meio para auxiliar a oxigenação. A cada hora foram coletadas 2 alíquotas, sendo uma alíquota para determinação da DO e outra alíquota para determinação do número mais provável (NMP/mL). 10 mL da amostra foi retirado e colocado em um frasco de vidro contendo 90 mL de água fosfatada estéril. As alíquotas foram agitadas e realizados diluições decimais seriadas, para melhor determinação do NMP/100mL de *Escherichia coli*. Após incubação das cartelas por 24 horas a 37°C, as mesmas foram analisadas em luz UV, para identificar os poços com fluorescência, os mesmos foram contados e posteriormente foi realizada a confecção dos gráficos NMP/mL x tempo.

4.6.3 Água cinza bruta acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio

Foi coletado, em frasco estéril, 1000 mL de água cinza bruta. Após o período de incubação em banho maria a 37° em over night, a *Escherichia coli* isolada do meio foi transferida assepticamente para água cinza bruta previamente coletada. Além da população típica da água cinza bruta, foi inoculado 2 log₁₀ a amostra, visando observar o comportamento da *Escherichia coli* em grande quantidade no meio. Uma alíquota de 1mL da água foi analisada em espectrofotômetro de absorção para determinação da DO em 600nm. A cada 10 minutos foi realizado a agitação manual do meio para auxiliar a oxigenação. A cada hora foram coletadas 2 alíquotas, sendo uma alíquota para determinação da DO e outra alíquota para determinação do número mais provável (NMP/100mL). 10 mL da amostra foi retirado e colocado em um vidro contendo 90 mL de água fosfatada estéril. As alíquotas foram agitadas e realizados diluições decimais seriadas, para melhor determinação do NMP/L. Após incubação das cartelas por 24 horas a 37°C, as mesmas foram analisadas em luz UV, para identificar os poços com fluorescência, os mesmos foram contados e posteriormente foi realizada a confecção dos gráficos NMP/mL x tempo.

4.6.4 Água cinza bruta estéril acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio

Após o período de incubação em banho maria a 37°C em over night, a *Escherichia coli* isolada do meio foi transferida assepticamente para um erlenmeyer contendo 1000mL de água cinza previamente estéril. Uma alíquota de 1mL da água foi analisada em espectrofotômetro de absorção para determinação da DO em 600nm. A cada 10 minutos foi realizado a agitação manual do meio para auxiliar a oxigenação. A cada hora foram coletadas 2 alíquotas, sendo uma alíquota para determinação da DO e outra alíquota para determinação do número mais provável (NMP/mL). 10 mL da amostra foi retirado e colocado em um vidro contendo 90 mL de água fosfatada estéril. As alíquotas foram agitadas e realizados diluições decimais seriadas, para melhor determinação do NMP/mL. Após incubação das cartelas por 24 horas a 37°C, as mesmas foram analisadas em luz UV, para identificar os poços com fluorescência, os mesmos foram contados e posteriormente foi realizada a confecção dos gráficos NMP/mL x tempo.

4.6.5 Água cinza bruta estéril + Meio A1 acrescido de *Escherichia coli* isolada do meio

Após o período de incubação em banho maria a 37°C em over night, a *Escherichia coli* isolada do meio foi transferida assepticamente para um erlenmeyer contendo 500mL de água cinza bruta previamente estéril e 500 mL de Meio A1. Uma alíquota de 1mL da água foi analisada em espectrofotômetro de absorção para determinação da DO em 600nm. A cada 10 minutos foi realizado a agitação manual do meio para auxiliar a oxigenação. A cada hora foram coletadas 2 alíquotas, sendo uma alíquota para determinação da DO e outra alíquota para determinação do número mais provável (NMP/mL). 10 mL da amostra foi retirado e colocado em um vidro contendo 90 mL de água fosfatada estéril. As alíquotas foram agitadas e realizadas diluições decimais seriadas, para melhor determinação do NMP/mL. Após incubação das cartelas por 24 horas a 37°C, as mesmas foram analisadas em luz UV, para identificar os poços com fluorescência, os mesmos foram contados e posteriormente foi realizado a confecção dos gráficos NMP/mL x tempo

4.7 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DE SOBREVIVÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* EM ÁGUA CINZA BRUTA ESTÉRIL COM SUPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES

Para suplementação de nitrogênio, fósforo e carbono foi seguida a relação CHONPS (carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo e enxofre). Essa relação ainda é controversa, Metcalf e Eddy (1991) citam essa relação na ordem de C:N:P 100:20:1. Franta et al., (1994) citam 250:7:1 e 100:10:1 e vestígios de enxofre conforme Beardsley e Coffey (1985).

Foram acrescentados uréia (CH₄N₂O) (Cromoline[®]), para suprimento de nitrogênio, fosfato de potássio dibásico anidro (K₂HPO₄) (Vetec[®]), para suprimento de fósforo e caldo de triptona dextrose (glicose) (C₆H₁₂O₆) (acumedia[®]), para suprimento de carbono.

Os ensaios a seguir foram realizados em duplicata. Paralelo as eles foram também realizados o ensaio denominado controle negativo.

4.7.1 Controle negativo

Após o período de incubação em banho maria a 37° em over night, a *Escherichia coli* isolada do meio foi transferida assepticamente para um erlenmeyer contendo 1000 mL de água cinza bruta estéril. Uma alíquota de 1mL do meio foi analisada em espectrofotômetro de absorção para determinação da DO em 600nm. A cada 10 minutos foi realizada a agitação manual do meio para auxiliar a oxigenação. A cada hora foram coletadas 2 alíquotas, sendo uma alíquota para determinação da DO e outra alíquota para determinação da UFC/mL. 100 µL do inóculo foram retirados e colocados em eppendorf com 900 µL de água fosfatada estéril. As alíquotas foram agitadas em Vortex Mixer e diluídas de 10⁻¹ até 10⁻⁶. Nas amostras de 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶, foram tomadas alíquotas de 0,1 mL dessas diluições e a mesmas foram espalhadas com uma alça de drigalski nas placas de ágar MacConkey. Após o período de incubação (24 horas a 37°C), as colônias formadas em cada placa, foram contadas de modo a realizar o cálculo de UFC/mL. Para efeito do cálculo foram tomadas somente placas contendo entre 30 e 300 colônias. Dessa forma, o número de bactérias presente no erlenmeyer no tempo t da amostragem: UFC/mL = número de colônias contadas na placa x diluição da amostra.

Esse mesmo ensaio já havia sido realizado antes, porém, com outra metodologia.

4.7.2 Água cinza bruta estéril acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio com suplementação de fósforo

-Ensaio 1: suplementação com 0,2 g/L de fósforo:

Após o período de incubação em banho maria a 37°C em over night, a *Escherichia coli* isolada do meio foi transferida assepticamente para um erlenmeyer contendo 1000mL de água cinza previamente estéril. Foi então suplementado 0,2 g/L de fósforo a água cinza bruta estéril previamente inoculada. Uma alíquota de 1mL da água foi analisada em espectrofotômetro de absorção para determinação da DO em 600nm. A cada 10 minutos foi realizado a agitação manual do meio para auxiliar a oxigenação. A cada hora foram coletadas 2 alíquotas, sendo uma alíquota para determinação da DO e outra alíquota para determinação do número mais provável (NMP/mL). 10 mL da amostra foi retirado e colocado em um vidro contendo 90 mL de água fosfatada estéril. As alíquotas foram agitadas e realizados diluições decimais seriadas, para

melhor determinação do NMP/mL. Após incubação das cartelas por 24 horas a 37°C, as mesmas foram analisadas em luz UV, para identificar os poços com fluorescência, os mesmos foram contados e posteriormente foi realizada a confecção dos gráficos NMP/mL x tempo.

-Ensaio 2: suplementação com 2 g/L de fósforo:

Após o período de incubação em banho maria a 37°C em over night, a *Escherichia coli* isolada do meio foi transferida assepticamente para um erlenmeyer contendo 1000mL de água cinza previamente estéril. Foi então suplementado 2,0 g/L de fósforo a água cinza bruta estéril previamente inoculada. Uma alíquota de 1mL da água foi analisada em espectrofotômetro de absorção para determinação da DO em 600nm. A cada 10 minutos foi realizado a agitação manual do meio para auxiliar a oxigenação. A cada hora foram coletadas 2 alíquotas, sendo uma alíquota para determinação da DO e outra alíquota para determinação do número mais provável (NMP/mL). 10 mL da amostra foi retirado e colocado em um vidro contendo 90 mL de água fosfatada estéril. As alíquotas foram agitadas e realizados diluições decimais seriadas, para melhor determinação do NMP/mL. Após incubação das cartelas por 24 horas a 37°C, as mesmas foram quantificadas em luz UV, para identificar os poços com fluorescência, os mesmos foram contados e posteriormente foi realizada a confecção dos gráficos NMP/mL x tempo.

4.7.3 Água cinza bruta estéril acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio com suplementação de nitrogênio

-Ensaio 1: suplementação com 1,0 g/L de nitrogênio:

Após o período de incubação em banho maria a 37°C em over night, a *Escherichia coli* isolada do meio foi transferida assepticamente para um erlenmeyer contendo 1000mL de água cinza previamente estéril. Foi então suplementado 1,0 g/L de nitrogênio a água cinza bruta estéril previamente inoculada. Uma alíquota de 1mL da água foi analisada em espectrofotômetro de absorção para determinação da DO em 600nm. A cada 10 minutos foi realizado a agitação manual do meio para auxiliar a oxigenação. A cada hora foram coletadas 2 alíquotas, sendo uma alíquota para determinação da DO e outra alíquota para determinação do número mais provável (NMP/mL). 10 mL da amostra foi retirado e colocado em um vidro contendo 90 mL de água fosfatada estéril. As alíquotas foram agitadas e realizados diluições decimais

seriadas, para melhor determinação do NMP/mL. Após incubação das cartelas por 24 horas a 37°C, as mesmas foram quantificadas em luz UV, para identificar os poços com fluorescência, os mesmos foram contados e posteriormente foi realizada a confecção dos gráficos NMP/mL x tempo.

-Ensaio 2: suplementação com 10 g/L de nitrogênio:

Após o período de incubação em banho maria a 37°C em over night, a *Escherichia coli* isolada do meio foi transferida assepticamente para um erlenmeyer contendo 1000mL de água cinza previamente estéril. Foi então suplementado 10 g/L de nitrogênio a água cinza bruta estéril previamente inoculada. Uma alíquota de 1mL da água foi analisada em espectrofotômetro de absorção para determinação da DO em 600nm. A cada 10 minutos foi realizado a agitação manual do meio para auxiliar a oxigenação. A cada hora foram coletadas 2 alíquotas, sendo uma alíquota para determinação da DO e outra alíquota para determinação do número mais provável (NMP/mL). 10 mL da amostra foi retirado e colocado em um vidro contendo 90 mL de água fosfatada estéril. As alíquotas foram agitadas e realizados diluições decimais seriadas, para melhor determinação do NMP/mL. Após incubação das cartelas por 24 horas a 37°C, as mesmas foram quantificadas em luz UV, para identificar os poços com fluorescência, os mesmos foram contados e posteriormente foi realizado a confecção dos gráficos NMP/mL x tempo.

4.7.4 Água cinza bruta estéril acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio com suplementação de glicose

-Ensaio 1: suplementação com 0,5 g/L de glicose:

Após o período de incubação em banho maria a 37°C em over night, a *Escherichia coli* isolada do meio foi transferida assepticamente para um erlenmeyer contendo 1000mL de água cinza previamente estéril. Foi então suplementado 0,5 g/L de glicose a água cinza bruta estéril previamente inoculada. Uma alíquota de 1mL da água foi analisada em espectrofotômetro de absorção para determinação da DO em 600nm. A cada 10 minutos foi realizado a agitação manual do meio para auxiliar a oxigenação. A cada hora foram coletadas 2 alíquotas, sendo uma alíquota para determinação da DO e outra alíquota para determinação do número mais provável (NMP/mL). 10 mL da amostra foi retirado e colocado em um vidro contendo 90 mL de água fosfatada estéril. As alíquotas foram agitadas e realizados diluições decimais seriadas, para

melhor determinação do NMP/mL. Após incubação das cartelas por 24 horas a 37°C, as mesmas foram quantificadas em luz UV, para identificar os poços com fluorescência, os mesmos foram contados e posteriormente foi realizada a confecção dos gráficos NMP/mL x tempo.

-Ensaio 2: suplementação com 10 g/L de glicose:

Após o período de incubação em banho maria a 37°C em over night, a *Escherichia coli* isolada do meio foi transferida assepticamente para um erlenmeyer contendo 1000mL de água cinza previamente estéril. Foi então suplementado 10 g/L de glicose a água cinza bruta estéril previamente inoculada. Uma alíquota de 1mL da água foi analisada em espectrofotômetro de absorção para determinação da DO em 600nm. A cada 10 minutos foi realizado a agitação manual do meio para auxiliar a oxigenação. A cada hora foram coletadas 2 alíquotas, sendo uma alíquota para determinação da DO e outra alíquota para determinação do número mais provável (NMP/mL). 10 mL da amostra foi retirado e colocado em um vidro contendo 90 mL de água fosfatada estéril. As alíquotas foram agitadas e realizados diluições decimais seriadas, para melhor determinação do NMP/mL. Após incubação das cartelas por 24 horas a 37°C, as mesmas foram quantificadas em luz UV, para identificar os poços com fluorescência, os mesmos foram contados e posteriormente foi realizada a confecção dos gráficos NMP/mL x tempo.

4.7.5 Água cinza bruta estéril acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio com suplementação de fósforo e nitrogênio

Após o período de incubação em banho maria a 37°C em over night, a *Escherichia coli* isolada do meio foi transferida assepticamente para um erlenmeyer contendo 1000mL de água cinza previamente estéril. Foi então suplementado 0,2 g/L de fósforo e 1g/L de nitrogênio a água cinza bruta estéril previamente inoculada. Uma alíquota de 1mL da água foi analisada em espectrofotômetro de absorção para determinação da DO em 600nm. A cada 10 minutos foi realizado a agitação manual do meio para auxiliar a oxigenação. A cada hora foram coletadas 2 alíquotas, sendo uma alíquota para determinação da DO e outra alíquota para determinação do número mais provável (NMP/mL). 10 mL da amostra foi retirado e colocado em um vidro contendo 90 mL de água fosfatada estéril. As alíquotas foram agitadas e realizados diluições decimais seriadas, para melhor determinação do NMP/mL. Após incubação das

cartelas por 24 horas a 37°C, as mesmas foram quantificadas em luz UV, para identificar os poços com fluorescência, os mesmos foram contados e posteriormente foi realizada a confecção dos gráficos NMP/mL x tempo.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística dos resultados da caracterização físico química da água cinza foi realizada utilizando o software Biostatistics® para a obtenção da estatística descritiva dos parâmetros analisados (média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo).

As análises estatísticas dos resultados das curvas de crescimento/sobrevivência foram realizadas utilizando o Excel® 2010 para a obtenção da estatística descritiva dos parâmetros analisados (média geométrica, desvio padrão, erro padrão). O grau de confiança foi de 90% em cada gráfico plotado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DA ÁGUA CINZA

A seguir são apresentados os resultados do monitoramento dos parâmetros analisados na água cinza, assim como os dados estatísticos e o número de análises realizadas (N) (tabela 10).

Tabela 10: Resultados do monitoramento da qualidade da água cinza bruta. Dados estatísticos (média, desvio padrão, máximo e mínimo), número de análises realizadas para cada parâmetro (N) e correlação de alguns dados com base nos estudos já existentes.

Parâmetro	Resultados desse estudo				N	Dados da literatura+	
	Média	DP	Máx.	Mín.		Máx	Mín.
Cloro (mg/L)	0,0	0,1	0,2	0	11	-	-
Turbidez (NTU)	18,8	15,2	49,6	2	11	109*	41*
pH	6,7	0,4	7,3	6,1	11	8*	6,7*
OD (mg/L)	1,4	0,5	2,2	0,7	11	-	-
Condutividade (mS/cm)	170	0,0	200	120	11	789*	501*
NTK (mg/L)	5,4	4,5	14	1,7	11	11*	4*
N-amoniaco (mg/L)	1,9	1,4	5,5	0,4	10	16*	0,3*
Fósforo Total (mg/L)	0,1	0	0,1	0,1	10	3*	0,1*
DQO (mg/L)	77	41	128	11	10	112*	11*
DBO ₅ (mg/L)	67	37	110	10	10	65*	13*
Coliformes Totais (NMP/mL)	1,1 x 10 ⁶	-	2,4x 10 ⁶	2,6x 10 ⁴	10	5,0x10 ⁵ *	4,0x10 ¹ *
<i>Escherichia coli</i> (NMP/mL)	2,0x10 ⁴	-	7,2x10 ⁴	1,0x10 ³	10	3,0x10 ³ *	2,0x10 ¹ *
ST (mg/L)	226,5	190,7	711	97	10	-	-
SST (mg/L)	53,5	44,3	125	8	10	112&	15&
SDT (mg/L)	173	202,5	680	5	10	-	-
SS (mg/L)	0,4	0,2	0,8	0,2	10	8,1*	2,1*

Fonte: autoria própria, *adaptado de Laafat *et al.*, 2017. & adaptado de Palmquist e Hanæus, 2005

Conforme a tabela 10 a maioria dos parâmetros analisados encontram-se dentro da faixa encontrada na literatura. Os valores de fósforo encontram-se abaixo daqueles apresentados na literatura (CHRISPIM e NOLASCO, 2017; GONÇALVES, SIMÕES e WANKE, 2010; PAULO *et al.*, 2009), que reportaram valores de 3 – 5 mg/L. Porém outros autores como Chaillou *et al.*, (2011) e Knup (2013) mostram valores bem abaixo dessa média. Isso pode ser explicado devido aos hábitos de higiene da população, a utilização de produtos com menos quantidade de fósforo em sua composição, além do fato do sistema não captar água da máquina de lavar roupa.

Já o nitrogênio total conforme mostrado na tabela 10, em média, a água cinza apresentou valores dentro dos encontrados na literatura, tanto para NTK como N-amoniaco. A água cinza é pobre em nutrientes como nitrogênio e fósforo quando comparado ao esgoto sanitário. Um estudo feito por Knupp (2013) afirma que isso pode ocorrer devido à pouca quantidade de urina humana presente na água cinza, o que não ocorre no esgoto sanitário. Na água cinza o nitrogênio é originário principalmente de proteínas contidas em resíduos de alimentos, produtos de limpeza doméstica e produtos de higiene pessoal (SAIDI *et al.*, 2017), como a fonte coletada para este estudo não inclui efluente de cozinha, os resultados deste monitoramento estão de acordo com o esperado.

Outro fator que se destaca é a concentração de sólidos totais na amostra, que apresentou valores acima do esperado (de 226,5 mg/L para ST). Em Friedler *et al.*, (2011) é possível encontrar uma faixa de sólidos totais de 50-700 mg/L. O armazenamento de água cinza é um fator que pode eliminar alguns sólidos suspensos, como cabelos, fiapos e outros (BOYJOO *et al.*, 2013). Essa alta concentração pode ser ocasionada pela caixa de coleta ser bem rasa, logo ao se efetuar a coleta todo sólido depositado no fundo pode ter sido acidentalmente resuspenso.

As médias dos valores de turbidez, pH e condutividade elétrica foram 18,8 NTU, 6,7 e 0,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectivamente. Os valores estão dentro da faixa encontrada geralmente para água cinza sem a contribuição de efluentes de cozinha (GONÇALVES, SIMÕES e WANKE, 2010; CHAILLOU *et al.*, 2011; CHRISPIM e NOLASCO, 2017).

Foram encontradas altas concentrações de matéria orgânica na água cinza analisada, o que pode ser observado através dos valores de DQO e DBO₅.

Para a DQO, a média foi de 77,89 mg/L, enquanto o valor máximo encontrado chegou a 128,45 mg/L. Em Leong, Chong e Poh (2018) e Alsulaili *et al.*, (2017) valores parecidos foram apresentados para a DQO da água cinza bruta coletada de chuveiros, lavatórios e máquina de lavar. Katukiza *et al.*, (2015), por sua vez, corroboram com os resultados mínimos de DQO encontrados neste estudo, apresentando valores de DQO torno de 27,9 mg/L em locais na qual a fonte seja apenas de chuveiros e lavatórios de banheiros, cuja contribuição com matéria orgânica é menor se comparada aos efluentes de cozinha. Por conseguinte, a relação DQO/DBO₅, considerando a média encontrada na água cinza bruta, foi de 1,1 o que indica uma elevada biodegradabilidade desse efluente (SAIDI *et al.*, 2017).

5.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA

A concentração de microrganismos indicadores de qualidade de água, avaliados em termos de coliformes totais e *Escherichia coli* na água cinza bruta, foi de 6 e 4 \log_{10} , respectivamente (Tabela 10). Ao contrário de outros parâmetros, esses valores não variaram muito ao longo do tempo de monitoramento e também são reportados em outros estudos (CHAILLOU *et al.*, 2011; CHRISPIM e NOLASCO, 2017; MANDAL *et al.*, 2011; KATUKIZA *et al.*, 2015; LEONG, CHONG e POH, 2018).

5.3 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DE SOBREVIVÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* EM ÁGUA CINZA BRUTA

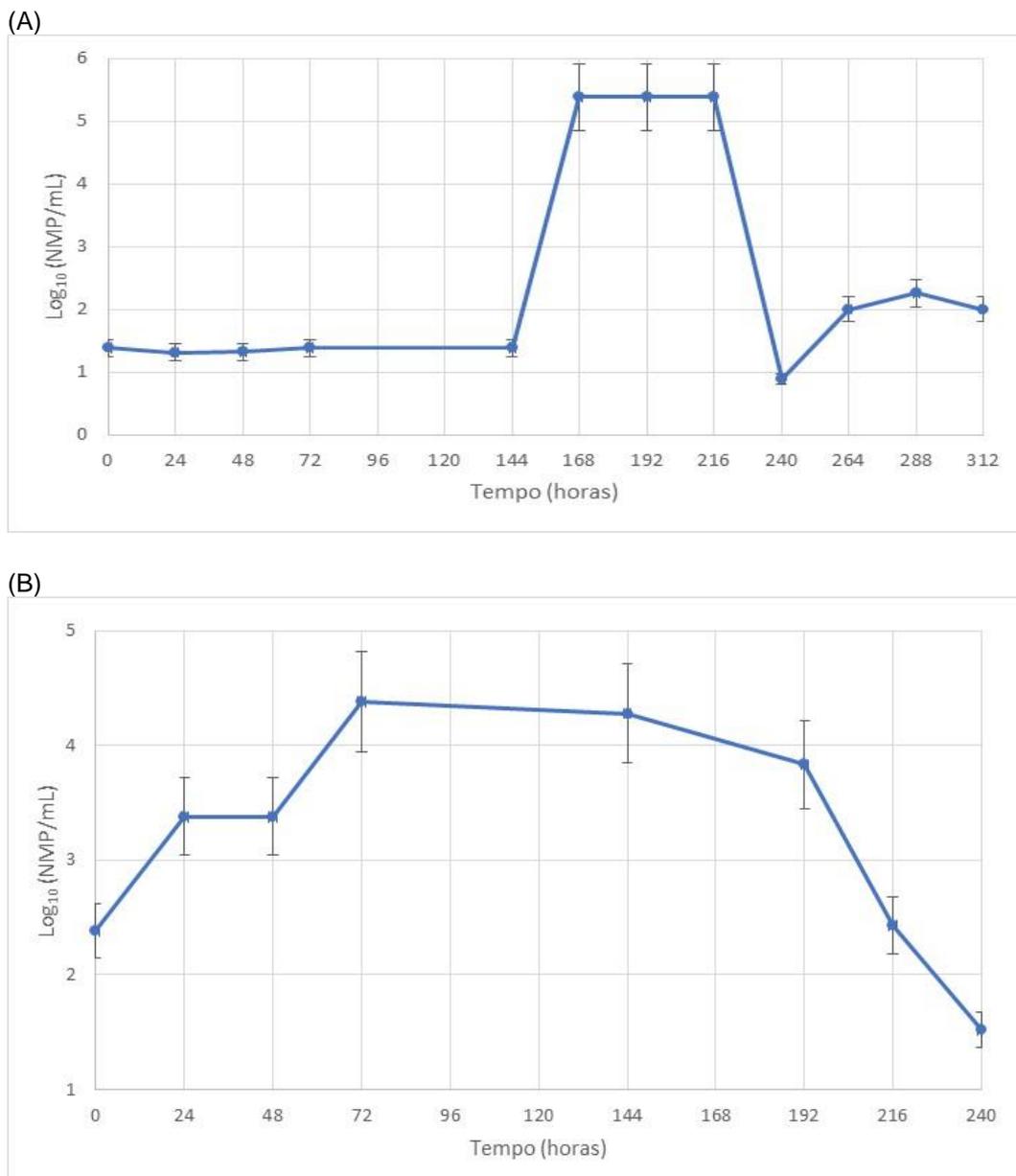
Após avaliação dos testes bioquímicos confirmatórios, foram plotados os gráficos contendo as curvas de crescimento/sobrevivência de *Escherichia coli* isolada do meio. Todos os gráficos possuem o \log_{10} x tempo.

Ao longo do trabalho foram utilizados métodos de análises diferentes. Contagem de placas (UFC/mL) e método cromofluorogênico, método do número mais provável (NMP/mL).

5.3.1 Comportamento da *Escherichia coli* isolada do meio em água cinza bruta

A figura 3 demonstra o comportamento da *Escherichia coli* em água cinza bruta por um período de 312 horas.

Figura 3: Comportamento da *Escherichia coli* em água cinza bruta. (A) água cinza bruta, (B) água cinza acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio.



Conforme análise da figura 3-A pode-se observar que até a 144^a hora não há mudança no comportamento da população na amostra. No tempo 168 horas ocorre um aumento de 4 log₁₀ da população. Esse crescimento pode estar relacionado com a quantidade de nutrientes disponível na amostra, que no tempo 144 horas pode chegar a quantidade máxima na amostra. No 216^o horas começa a ocorrer o declínio da *Escherichia coli*. No tempo 240 horas ocorre a redução máxima, 3 log₁₀ da *Escherichia coli*. Esse declínio pode estar relacionado com a presença de outros microrganismos presentes na água cinza, que podem competir com a *Escherichia coli* pelos nutrientes

presentes no meio. Após essa hora observa-se um recrescimento população de *Escherichia coli*, $1 \log_{10}$, e em seguida a fase de equilíbrio da população da amostra. Esse recrescimento pode estar relacionado com a disponibilidade de matéria orgânica disponível no meio proveniente do declínio da população e *Escherichia coli* presente (observado no tempo 240 horas), com isso é possível que as bactérias que ainda estejam em estado de cultivo se aproveitem dessa matéria orgânica e se tornem novamente cultiváveis e viáveis. Um estudo realizado por Gregory et al., (2017) avaliou a resistência e a decomposição de *Escherichia coli* em água e sedimentos. Foi observado que não houve crescimento de *Escherichia coli* durante os ensaios de 22 dias, e ocorreu um rápido decaimento de *Escherichia coli* nos primeiros 4-7 dias.

A figura 3-B mostra o comportamento da *Escherichia coli* isolada do meio em água cinza bruta, quando ocorreu inoculação de mais $2 \log_{10}$ de *Escherichia coli* na amostra inicial. O objetivo foi avaliar se haveria mudança brusca na curva de crescimento quando houvesse uma grande quantidade de *Escherichia coli* presente na amostra. Comparando a figura 3-A e 3-B observou-se um valor maior da população no tempo 0 na figura 3-B, $2 \log_{10}$, e $1 \log_{10}$ na figura 3-A, o que é de se esperar visto que foi inoculado uma quantidade maior de *Escherichia coli* ao meio como mostrado na figura 1-B. Devido a quantidade maior de *Escherichia coli* presente no meio o tamanho da população sofreu um aumento de $2 \log_{10}$ nas primeiras 72 horas, o que não ocorreu na amostra anterior. A partir do tempo 72 horas foi observado o início do declínio da população de *Escherichia coli* da amostra. Ao final do ensaio ocorreu um declínio de $3 \log_{10}$ da população inicial da *Escherichia coli* da amostra. Analisando a figura 1 pode-se avaliar um declínio mais rápido da amostra na figura 3-B (tempo 144 horas), isso pode estar relacionado com a quantidade de microrganismos presentes nas amostras competindo pelos nutrientes disponíveis. Conforme Gregory et al., (2017) microrganismo competitivos melhores adaptados ao ambiente podem consumir influxos de nutrientes mais rápidos que a *Escherichia coli* suprimindo ou impedindo respostas de crescimento observáveis.

Estudos realizados por Unc et al., (2006) e Ishii et al., (2010) relataram que a *Escherichia coli* cresce muito melhor em solos estéreis do que o não estéreis, indicando assim que a população indígena tem efeito decisivo na sobrevivência da *Escherichia coli*. Estudos de Anderson et al., (2015), demonstrou que a capacidade da *Escherichia coli* para adquirir nutrientes, competir com outros microrganismos, sobreviver e crescer no ambiente varia conforme a estirpes e genótipo. Com isso a

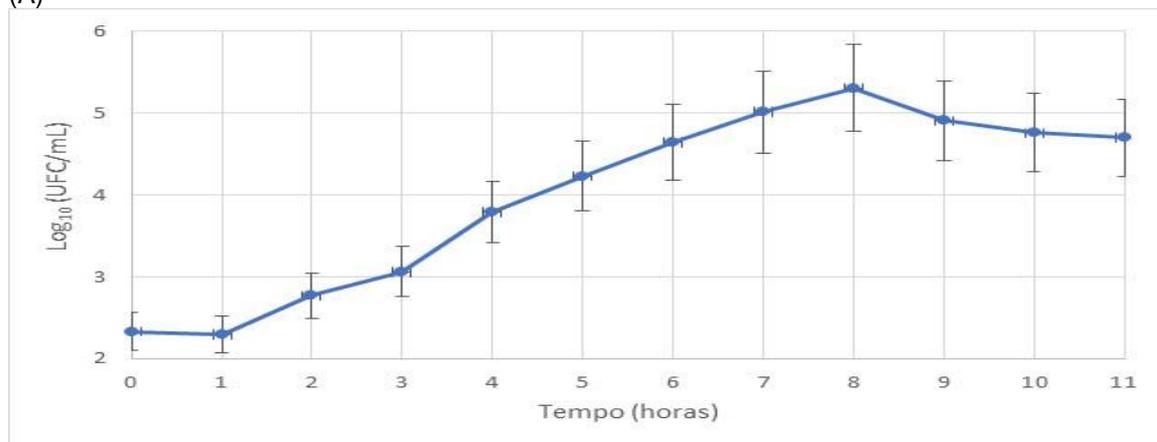
capacidade de sobrevivência e crescimento entre as cepas de *Escherichia coli* podem causar uma mudança na população de *Escherichia coli* em águas residuárias ou sedimentos de impacto fecal.

5.3.2 Comportamento da *Escherichia coli* isolada do meio em Meio A1 e em água cinza bruta estéril

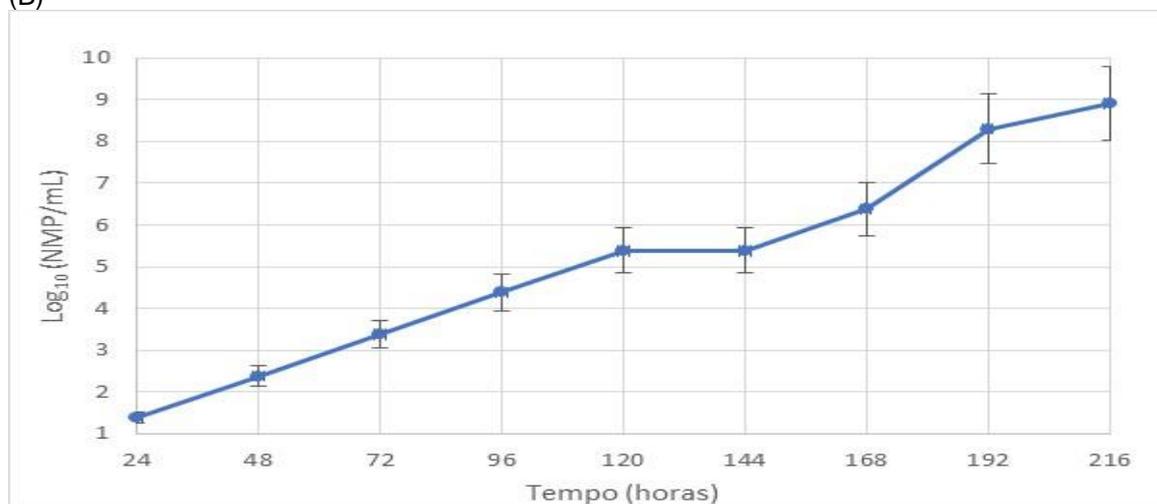
A figura 4 demonstra o comportamento da *Escherichia coli* isolada do meio em situações distintas.

Figura 4: Comportamento da *Escherichia coli* isolada do meio. (A) Meio A1, (B) água cinza bruta estéril + Meio A1, (C) água cinza bruta estéril.

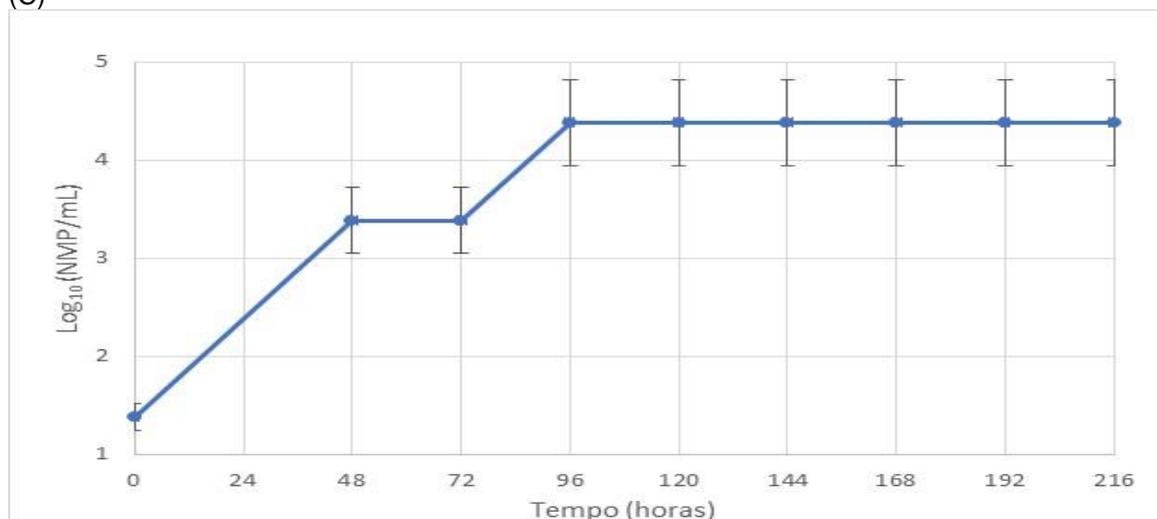
(A)



(B)



(C)



A figura 4-A demonstra o crescimento de *Escherichia coli* isolada do meio em Meio A1, por um período de 11 horas.

A figura 4-A mostra que do tempo 3 horas ao tempo 8 horas ocorreu um crescimento de $2 \log_{10}$. Logo após esse período ocorreu um declínio no número de células ($1 \log_{10}$). Esse declínio pode estar associado a diminuição da concentração de nutrientes disponível no meio. Após a 9ª hora observou-se o equilíbrio (fase estacionária) da população.

A figura 4-B demonstra o comportamento da *Escherichia coli* em água cinza bruta estéril suplementada com meio A1, conforme descrito anteriormente.

Devido a quantidade de nutrientes disponível na amostra, proveniente do meio A1, esperava-se um aumento no tamanho populacional presente. Tal fato foi observado na figura 4-B onde ocorreu um aumento populacional total de $7 \log_{10}$. Devido à grande quantidade de nutrientes disponíveis observou-se um crescimento constante da população conforme o tempo. Não foi observada fase de declínio até o fim do experimento (216 horas). Como a água cinza bruta está estéril não há competição pelos nutrientes disponíveis, essa pode ser a hipótese de não se observar o decaimento da população de *Escherichia coli* presente no meio.

A figura 4-C mostra o comportamento da *Escherichia coli* isolada do meio em água cinza bruta estéril. No tempo 0 a 48 horas observou-se a fase de aclimatação da *Escherichia coli* ao meio, visto que, como ele foi previamente esterilizado, há baixíssimas fontes de nutrientes disponíveis, tendo ocorrido um aumento de $2 \log_{10}$ em relação a população inicial. Do tempo 48 a 96 horas há um crescimento de $1 \log_{10}$ na população.

No tempo 96 horas a *Escherichia coli* isolada do meio atingiu o valor máximo de crescimento ($4 \log_{10}$). Não é observado fase de declínio até o tempo avaliado da amostra (216 horas). Após o tempo 96 horas a população presente no meio matema-se em equilíbrio. Pode-se concluir, através da análise da figura 4, que mesmo com a baixa disponibilidade de nutrientes disponíveis no meio, a *Escherichia coli* continua em um estado viável e cultivável.

Comparando as figuras 4-B e 4-C observou-se que a presença de nutrientes, nesse caso proveniente do Meio A1, influencia diretamente no crescimento da *Escherichia coli* presente no meio. É possível observar que o crescimento/sobrevivência da *Escherichia coli* na presença de Meio A1 apresentou maior variação nos valores de crescimento. Além disso, no mesmo gráfico não é observada fase de equilíbrio da

população presente, uma vez que a mesma se mantém em crescimento até o fim do ensaio.

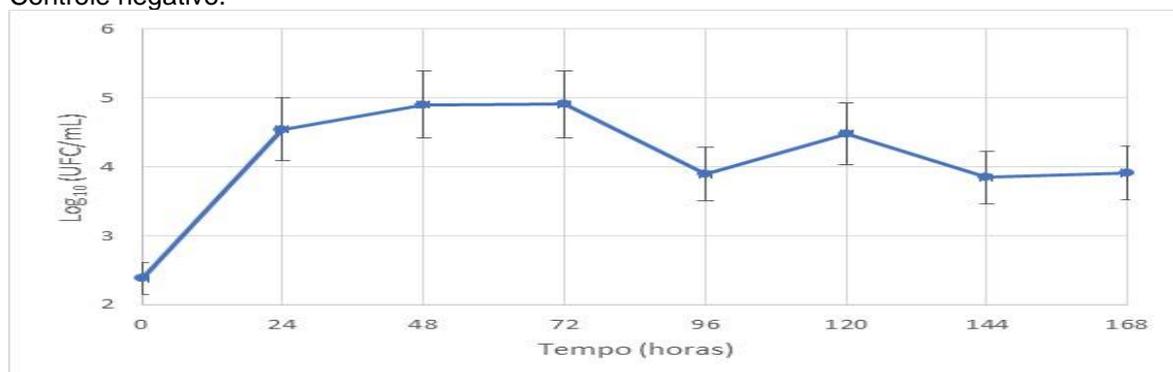
A técnica de filtração estéril por membrana (0,22 μm) é muito utilizada e relatada por diversos autores para remoção total de bactérias endógenas presentes no meio (CHAI, 1983; HENIS *et al.*, 1989; FUJIOKA e UNUTOA, 2006). Porém, foi demonstrado que esse procedimento não remove todas as bactérias presentes no meio, pois uma fração significativa da flora bacteriana natural pode passar pelo filtro sendo capaz de voltar a crescer imediatamente usando o carbono, e outro nutrientes, biodisponíveis no meio, não deixando assim substrato livre para a *Escherichia coli* crescer (WANG *et al.*, 2007). Além disso WANG *et al.*, (2007) afirma que essas bactérias filtráveis não podem ser detectadas com técnicas convencionais de plaqueamento, mas somente por métodos como microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo.

5.4 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DE SOBREVIVÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADA DO MEIO EM ÁGUA CINZA BRUTA ESTÉRIL COM SUPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES

5.4.1 Água cinza bruta estéril acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio com suplementação de nutrientes

A figura 5, denominado controle negativo, demonstra o comportamento da *Escherichia coli* isolada do meio em água cinza bruta estéril, sem nenhuma adição de nutrientes.

Figura 5: Ensaios de avaliação de sobrevivência de *Escherichia coli* isolada do meio em água cinza bruta estéril com suplementação de nutrientes. Controle negativo.

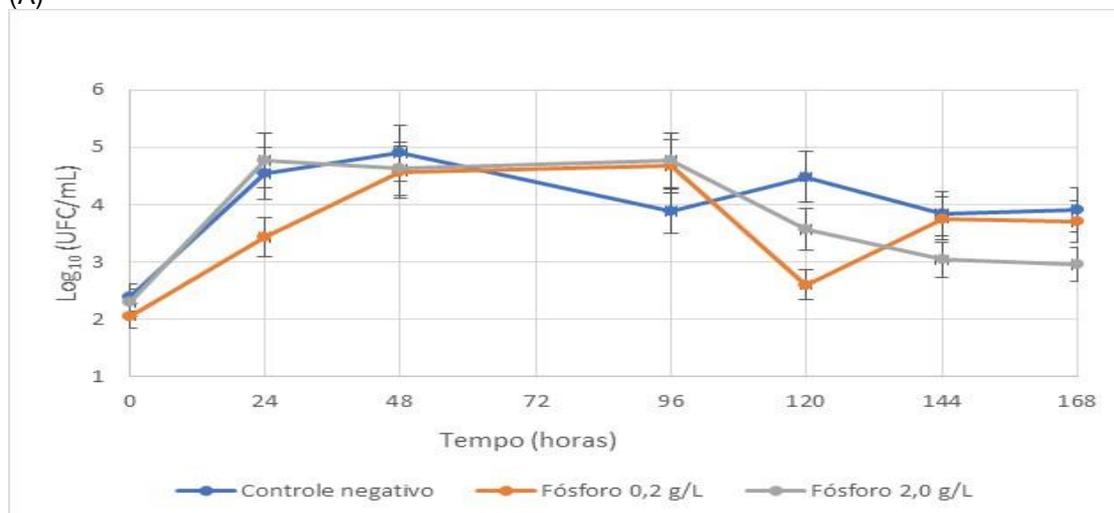


O mesmo ensaio já foi apresentado anteriormente (ver figura 4-C), porém as metodologias aplicadas foram diferentes.

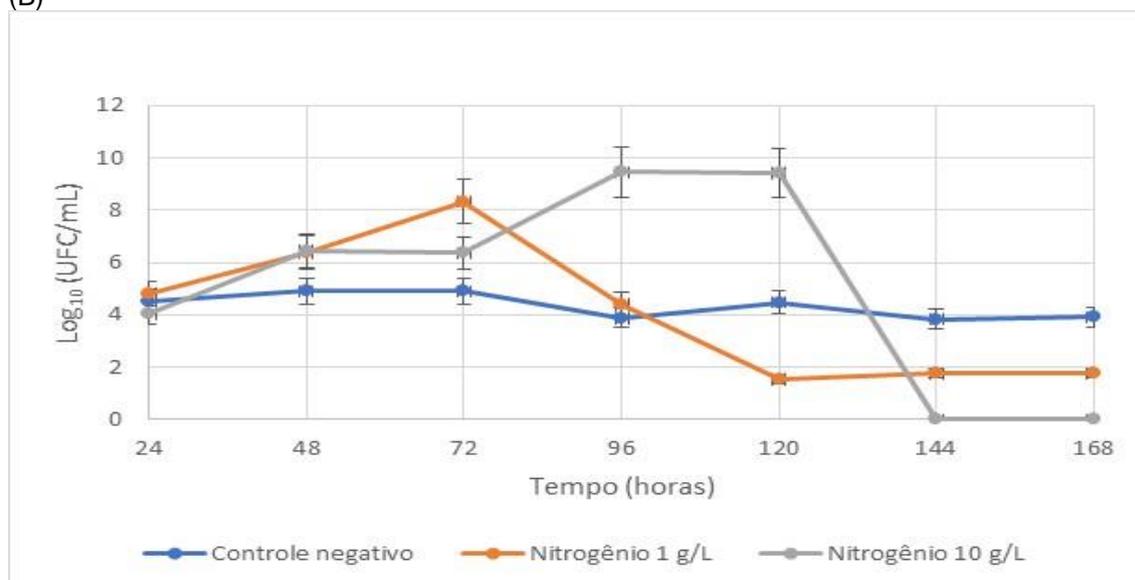
A partir da análise da figura 5 se observou um aumento significativo da população de *Escherichia coli* isolada do meio na amostra. No tempo 24 horas observa-se um aumento de 2 \log_{10} , esse aumento se manteve até o tempo 72 horas onde verificou-se um declínio da população inicial. No tempo 96 e 144 horas observou-se os dois pontos de declínios da população (1 \log_{10}). Esse baixo crescimento era esperado, visto que a água cinza bruta estéril contém baixa quantidades de nutrientes disponíveis, e com o passar das horas, essa quantidade tende a ficar cada vez mais escassa.

A figura 6 apresenta os resultados dos ensaios da avaliação da sobrevivência da *Escherichia coli* isolada do meio em água cinza bruta estéril suplementada com fósforo (figura 6-A), com suplementação de nitrogênio (figura 6-B) e com suplementação de glicose (figura 6-C).

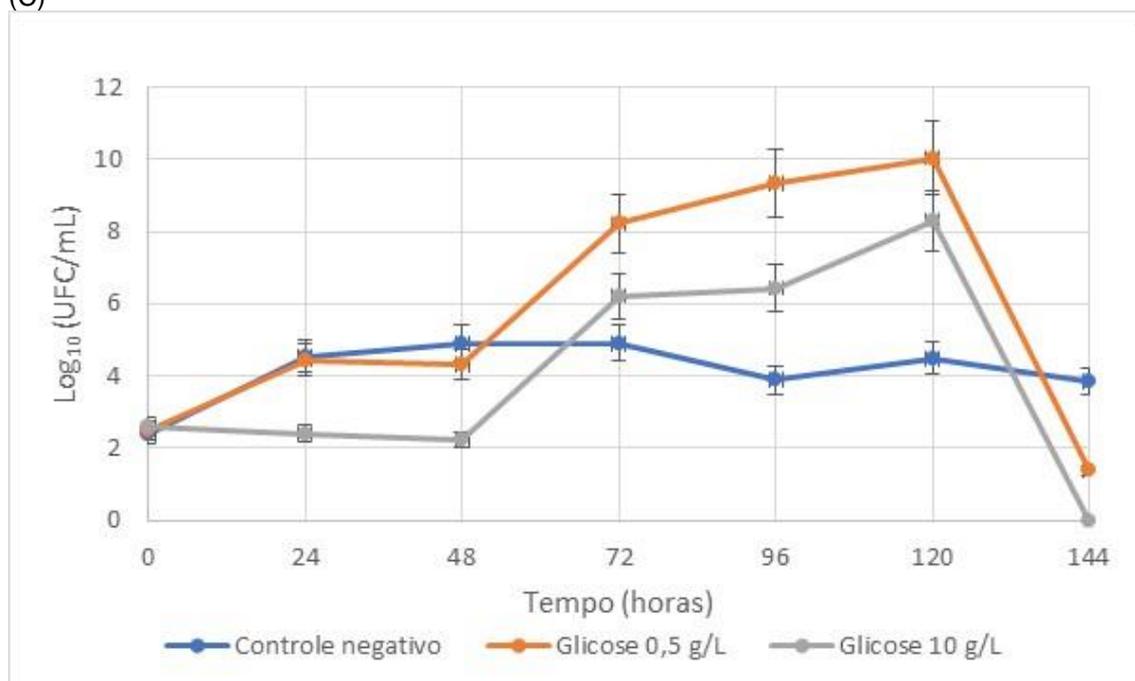
Figura 6: Ensaio de avaliação de sobrevivência de *Escherichia coli* isolada do meio em água cinza bruta estéril com suplementação de nutrientes (A) Fósforo, (B) nitrogênio, (C) glicose.
(A)



(B)



(C)



Sabe-se que as bactérias são competidoras superiores de fósforo e que o nitrogênio é obtido de fontes orgânicas e inorgânicas (KEIL, 1991).

A figura 6-A apresenta os resultados das análises do comportamento da *Escherichia coli* isolada do meio na água cinza bruta estéril suplementada com 0,2 g/L de fósforo (linha laranja), suplementação de 2,0 g/L de fósforo (linha cinza) e o controle negativo (linha azul).

Nas primeiras 24 horas observou-se um crescimento de 1 log_{10} na amostra com suplementação de 0,2 g/L de fósforo e de 2 log_{10} na amostra com suplementação de

2,0 g/L de fósforo. Estudos de Chudoba *et al.*, (2013), também mostraram contagem baixa no primeiro dia de ensaio. No tempo 96 horas ocorreu um pequeno declínio da população na amostra do controle negativo, possivelmente devido à redução dos nutrientes disponíveis no meio. No tempo 120 horas observou-se um declínio em ambas as amostras, na suplementada com 0,2 g/L de fósforo houve um declínio de 2 \log_{10} , já na amostra suplementada com 2,0 g/L de fósforo o declínio foi de 1 \log_{10} . Esse decréscimo pode ser explicado pela possível diminuição dos níveis de nutrientes disponíveis, e considerando a diferença de quantidades na suplementação das amostras, foi observado que na amostra suplementada com 2,0 g/L de fósforo o decréscimo é menor que na amostra suplementada com 0,2 g/L de fósforo. Chudoba *et al.*, (2013) relatou aumento na contagem até o 3º dia de ensaio, sendo observada diminuição após esse período. No mesmo estudo, quando os ensaios são realizados em amostras mais diluídas a contagem de microrganismos, quando há suplementação com fósforo orgânico, aumenta significativamente do primeiro ao segundo dia, sendo que no terceiro dia todas as amostras já eram numerosas demais para serem contadas. Já em amostras diluídas suplementadas com fósforo inorgânico a contagem de microrganismo diminui do primeiro para o segundo dia, indicando que o fósforo orgânico teve um efeito positivo maior no crescimento de bactérias do que o fósforo inorgânico.

Já no tempo 144 observou-se um aumento de 1 \log_{10} na amostra suplementada com 0,2 g/L de fósforo, entrando em equilíbrio com o controle negativo.

Esse novo crescimento que foi observado no tempo 144 horas pode ter ocorrido devido a uma adaptação da população ao meio disponível, além disso, deve-se avaliar o estado VBNC de alguma amostra de *Escherichia coli* isolada do meio presente na amostra.

A partir desse tempo ambas as amostras entram em equilíbrio.

No tempo 168 horas ambas as amostras se encontravam dentro da mesma faixa de crescimento, aproximadamente 3 \log_{10} .

Em estudos realizados por Carlsson e Caron (2001) e Mallin *et al.*, (2004) foi observado que o fósforo, e não o nitrogênio, poderia limitar a produção de bactérias em sistemas de água doce. Além disso a produção bacteriana é limitada por fósforo em ecossistemas costeiros (SUNDARESHWAR *et al.*, 2003). Entre as bactérias que são influenciadas pelo aumento das concentrações de fósforo estão as bactérias coliformes fecais (MALLIN *et al.*, 2004). Assim como nos estudos realizados por

Chuboda *et al.*, (2013), a *Escherichia coli* não apresentou contagem diferenciada com suplementação de fósforo, mesmo ele sendo utilizado em concentrações diferentes.

A figura 6-B apresenta os resultados das análises do comportamento da *Escherichia coli* isolada do meio na água cinza bruta estéril suplementada com 1,0 g/L de nitrogênio (linha laranja), suplementação de 10 g/L de nitrogênio (linha cinza) e o controle negativo (linha azul).

Nas primeiras 48 horas observou-se um crescimento de 2 log₁₀ em ambas as amostras. No tempo 72 horas ocorreu um aumento de 2 log₁₀ na amostra suplementada com 1,0 g/L de nitrogênio. Já a amostra suplementada com 10 g/L de nitrogênio não houve alteração da população no mesmo período. A partir desse tempo (72 horas) observou-se o início do declínio da *Escherichia coli* isolada do meio na amostra com 1,0 g/L de nitrogênio. Esse declínio pode estar associado a uma queda da quantidade de nutrientes disponíveis no meio, ou até mesmo devido a toxicidade da amônia presente na amostra, visto que nesse período é possível que todo nitrogênio disponível no meio tenha sido convertido em amônia. Já a amostra suplementada com 10 g/L de nitrogênio começou a apresentar um aumento no mesmo período de tempo (72 horas). No tempo 96 horas a amostra suplementada com 10 g/L de nitrogênio apresentou um aumento de 5 log₁₀ em relação a população inicial (tempo 24 horas) e a amostra suplementada com 1,0 g/L de nitrogênio continuou em declínio. Após 120 horas de cultivo a amostra suplementada com 1,0 g/L de nitrogênio apresenta o seu declínio máximo, 3 log₁₀ em relação a hora inicial (24 horas), entrando a *Escherichia coli* em equilíbrio a partir desse período, tempo esse que equivale ao período de equilíbrio do controle negativo.

A amostra suplementada com 10 g/L de nitrogênio apresentou um comportamento bem diferente, a partir do tempo 120 horas, iniciou-se o declínio da *Escherichia coli* presente na amostra e observou-se um valor nulo da população, em relação a população inicial, ou seja, não detectável ao método utilizado. Esse valor nulo encontrado pode estar relacionado com a conversão total do nitrogênio em amônia, gerando uma excessiva toxicidade ao meio, ou ainda devido à falta de nutrientes disponíveis ao meio.

Estudos de Chudoba *et al.*, (2013), mostram que as amostras suplementadas com nitrogênio inorgânico apresentaram diminuição da contagem de microrganismo do primeiro para o segundo dia, ficando as mesmas bem próxima a amostra de controle.

Na água cinza bruta uma fonte com grande quantidade de nitrogênio é a urina, além, do efluente da cozinha, porém, esse efluente, no caso do edifício analisado, é encaminhado para a rede de esgoto.

Conforme JOHANSSON (2001) a urina contém em sua composição cerca de 80% de nitrogênio e 55% de fósforo aproximadamente. A uréia principal fonte de nitrogênio na urina, sofre um processo hidrólise liberando amônia. Estudos de ZANCHETA (2007) mostram que a urina estocada depois de 30 dias em recipiente fechado possuía uma concentração de aproximadamente 5000 mg/L de amônia, além disso todo o nitrogênio orgânico está na forma de amônia, tendo um valor de NTK de 5100 mg/L. Nesse estudo ainda foi possível avaliar a queda de $7 \log_{10}$ na segunda semana de estocagem da urina, e após 15 dias essa contagem foi praticamente nula, devido sobretudo ao aumento do pH e aumento na concentração de amônia. Já estudos realizados por Valentina (2009), não observou alteração da concentração de NTK ao longo dos tratamentos biológicos realizados no mesmo edifício, reduzindo somente na etapa de decantação. Não foi realizado o monitoramento das quantidades das concentrações de nitrogênio nas amostras citadas acima.

A urina humana também apresenta altas concentrações de coliformes termotolerantes. Conforme SILVA (2005), em urina humana estocada não preservada as bactérias presentes podem se multiplicar facilmente elevando sua contagem a valores superiores a 10^5 , principalmente as bactérias com crescimento rápido como as enterobactérias. Com isso mesmo com toda a possível toxicidade da amônia presente na urina humana, pode-se prever que algum outro microrganismo presente na urina possa encontrar um ambiente favorável para sobreviver, fazendo com ocorra contaminação da água cinza.

Pela análise da figura 6-B, poderia ser possível concluir que uma quantidade maior de urina presente na água cinza, por exemplo, aumentando a quantidade de micções durante o banho, seria uma boa alternativa para se diminuir a população de *Escherichia coli* presente na água cinza. Porém, deve-se levar em conta outros microrganismos presentes na urina, que, após período de adaptação, podem aumentar a sua população, aumentando assim a contaminação da água cinza.

A figura 6-C apresenta os resultados das análises do comportamento da *Escherichia coli* isolada do meio na água cinza bruta estéril suplementada com 0,5 g/L de glicose (linha laranja), 10 g/L de glicose (linha cinza) e o controle negativo (linha azul).

Nas primeiras 24 horas observou-se um aumento do controle negativo de $1 \log_{10}$, na amostra com suplementação de 0,5 g/L de glicose o aumento foi de $3 \log_{10}$ e na amostra com suplementação de 10 g/L de glicose não foi observado aumento em relação a população inicial.

Na 72^o hora ocorre um novo aumento da população em ambas as amostras de $4 \log_{10}$, chegando ao pico máximo em ambas no tempo 120 horas. Nesse momento a amostra suplementada com 0,5 g/L de glicose apresentou um aumento de $9 \log_{10}$ em relação a amostra inicial (tempo 0 horas). Já a amostra suplementada com 10 g/L de glicose apresentou um aumento de $6 \log_{10}$ em relação a amostra inicial (tempo 0 horas).

Ocorrendo após esse tempo o declínio da população da amostra em ambas as amostras. No tempo 144 horas a amostra suplementada com 10 g/L de glicose apresentou valor nulo, não se observou presença de colônias de *Escherichia coli* nas placas analisadas, porém, não se pode afirmar que não há presença da mesma na amostra.

Uma grande dificuldade encontrada nesse estudo foram as contaminações surgidas nas placas utilizadas. Uma hipótese é a escolha da dextrose como fonte de glicose, visto que ela não é a fonte mais apropriada para cultivo de *Escherichia coli*, além de uma possível contaminação proveniente do meio utilizado, visto que o mesmo não foi esterilizado previamente. Um meio mais adequado seria a utilização da lactose como fonte de glicose. Além disso mesmo a água cinza bruta estando previamente estéril, e o teste HPC tenha dado negativo, algum outro microrganismo, que não tenha sido detectado pelo HPC, pode ter encontrado ambiente favorável para se estabilizar na amostra. Nos picos de maior crescimento observou-se as maiores contaminações das placas.

Quando se comparou as concentrações diferentes de glicose utilizada no estudo, com o controle negativo observa-se um aumento significativo da população de *Escherichia coli* isolada do meio com suplementação de glicose em relação ao controle negativo. Esses valores mostram a importância da glicose no metabolismo da *Escherichia coli*, porém, devido as contaminações observadas nas placas levanta a hipótese de crescimento de alguma colônia em paralelo com a inoculada. Tais contaminações não foram observadas nas amostras de fósforo e nitrogênio.

Um estudo realizado por Vital (2008), demonstrou que a *Escherichia coli* patogênica O157 foi capaz de crescer em água doce estéril com quantidade reduzida de carbono no meio, além disso, foi traçada uma correlação positiva entre carbono orgânico

disponível e temperatura com os parâmetros de crescimento do patógeno. Os resultados desse estudo foram contrários à visão que os patógenos entéricos não podem crescer em água doce natural devido à falta de nutrientes orgânicos.

Toothman (2009) afirma que os organismos autotróficos são capazes de fixar carbono, logo, não são limitados pelo carbono orgânicos. Já os organismos heterotróficos e as bactérias entéricas dependem de alguma fonte externa de carbono orgânico.

Gregory (2017) demonstrou que a sobrevivência de *Escherichia coli* melhora com a adição de nutrientes, o que vai ao encontro ao mostrado nesse estudo. Nos ensaios com suplementação de nutrientes foi observado um crescimento maior que nas amostras sem suplementação, exceto para o fósforo que apresentou valores de crescimento bem próximos dos ensaios sem suplementação.

Ainda no estudo de Gregory (2017), o crescimento heterotrófico tanto na água quanto no sedimento foi mais afetado após alterações nutricionais, sugerindo que o aumento da atividade heterotrófica pode ser responsável pela ausência de crescimento da *Escherichia coli*. Esse mesmo estudo ainda indica que a adição de nutriente gerou um estímulo para o crescimento das bactérias heterotróficas, porém o mesmo não ocorreu para a *Escherichia coli*, isso sugere que heterotróficos foram capazes de utilizar os nutrientes disponíveis e superar a *Escherichia coli*.

5.4.2 Água cinza bruta estéril acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio com suplementação de 0,2 g/L de fósforo e suplementação de 1g/L de nitrogênio

Ao se alterar dois nutrientes essenciais foi possível observar crescimento nas primeiras 24 horas. Esse crescimento é observado até o tempo 96 horas. Após esse período a população de *Escherichia coli* entra em declínio não sendo mais detectada ao método utilizado.

A queda abrupta da população de *Escherichia coli* pode ser avaliada pela possível toxicidade causada pela conversão do nitrogênio em amônio, que pode ter sido máxima no tempo 72 horas, assim como a diminuição de nutrientes presentes na amostra. Outra questão é uma possível reação que pode ter ocorrido entre os meios utilizados para suplementação.

Nos apêndices apresentados a seguir é possível observar os valores de DO das amostras analisadas em função do tempo. Em algumas amostras foram observados

o aumento cada vez maior da DO, e ao plaquear, ou cartelar a amostra não era possível detectar a presença de *Escherichia coli* isolada do meio.

Além disso sempre após a esterilização da água cinza bruta era realizado o teste HPC, que mesmo mostrando resultados negativos, observava-se em algumas placas contaminação, sendo que foi inoculado somente *Escherichia coli* isolada do meio na água cinza bruta estéril, logo, essa contaminação pode ser explicada pelo estado VBNC, ou seja, após a esterilização da água cinza bruta algum microrganismo pode ter assumido esse estado, não sendo assim detectado no teste HPC, e ao ser introduzido, por exemplo, algum nutriente ao meio, ele assume a forma cultivável novamente, já que agora possui condições favoráveis a sua sobrevivência.

Também não se pode afirmar que após o período de declínio das amostras, principalmente aquelas que o NMP ou UFC, foram nulo, o meio estaria totalmente isento de *Escherichia coli*, ou qualquer outro microrganismo que não tenha sido detectado pelo teste HPC.

Wang *et al.*, (2008) afirmam que ultrafiltração em escala industrial de águas subterrâneas durante a produção de água potável remove a maioria das bactérias presentes no meio, porém algumas conseguem passar pela filtração, gerando um novo crescimento descontrolado após a filtração, introduzindo assim um risco potencial para o crescimento microbiano indesejado (WANG *et al.*, 2008)

De uma forma geral a disponibilidade de nutrientes como fósforo, nitrogênio e carbono é um fator importante que influencia na sobrevivência e crescimento da *Escherichia coli* no meio ambiente, os ambientes naturais normalmente são pobres em nutrientes disponíveis, quando se comparado com o trato intestinal de animais de sangue quente. Devido sua versatilidade, a *Escherichia coli* consegue degradar vários tipos de substratos de carbono, incluindo os compostos aromáticos (DÍAZ *et al.*, 2001). Conforme Franchini e Egli (2006), a *Escherichia coli* possui uma flexibilidade catabólica em condições limitadas de carbono, com isso é possível uma maior sobrevivência dela no meio ambiente.

Além disso a *Escherichia coli* O157 é capaz de proliferar em baixas condições de substratos, além de crescer em competição com outras bactérias originárias de ambientes pobres em nutrientes (VITAL *et al.*, 2008). Estudos relatam que bactérias indígenas limitam significativamente o crescimento de bactérias entéricas no ambiente (CAMPER *et al.*, 1985 ; VAN ELSAS *et al.*, 2007).

Estudos de LeChevallier *et al.*, (1996) e Camper *et al.*, (2000) demonstram uma relação entre a concentração de carbono e ocorrência de bactérias coliforme em diferentes sistemas de água potável.

Um outro fator importante, até limitante para o crescimento e competição no meio ambiente é a temperatura, sabe-se que a *Escherichia coli* é influenciada por temperaturas ditas ideais (Raghuberer e Maches, 1990).

6 CONCLUSÕES

A densidade de *Escherichia coli* isolada do meio detectada na amostra de água cinza bruta foi de $4 \log_{10}$. Essa densidade foi constante durante todo o período monitorado. O comportamento da *Escherichia coli* isolada do meio em água cinza bruta mostra que, a mesma manteve-se em fase estacionária por 6 dias, apresentando crescimento exponencial até o sétimo dia de incubação onde voltou a entrar em fase estacionária por 2 dias e entrou em declínio. Mesmo com baixa concentração de nutrientes como nitrogênio e fósforo presentes na amostra de água cinza, ocorreu um crescimento da população presente no meio após 6 dias de incubação. Tal comportamento pode evidenciar a capacidade da *Escherichia coli* isolada do meio a adaptar-se ao meio mantendo-se presente na água cinza.

Quanto a influência de nutrientes no crescimento/sobrevivência da *Escherichia coli* isolada do meio em água cinza bruta estéril a amostra suplementada com fósforo nas concentrações testadas não fez diferença significativa no crescimento da bactéria analisada. Por outro lado, quando a água cinza bruta estéril foi suplementada com diferentes concentrações de nitrogênio observou-se diferença no crescimento/sobrevivência da *Escherichia coli* isolada do meio. Na amostra suplementada com 10g/L de nitrogênio foi observado uma maior densidade de *Escherichia coli* e um maior tempo de sobrevivência da mesma antes da fase de declínio. Esse comportamento da *Escherichia coli* frente a concentração de nitrogênio na água cinza abre a discussão a respeito do ato de urinar no banho, que pode ser prejudicial à qualidade microbiológica da água cinza.

Ainda quanto a influência da amostra suplementada com carbono, temos que a amostra com suplementação de glicose apresentou maior crescimento da população de *Escherichia coli*, mesmo a dextrose não sendo uma fonte mais apropriada para suplementação da glicose, porém, esse aumento demonstra a enorme capacidade da *Escherichia coli* em absorver carbono do meio em que se encontra.

7 RECOMENDAÇÕES

Realizar um maior número de repetições das amostras utilizando os métodos cromofluorogênico e contagem de placas.

Avaliar o possível estado VBNC dos microrganismos, que mesmo em meios adversos ao seu, podem se adaptar e apresentar novamente um estado cultivável.

Avaliar a presença de outros microrganismos presentes na água cinza como *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphilococos* e *Enterococos* quando se há suplementação de nutrientes.

Avaliar a toxicidade da amônia em diferentes concentrações, para que se consiga detectar o limite de toxicidade mínimo para a *Escherichia coli* isolada do meio.

Utilizar outra fonte rica em glicose (lactose ou galactose), para se avaliar o comportamento da *Escherichia coli* isolada do meio.

Utilizar soluções de nutrientes previamente estéreis, evitando assim uma possível contaminação da água cinza utilizada.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, E., REZAEI, M.; HOSSEINI, H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 177-183, 2014.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.004>>

Acesso em: 28 de out. 2018.

AJONINA, C., et al. Microbial pathogens in wastewater treatment plants (WWTP) in Hamburg. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 78, n. 6 p. 381–387, 2015.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15287394.2014.989626>>

Acesso em: 25 out. 2018.

AL-GHEETHI, A. *et al.* Reduction of microbial risk associated with greywater by disinfection processes for irrigation. **Journal of water and health**, v. 14, n. 3, p. 379-398, 2016.

Disponível em: <<https://doi.org/10.2166/wh.2015.220>>

Acesso em: 01 de mai. 2018.

AL-JAYYOUSI, O. R. Greywater reuse: towards sustainable water management. *Desalination*, v. 156, n. 1-3, p. 181-192, 2003.

Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(03\)00340-0](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(03)00340-0)>

Acesso em: 01 de mai. 2018.

ALMEIDA, G. S. **Metodologia para caracterização de efluentes domésticos para fins de reuso: estudo em Feira de Santana**, Bahia. 2007. 226 f. Dissertação (Mestrado em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais no Processo Produtivo) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2007.

ALSULAILI, A. D.; HAMODA, M. F.; AL-JARALLAH, R.; ALRUKAIBI, D. Treatment and potential reuse of greywater from schools: a pilot study. **Water Science and Technology**, p. 2119-2129, v. 75 2017.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28498124>>

Acesso em: 30 de ago. 2018.

ANDERSON, K. L.; WHITLOCK, J. E.; HARWOOD, V. J. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, p. 3041–3048, 2015.

Disponível em: <[10.1128/AEM.71.6.3041-3048.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3041-3048.2005)>

Acesso em: 30 de ago. 2018.

ANDREWS, W. H.; DIGGS, C. D.; WILSON, C. R. Evaluation of a medium for the rapid recovery of *Escherichia coli* from shellfish. **Appl. Microbiol**, v. 29 p. 130-131, 1975.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186928/>>

Acesso em: 30 de ago. 2018.

APDA - Bactérias Coliformes. 2012a.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION *et al.* **Standard methods for the examination of water and wastewater**. American Public Health Association Publisher. Washington, DC, 2005.

ARTZ, R. R.; AVERY, L. M.; JONES, D. L.; KILLHAM, K. Potential pitfalls in the quantitative molecular detection of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental matrices. **Can J Microbiol**, v. 52, p. 482–488, 2006.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1139/w05-149>>

Acesso em: 01 de mai. 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **CB-02**: Uso de Fontes Alternativas de Água Não Potável em Edificações – texto provisório. Rio de Janeiro. 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15527**: Aproveitamento de água de chuva para áreas urbanas e fins não potáveis. Rio de Janeiro, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13969**: Tanques sépticos - unidades de tratamento complementar e disposição final dos efluentes líquidos – projeto, construção e operação. Rio de Janeiro, 1997.

BANNING, N.; TOZE, S.; MEE, B. J. *Escherichia coli* survival in groundwater and effluent measured using a combination of propidium iodide and the green fluorescent protein. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 69–76, 2002.

Disponível em: < <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01670.x>>

Acesso em: 14 ago. 2018.

BARRETO, D. Perfil do consumo residencial e usos finais da água. **Revista Ambiente Construído**, v. 8, n. 2, p. 23-40, ABR./JUN. 2008.

BARRETT, T. J.; FENG, P.; SWAMINATHAN, B. Amplification methods for detection of food-borne pathogens. In: LEE, H.; MORSE, S. A.; OLSVIK, O. (Org.). **Nucleid acid amplification technologies: application to disease diagnosis**. USA: Biotechnique Books, 1997. p. 171-183.

BEARDSLEY, M. L. and COFFEY, J. M. Bioaugmentation: optimizing biological wastewater treatment. **Pollut. Engng.** December, p. 30–33, 1985.

BENAMI, M.; BUSGANG, A.; GILLOR, O.; GROSS, A. Quantification and risk associated with bacterial aerosol near domestic greywater – treatment systems. **Science of the Total Environment**, v. 562, p. 344-352, 2016.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.200>>

Acesso em: 10 de set. 2018.

BENASSI, S., Projeto de Lei nº 664/2007 Reutilização da água nas garagens de empresas de ônibus. Câmara Municipal de Campinas 2007.

BENNETT, E. M.; CARPENTER, S. R.; CARACO, N. F. Human impact on erodible phosphorus and eutrophication: a global perspective: increasing accumulation of phosphorus in soil threatens rivers, lakes, and coastal oceans with eutrophication. **BioScience**, v. 51, p. 227-234, 2001.

Disponível em: < [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0227:HIOEPA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0227:HIOEPA]2.0.CO;2)>

Acesso em: 23 jun. 2018.

BETTELHEIM, K. A. The genus *Escherichia coli*. In *The Prokaryotes*. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.H. (eds). New York, USA: **Springer Verlag**, p. 2696–2736, 1992.

BIRKS, R.; HILLS, S. Characterisation of indicator organisms and pathogens in domestic greywater for recycling. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 129, p. 61-69, 2007.

Disponível em: < [10.1007/s10661-006-9427-y](https://doi.org/10.1007/s10661-006-9427-y)> Acesso em: 10 de set. 2018.

BJERGBAEK, L. A.; ROSLEY, P. Formation of non-culturable *Escherichia coli* in drinking water. **J. Appl. Microbiol.** v. 99, p. 1090-1098, 2005.

BOGOSIAN, G.; SAMMONS, L. E.; MORRIS, P. J.; O'NEIL, J. P.; HEITKAMP, M. A.; WEBER, D. B. Death of the *Escherichia coli* K-12 strain W3110 in soil and water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4114–4120, 1996.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168233/>>

Acesso em: 13 nov. 2018.

BOYJOO, Y. *et al.* A review of greywater characteristics and treatment processes. **Water Science and Technology**, v. 67, n. 7, p. 1403-1424, 2013.

Disponível em: < <https://doi.org/10.2166/wst.2013.675>>

Acesso em: 11 ago. 2018.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CNRH. Resolução nº 54 de 28 de novembro 2005, **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 de março de 2006. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras – Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos**. São Paulo, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DAS CIDADES E INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERAÇÃO PARA A AGRICULTURA – IICA. **PRODUTO II - EXPERIÊNCIAS DE REÚSO (RP01A)**: Elaboração de Proposta do Plano de Ações para Instituir uma Política de Reuso de Efluente Sanitário Tratado no Brasil. Brasília, 2016. 200 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DAS CIDADES E INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERAÇÃO PARA A AGRICULTURA – IICA. **PRODUTO IV – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REÚSO (RP01C)**: Relatório técnico contendo o levantamento nacional referente às potencialidades de reuso de efluente sanitário tratado no Brasil assim como a discussão sobre as questões institucionais relacionadas ao reuso de efluente sanitário tratado no Brasil. Brasília, 2017. 294 p.

BUCKALEW, D.; HARTMAN, L.; GRIMSLEY, G.; MARTIN, A.; REGISTER, K. A long-term study comparing membrane filtration with Colilert defined substrates in detecting fecal coliforms and *Escherichia coli* in natural waters. **Journal of Environmental Management**. v. 80, p. 191-197, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.08.024>> Acesso em: 11 ago. 2018.

CAMPER, A. K.; BUTTERFIELD, P. W.; ELLIS, B. D.; JONES, W. L.; HUCK, P. M.; ANDERSON, W. B.; VOLK, C.; WELCH, N. J.; LECHEVALLIER, M. W. Investigation of the Biological Stability of Water in Treatment Plants and Distribution Systems. **American Water Works Association Research Foundation**, 2000.

CAMPER, A. K.; MCFETERS, G. A.; CHARACKLIS, W. G.; JONES, W. L. Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2233–2239, 1991. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC183556/>> Acesso em: 11 ago. 2018.

CAMPER, A. K.; LECHEVALLIER, M. W.; BROADAWAY, S. C.; MCFETERS, G. A. Growth and persistence of pathogens on granular activated carbon filters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 1378-1382, 1985.

CARLSSON, P.; CARON, D. A. Seasonal variation of phosphorus limitation of bacterial growth in a small lake. **Limnol. Oceanogr.** v. 46, p. 108-120, 2011.

CHAI, T. J. Characteristics of *Escherichia coli* grown in bay water as compared with rich medium. **Appl Environ Microbiol**, v. 45, p. 1316–1323, 1983. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC242457/>> Acesso em: 15 dez. 2018.

CHAILLOU, K.; GÉRENTE, C.; ANDRÈS, Y.; WOLBERT, D. Bathroom greywater characterization and potential treatments for reuse. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 215, n. 1-4, p. 31-42, 2011.

CHRISPIM, M. C.; NOLASCO, M. A. Greywater treatment using a moving bed biofilm reactor at a university campus in Brazil. **Journal of Cleaner Production**, v. 142, p. 290-296, 2017. Disponível em: <[10.1016/j.jclepro.2016.07.162](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.162)> Acesso em: 15 dez. 2018.

CHUDOBA, E. A.; MALLIN, M. A.; CAHOON, L. B.; SKRABAL, S. A. Stimulation of fecal bacteria in ambient waters by experimental inputs of organic and inorganic phosphorus. **Water Research**. v. 47, n. 10, p. 3455-3466, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.047>>. Acesso em: 10 out. 2018.

CHRZANOWSKI, T. H.; STERNER, R. W.; ELSER, J. J. Nutrient enrichment and nutrient regeneration stimulate bacterioplankton growth. **Microb. Ecol.** V. 29, p. 221-230, 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24185342>>

COUTO, E. D. A. *et al.* Greywater treatment in airports using anaerobic filter followed by UV disinfection: an efficient and low-cost alternative. **Journal of Cleaner Production**, v. 106, p. 372-379, 2015.

Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.07.065> .>
Acesso em: 25 nov. 2018.

DANIEL, L. A. *et al* (Coord.). Processos de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável. **Projeto PROSAB**. São Paulo, 2001.

DE LUCA, G.; SACCHETTI, R.; LEONI, E.; ZANETTI, F. Removal of indicator bacteriophages from municipal wastewater by a full-scale membrane bioreactor and a conventional activated sludge process: implications to water reuse. **Bioresour. Technol.** v. 129, p. 526-531, 2013

DÍAZ, E.; FERRÁNDEZ, A.; PRIETO, M. A.; GARCIA, J. L. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. **Microbiol Mol Biol Rev.** v. 65, p. 523-569, 2001.

Disponível em:<[10.1128/MMBR.65.4.523-569.2001](http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.65.4.523-569.2001)>

Acesso em: 12 out. 2018.

DIXON, A.; BUTLER, D.; FEWKES, A. Water saving potential of domestic systems using greywater and rainwater in combination. **Water Science Technology.** v. 39, n. 5, p. 25-32, 1999.

Disponível em:< [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00083-9](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00083-9)>

Acesso em: 12 out. 2018.

DONNER, E. *et al*. Presence and fate of priority substances in domestic greywater treatment and reuse systems. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 2444-2451, 2010.

Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.02.033>>

Acesso em: 18 fev. 2018.

DUNGENI, M.; Merwe, R. R. & Momba, M. N. B. Abundance of pathogenic bacteria and viral indicators in chlorinated effluents produced by four wastewater treatment plants in the Gauteng Province, South Africa. **Water SA**, v. 36, p. 607–614, 2010.

EL-BAKRY, H. P.; SHEEHAN, J. Analysing cheese microstructure: A review of recent developments. **Journal of Food Engineering**, v. 125, p. 84-96, 2014.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.030>>

Acesso em: 29 jun. 2018.

ERCIN, A. E.; HOEKSTRA, A.Y. Water footprint scenarios for 20150: A global analysis. **Environment International**, v. 64, p. 71-82, 2014

Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.019>>.

Acesso em: 3 out. 2018.

ERIKSSON, E.; *et al*. Greywater pollution variability and loadings. **Ecological Engineering.** v. 35, n. 5, p. 661–669, 2009.

Disponível em:< [10.1016/j.ecoleng.2008.10.015](http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.10.015)>

Acesso em: 3 out. 2018.

ERIKSSON, E.; *et al*. Characteristics of grey wastewater. **Urban water**, v. 4, n. 1, p. 85-104, 2002.

Disponível em:< [10.1016/S1462-0758\(01\)00064-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1462-0758(01)00064-4)>

Acesso em: 29 jul.2018.

FEACHEM, R. G. Detection, survival, and removal of pathogens in the environment. In. Sanitation and disease health aspects of excreta and wastewater management. John Wiley & Sons, 1983.

FERREIRA, D. F.; GHISI, E. Potential for potable water savings by using rainwater and graywater in a multi-storey residential building in southern Brazil. **Building and Environment**, v. 42, p. 2512-2522, 2007.

Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2006.07.019>>

Acesso em: 18 de ago. de 2018.

FINLEY, S. *et al*. Reuse of domestic greywater for the irrigation of food crops. **Water Air Soil Pollut**, vol. 199, p. 235-245, 2009.

Disponível em:<[10.1007/s11270-008-9874-x](https://doi.org/10.1007/s11270-008-9874-x)>
Acesso em: 20 out. 2018.

FLINT, K. P. The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 63, p. 261-270, 1987.
Disponível em:<<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1987.tb04945.x>>
Acesso em: 20 out. 2018.

FONG, T-T; LIPP, E. K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 69, n. 2, p. 357–371, 2005
Disponível em:< [10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005](https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005)>
Acesso em: 10 jun. 2018.

FRANCHINI, A. G.; EGLI, T. Global gene expression in *Escherichia coli* K-12 during short-term and long-term adaptation to glucose-limited continuous culture conditions. **Microbiology**, v. 152, p. 21111-2127, 2006.
Disponível em:< [10.1099/mic.0.28939-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.28939-0)>
Acesso em: 13 fev. 2018.

FRANTA J.; WILDERER, P. A.; MIKSCH, K. and SYKORA V. Effects of operation conditions on advanced COD removal in activated sludge systems. **Water Sci. Technol.** v. 29, n. 7, p. 189–192, 1994.
Disponível em:< <https://doi.org/10.2166/wst.1994.0341>>
Acesso em: 13 fev. 2018.

FRIEDLER, E.; YARDENI, A.; GILBOA, Y.; ALIFIYA, Y. Disinfection of greywater effluent and regrowth potential of selected bacteria. **Water Science and Technology**, v. 63, n. 5, p. 931-940, 2011.
Disponível em:< [10.2166/wst.2011.272](https://doi.org/10.2166/wst.2011.272)>
Acesso em: 23 de mai. 2018.

FUJIOKA, R. S.; UNUTOA, T. M. Comparative stability and growth requirements of *S. aureus* and faecal indicator bacteria in seawater. **Water Sci Technol**, v. 54, p. 169–175, 2006.
Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17037149?dopt=Abstract>>
Acesso em: 23 mai. 2018.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Manual de saneamento**. Brasília, 2006.

GAUTHIER, M. J.; MUNRO, P. M.; MOHAJER, S. Influence of salts and sodium chloride on the recovery of *Escherichia coli* from seawater. **Current Microbiology**, v. 15, p. 5–10, 1987.
Disponível em:< <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01577205>>
Acesso em: 13 nov. 2018

GENNACCARO, A. L., et al. Infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in final reclaimed effluent. **Applied and Environmental Microbiol.** v. 69, p. 4983–4984, 2003.
Disponível em:< [10.1128/AEM.69.8.4983-4984.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4983-4984.2003)>
Acesso em: 10 jun. 2018.

GILBOA, Y.; FRIEDLER, E. UV disinfection of RBC-treated light greywater effluent: kinetics, survival and regrowth of selected microorganisms. **Water Research**, v. 42, n. 4-5, p. 1043-1050, 2008
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2007.09.027>.>
Acesso em: 18 mar. 2018.

GIDEON, P. W., et al. A study of the microbial quality of grey water and evaluation of treatment technologies for reuse. **Ecological Engineering**, v. 32, n. 2, p. 187-197, 2008.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2007.11.001>>
Acesso em: 18 mar. 2008.

GONÇALVES, R. F.; SIMÕES, G. M. S.; WANKE, R. Reuso de águas cinzas em edificações urbanas – estudo de caso em Vitória (ES) e Macaé (RJ). **Revista AIDIS**, v. 3, n. 1, p. 120-131, 2010.

GONÇALVES, R. F.; JANUZZI, E. P. J. Introdução. In: GONÇALVES, R. F, *et al.* (Ed.). **Conservação de águas e energia em sistemas prediais e públicos de abastecimento de água**. Rio de Janeiro: ABES, 2009. p. 21-35.

GONÇALVES, R. F. *et al.* (Coord.). Uso racional da água em edificações. **Projeto PROSAB**. Rio de Janeiro: ABES, 2006.

GRAY, B.; STECK, T.R. Concentrations of copper thought to be toxic to *Escherichia coli* can induce the viable but nonculturable condition. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, p. 5325–5327, 2001.

Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC93308/>>

Acesso em: 18 mar. 2018.

GREGORY, L.F.; KARTHIKEYAN, R.; PETERSON, J. A. A.; GENTRY, T. J.; WAGNER, K. L.; HARMEL, R. D. Nutrient loading impacts on culturable *E. coli* and other heterotrophic bacteria fate in simulated stream mesocosms. **Water Research**, v. 126, p; 442-449, 2017.

Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.09.043>>

Acesso em 12 mar. 2018.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other Enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiologic Reviews**, v. 13, p. 60-98, 1991.

Disponível em:< <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036079>>

Acesso em: 23 de jul. 2018.

GROSSI, M.; LAZZARINI, R.; LANZONI, M.; POMPEI, A.; MATTEUZZI, D.; RICCO, B. A portable sensor with disposable electrodes for water bacterial quality assessment. **Sensors Journal**. v. 13, p. 1775–1782, 2013.

Disponível em:< [10.1109/JSEN.2013.2243142](https://doi.org/10.1109/JSEN.2013.2243142) 2013.>

Acesso em: 23 jun. 2018.

GROSS, A., MAIMON, A., ALFIYA, Y., FRIEDLER, E. Greywater reuse. **CRC Press**, NewYork, p. 1–258, 2015.

GROSS, A.; SHMUELI, O.; RAVEH, E. Recycled vertical flow constructed wetland (RVFCW) – a novel method of recycling graywater for irrigation in small communities and households. **Chemosphere**, v. 66, n. 5, p. 916-923, 2007.

Disponível em: <[http:// dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.06.006](http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.06.006)>

Acesso em: 19 de mai. 2018.

GUANAYEM, M. Environmental considerations with respect to rainwater harvesting. Palestine, Applied Research Institute-Jerusalem. In: Rainwater International Systems. Manheim. **Proceedings, Germany**, 2001. 11p.

HENIS, Y.; GURIJALA, K. R.; ALEXANDER, M. Factors involved in multiplication and survival of *Escherichia coli* in lake water. **Microb Ecol**, v. 17, p. 171–180, 1989.

Disponível em:< [10.1007/BF02011851](https://doi.org/10.1007/BF02011851).>

Acesso em: 12 ago. 2018.

ICMSF - Microorganismos de los Alimentos 1: Su significado y métodos de enumeración. 2ª Edição. Editorial **ACRIBIA. SA**. Zaragoza, Espanha, 2000.

IGNOTO R. F. **Avaliação quantitativa de risco microbiológico em águas e biossólidos: estado da arte**. 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública – USP. São Paulo, 2010.

IDEXX. Validação do método Colilert-18/Quanti-Tray para contagem de *E. coli* e bactérias coliformes em água. [Versão Eletrônica], 2011.

Disponível em:<http://www.idexx.co.uk/pdf/en_au/water/7542-01-colilert-18-reportport.pdf>

Acesso em: 10 jun. 2018.

ISHII, S.; SADOWSKY, M.J. *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. **Microbes and Environments**, v. 23, n. 2, p. 101–108, 2008.

Disponível em: < https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsme2/23/2/23_2_101/article>

Acesso em: 25 set. 2018.

ISHII, S.; YAN, T.; VU, H.; HANSEN, D. L.; HICKS, R. E.; SADOWSKY, M. J. Factors controlling long-term survival and growth of naturalized *Escherichia coli* populations in temperate field soils. **Microbes Environ**, v. 25, p. 8–14, 2010.

Disponível em: < <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09172>>

Acesso em: 10 jun. 2018.

JANG, H.; *et al.*, Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications – a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, p. 570-581, 2017.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28383815>>

Acesso em: 20. Set. 2018.

JARDIM, W. F.; CANELA, M. C. Fundamentos da oxidação química no tratamento de efluentes e remediação de solos. **Caderno Temático-UNICAMP**. v. 1, 2004.

JAY, J. **Modern food micorbiology**. Maryland: Aspen Publishers, 2000. 625 p.

JAY, J.; LOESSNER, M.; GOLDEN, D. Modern Food Microbiology. 7ª Ed. **Springer Science and Business Media**, Inc. New York, EUA, 2005.

JOHANNES, R. E. Uptake and release of dissolved organic phosphorus by representatives of a coastal marine ecosystem. **Limnology Oceanography**, v. 9, p. 224-234, 1964.

Disponível em: < <https://doi.org/10.4319/lo.1964.9.2.0224>>

Acesso em: 13 jan. 2018.

JOHANSSON, M.; *et al.* Urine separation– closing the nutrient cycle. **Verna Ecology. Stockholm**, 2001.

KATUKIZA, A. Y.; RONTELTAP, M.; NIWAGABA, C. B.; KANSIIME, F. e LENS, P. N. L. Grey water characterisation and pollutant loads in an urban slum. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 2, p. 423-436, 2015.

Disponível em: < <http://www.bioline.org.br/pdf?st15037>>

Acesso em: 20 set. 2018.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbioly**, v. 2, p. 123–140, 2004.

Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nrmicro818>>

Acesso em: 20 set. 2018.

KEELY, S. P., *et al.* Characterization of the relative importance of human – and infrastructure – associated bacteria in grey water: a case study. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 289-301, 2015.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12835>>

Acesso em: 10 mai. 2018.

KEIL, R.; KIRCHMAN, D. L. Contribution of dissolved free amino acids and ammonium to the nitrogen requirements of heterotrophic bacterioplankton. **Ecol Prog Ser**, v. 73, p. 1-10, 1991.

KIRCHMAN, D.L.; DUCKLOW, H. W.; MCCARTHY, J. J.; GARSIDE, C. Biomass and nitrogen uptake by heterotrophic bacteria during the spring phytoplankton bloom in the North Atlantic Ocean. **Deep-Sea Res**, v. 41, p. 879–895, 1994.

Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0967-0637\(94\)90081-7](https://doi.org/10.1016/0967-0637(94)90081-7)>

Acesso em: 18 jun. 2018.

KNUPP A. M. **Desempenho de um sistema composto por um filtro anaeróbio e um “wetland” horizontal na produção de água para reuso predial a partir de água cinza clara**. 2013. 157 f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2013.

KOCHARUNCHITT, C. **Effects of cold temperature and water activity stress on the physiology of *Escherichia coli* in relation to carcasses.** 2012. 251 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – University of Tasmania, UTAS, Tasmania, Australia, 2012.

KUBITSCHKEK, H. E. Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 94-101, 1990.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC208405/>

Acesso em: 30 mar. 2018.

KUJAWA-ROELEVELD, K., e ZEEMAN, G. Anaerobic treatment in decentralised and source-separation-based sanitation concepts. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technol.**, v. 5, n. 1, p. 15–139, 2006.

LAAFAT, J.; AZIZ, F.; OUZZANI, N.; MANDI, L. Biotechnological approach of greywater treatment and reuse for landscape irrigation in small communities. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, p. 83-90, 2017.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.01.006> >

Acesso em: 30 mar. 2018.

LAMINE, M.; BOUSSELMI, L.; GHARABI, A. Biological treatment of grey water using sequencing batch reactor. **Desalination**, v. 215, n.1, p. 8-10, 2007.

Disponível em: < <10.1016/j.desal.2006.11.01> >

Acesso em: 28 abr. 2018.

LECHEVALLIER, M. W; WELCH, N. J.; SMITH, D. B. Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2201-2211, 1996.

LEONG, J. Y. C; CHONG, M. N.; POH, P. E. Assessment of greywater quality and performance of a pilot-scale decentralised hybrid rainwater-greywater system. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 81-91, 2018.

Disponível em: < <10.1016/j.jclepro.2017.10.172> >

LLEÒ, M.M.; PIEROBON, S.; TAFI, M.C.; SIGNORETTO, C.; CANEPARI, P. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, p. 4564–4567, 2000.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92344/> >

Acesso em: 19 jul. 2018.

LIMA, D. C.; CHAVES, M.; LIMA, A. C.; LIMA, D. L. Reuso de água para irrigação: uma abordagem reflexiva. In: II COLÓQUIO SOCIEDADE POLÍTICAS PÚBLICAS, CULTURA E DESENVOLVIMENTO, 2., 2012, Ceará. **Anais...** Ceará: Universidade Regional do Cariri, 2012. p. 1-18.

LIU, Y.; WANG, C.; TYRRELL, G.; HRUDEY, S. E.; LI, X. F. Induction of *Escherichia coli*. **Environ. Microbiol. Rep.** v. 1, p. 155-161, 2009.

LOPEZ-ROLDAN, R.; TUSSEL, P.; CORTINA, J. On-line bacteriological detection in water. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 44, p. 46-57, 2013.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2012.10.010> >

Acesso em: 21 mar. 2018.

LUSTER-TEASLEY, S.; IVES, R. Case teaching notes for “Farmville Future? CAFOs and Contamination”. **University at Buffalo**. Nova Iorque, EUA, 2013.

MALLIN, M. A.; MCLVER, M. R.; ENSIGN, S. H.; CAHOON, L. B. Photosynthetic and heterotrophic impacts of nutrient loading to blackwater streams. **Ecological Applications**, v. 14, p. 823-838, 2004.

Disponível em: < <https://doi.org/10.1890/02-5217> >

MAIMON, A.; GROSS, A. Greywater: limitations and perspective. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 2, p. 1-6, 2018.

Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.11.005>>

Acesso em: 21 mar. 2018.

MANAFI, M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. **International Journal of Food Microbiology**. v. 60, p. 205–218, 2000.

Disponível em:<[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00312-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00312-3)>

Acesso em: 21 mar. 2018.

MANDAL, D.; LABHASETWAR, P.; DHONE, S.; DUBEY, A. S.; SHINDE, G.; WATE, S. Water conservation due to greywater treatment and reuse in urban setting with specific context to developing countries. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 55, n. 3, p. 356-361, 2011.

Disponível em:< <10.1016/j.resconrec.2010.11.001>>

Acesso em: 15 ago. 2018.

MARCH, J. G.; GUAL, M. Studies on chlorination of greywater. **Desalination**, v. 249, n. 1, p. 317-322, 2009.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2009.09.005>>

Acesso em: 15 ago. 2018.

MELO, J.; ANDREW, P. W.; FALEIRO, M. L. *Listeria monocytogenes* in cheese and dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. **Food Research International**, v. 67, n. 1, p. 75-90, 2015.

Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.031>>

Acesso em: 28 jun. 2018.

METCALF & EDDY, Inc. Wastewater Engineering-Treatment, Disposal and Reuse. In McGraw-Hill Series in Water Resources and Environmental Engineering, 3º ed. G. Tchobanoglous and F. L. Burton. (Eds.), **Macgraw Hill**, New York, 1991.

MONTE H. M. do; ALBUQUERQUE, A. Reutilização de Águas Residuais. Lisboa: **Ed. Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos e Instituto Superior de Engenharia de Lisboa**, 2010.

Disponível em:

< https://www.researchgate.net/publication/232430294_Reutilizacao_de_Aguas_Residuais>

Acesso em: 28 jun. 2018.

MORITA, R. Y. Bacteria in Oligotrophic Environments. New York, USA: **Chapman & Hall**, 1997.

MURATA, M., *et al.* Molecular strategy for survival at a critical high temperature in *Escherichia coli*. **PLoS ONE**. v. 6, n. 6, 2011.

Disponível em: <<http://doi:10.1371/journal.pone.0020063>>

Acesso em: 19 out. 2018.

MURR, A. C.; THACKSTON, E. L.; ADAMS, W. R.; SPEECE, R. E. Modeling of Fecal Coliform Bacteria in the Cumberland River Near Nashville. Technical report 44. **Environmental and Water**, 1995.

NOLDE, E. Greywater reuse systems for toilet flushing in multi-storey buildings—over ten years experience in Berlin. **Urban Water**. V. 1, n. 4, p. 275–284, 2000

Disponível em:< [https://doi.org/10.1016/S1462-0758\(00\)00023-6](https://doi.org/10.1016/S1462-0758(00)00023-6)>

Acesso em: 19 out. 2018.

NOUTSOPOULOS, C. *et al.* Greywater characterization and loadings—Physicochemical treatment to promote onsite reuse. *Journal of environmental management*, v. 216, p. 337-346, 2018.

Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.094>>

Acesso em: 19 out. 2018.

ODONKOR, S.; AMPOFO, J. *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. **Microbiology Research**. v. 4, p. 5-11, 2013.

Disponível em:< [10.4081/mr.2013.e2](https://doi.org/10.4081/mr.2013.e2)>
Acesso em: 19 out. 2018.

OLIVER, J.D.; BOCKIAN, R. In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. **Appl Environ Microbiol**, v. 61, p. 2620–2623, 1995.
Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167533/>>
Acesso em: 12 jun. 2018.

ORON, G. *et al.* Greywater use in Israel and worldwide: standards and prospects. **Water research**, v. 58, p. 92-101, 2014.
Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.032>>
Acesso em: 12 jun. 2018.

O'TOOLE, J., *et al.* Microbial quality assessment of household greywater. **Water Research**, v. 46, n. 13, p. 4301- 4313, 2012.
Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.05.001>.>
Acesso em: 25 set. 2018.

OTTOSON, J.; STRENSTRÖM, T. A. Faecal contamination of greywater and associated microbial risk. **Water Research**. v. 37, n. 3, p. 645-655, 2003.

PALMQUIST, H; HANÆUS J. Hazardous substances in separately collected grey- and blackwater from ordinary Swedish households. **Science of the Total Environment**. v. 348, p. 151-163, 2005.
Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.052>>.
Acesso em: 25 set. 2018.

PAULO, P. L.; BEGOSSO, L.; PANSONATO, N.; SHRESTHA, R. R.; BONCZ, M. A. Design and configuration criteria for wetland systems treating greywater. **Water Science and Technology**, v. 60, n. 8, p. 2001-2007, 2009.
Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/267226249_Greywater_Treatment_in_Constructed_Wetland_at_Household_Level>
Acesso em: 25 set. 2018.

PENN, R.; HADARI, M.; FRIEDLER, E. Evaluation of the effects of greywater reuse on domestic wastewater quality and quantity. **Urban Water Journal**. v. 9, n. 3, p. 137-148, 2012.
Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1080/1573062X.2011.652132>.>
Acesso em: 12 dez. 2018.

PERRY, J.; FREYDIERE, A. The application of chromogenic media in clinical microbiology. **Journal Applied Microbiology**. v. 103, p. 2046-2055, 2007.
Disponível em:<[10.1111/j.1365-2672.2007.03442.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03442.x).>
Acesso em: 12 dez. 2018.

PINTO, D.; ALMEIDA, V.; SANTOS, M. A.; CHAMBEL, L. Resuscitation of *E. coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 1601-1611, 2011.
Disponível em:< [10.1111/j.1365-2672.2011.05016.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05016.x)>
Acesso em: 24 out. 2018.

PINTO, U.; *et al.* Effects of greywater irrigation on plant growth, water use and soil properties. **Resources, Conservation and Recycling**. v. 54, p. 429–435, 2010.
Disponível em:< [10.1016/j.resconrec.2009.09.007](https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2009.09.007)>
Acesso em: 23 ago. 2018.

POMEROY, L. R. The strategy of mineral cycling. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 1, p. 171-190, 1970.
Disponível em:< <https://doi.org/10.1146/annurev.es.01.110170.001131>>
Acesso em: 14 nov. 2018.

POMMEPUY, M.; BUTIN, M.; DERRIEN, A.; GOURMELON, M.; COLWELL, R.R.; CORMIER, M. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, p. 4621–4626, 1996.

Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168287/>>

Acesso em: 7 out. 2018.

RAGHUBERER, E. V.; MATCHES, J. R. Temperature range for growth of *Escherichia coli* stereotype O157, H7 and selected coliforms in *E. coli* medium. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 803-805, 1990.

RAHMAN, I.; SHAHAMAT, M.; KIRCHMAN, P.A.; RUSSEK-COHEN, E.; COLWELL, R.R. Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable Shigella dysenteriae type 1. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, p. 3573–3578, 1994.

Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201857/>>

Acesso em: 14 nov. 2018.

RAVVA, S. V.; KORN, A. Extractable organic components and nutrients in wastewater from dairy lagoons influence the growth and survival of *Escherichia coli* O157. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2191–2198, 2007.

Disponível em:< [10.1128/AEM.02213-06](https://doi.org/10.1128/AEM.02213-06)>

Acesso em: 10 out. 2018.

ROCHELLE-NEWALL, E.; *et al.* A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: knowledge gaps and future directions. **Front Microbiol**, v. 6, n. 308, p. 1-15, 2015.

Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4400915/pdf/fmicb-06-00308.pdf>>

Acesso em: 14 nov. 2018.

ROMPRÉ, A. *et al.* Detection and enumeration of coliforms in drinking water: Current methods and emerging approaches. **Journal of Microbiological Methods**, v. 49, n. 1, p. 31–54, 2002.

Disponível em:< [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00351-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00351-7)>

Acesso em: 11 nov. 2018.

ROTH, W. G.; LECKIE, M. P.; DIETZLER, D. N. Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine, **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 3142-3146, 1988.

Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC204440/>>

Acesso em: 11 nov. 2018.

RYU, H.; ALUM, A.; ABBASZADEGAN, M. Microbial characterization and population changes in nonpotable reclaimed water distribution systems. **Environmental Science and Technology**, v. 39, p. 8600-8605, 2005.

Disponível em:< [10.1021/es050607i](https://doi.org/10.1021/es050607i)>

Acesso em: 23 ago. 2018.

SANTOS, H. F. Critérios de Qualidade da Água para Reuso. **Revista DAE** 174, Dez 1993.

SAIDI, A.; MASMOUDI, K.; NOLDE, E.; EL AMRANI, B.; AMRAOUI, F. Organic matter degradation in a greywater recycling system using a multistage moving bed biofilm reactor (MBBR). **Water Science and Technology**, v. 76, n. 12, p. 3328-3339, 2017.

Disponível em:< [10.2166/wst.2017.499](https://doi.org/10.2166/wst.2017.499)>

Acesso em: 14 nov. 2018.

SAVAGEAU, M. A. *Escherichia coli* habitats, cell types and molecular mechanisms of gene control. **American Naturalist**, v. 122, p. 732-744, 1983.

Disponível em:< [10.1086/284168](https://doi.org/10.1086/284168)>

Acesso em: 15 nov. 2018.

SCHARDINGER, F. Ueber das Vorkommen Gährung erregender Spaltpilze im Trinkwasser und ihr Bedeutung für die hygienische Beurtheilung desselben [On the occurrence of fermentative bacteria in drinking water, and their significance for the hygienic evaluation thereof. **Wien Klin Wochenschr**, v. 5, p. 403–405, 1982.

SHUVAL, H. I.; COHEN, J.; KOLODNEY, R. Regrowth of coliforms and fecal coliforms in chlorinated wastewater effluent. **Water Research**, v. 7, p. 537-546, 1973.

Disponível em:< [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(73\)90053-5](https://doi.org/10.1016/0043-1354(73)90053-5)>

Acesso em: 27 ago. 2018.

SILVA, C. H. P., et al. **Desenvolvimento e utilização de conservante químico em amostras de urina para análise microbiológicas (Urocultura) e rotina (E.A.S)**. XXXI CBAC, Salvador – RBAC, vol. 37(3): 137-147, 2005

SMITH, K.; LIU, S.; LIU, Y.; GUO, S. Can China reduce energy for water? A review of energy for urban water supply and wastewater treatment and suggestions for change. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 91, p. 41–58, 2018.

Disponível em:<[10.1016/j.rser.2018.03.051](https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.051)>

Acesso em: 10 jan. 2019.

SMITH, J.J.; HOWINGTON, J.P.; MCFETERS, G.A. Survival, physiological response and recovery of enteric bacteria exposed to a polar marine environment. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, p. 2977–2984, 1994.

Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201752/>>

Acesso em: 12 out. 2018.

SOARES, D. A. F. Considerações a respeito da reutilização das águas residuárias e aproveitamento das águas pluviais em edificações. Vitória: **ABRH**,1999. In: Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, 12, Vitória, Anais.

SUNDARESHWAR, P. V.; MORRIS, J. T.; KOEPFLER, E. K.; FORNWALT, B. Phosphorus limitation of coastal ecosystem processes. **Science**, v. 299, p. 563-565, 2003.

Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12543975>>

Acesso em: 12 out. 2018.

TAL, T.; SATHASIVAN, A.; KRISHNA, K. C. B. Effect of different disinfectants on grey water quality during storage. **Journal of Water Sustainability**, v. 1, n. 1, p. 127-137, 2011.

TAYMAZ-NIKEREL, H.; BORUJENI, A. E.; VERHEIJEN, P. J.; HEIJNEN, J. J.; VAN GULIK, W. M. Genome-derived minimal metabolic models for *Escherichia coli* MG1655 with estimated in vivo respiratory ATP stoichiometry. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 107, p. 369–381, 2010.

Disponível em:< [10.1002/bit.22802](https://doi.org/10.1002/bit.22802)>

Acesso em: 18 out. 2018.

TEH, X. Y.; et al. Decentralized light greywater treatment using aerobic digestion and hydrogen peroxide disinfection for non-potable reuse. **Journal of Cleaner Production**. v. 99, p. 305–311, 2015.

Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.03.015>>

Acesso em: 12 out. 2018.

THAYANUKUL, P.; KURISU, F.; KASUNGA, I.; FURUMAI, H. Evaluation of microbial regrowth potential by assimilable organic carbon in various reclaimed water and distribution systems. **Water Res.** v. 47, p. 225-232, 2013.

TING, C., et al. Detection of the common resistance genes in Gramnegative bacteria using gene chip technology. **Indian Journal of Medical Microbiology**. v. 31, p. 142.147, 2013.

Disponível em:< [10.4103/0255-0857.115230](https://doi.org/10.4103/0255-0857.115230)>.

Acesso em: 14 set. 2018.

TOMAZ, P. Aproveitamento de água de chuva para áreas urbanas e fins não potáveis. **Navegar Editora**, São Paulo, 2005, 2ª ed., 180p.

TOOTHMAN, B. R.; CAHOON, L.; MALLIN, M. A. Phosphorus and carbohydrate limitation of fecal coliform and fecal enterococcus within tidal creek sediments. **Hydrobiologia**, v. 636, p. 401-412, 2009.

Disponível em:< [1007/s10750-009-9969-4](https://doi.org/10.1007/s10750-009-9969-4)>

Acesso em: 14 set. 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TORTORELLO, M. Indicator organisms for safety and quality - uses and methods for detection: minireview. **Journal of AOAC International**. V, 86, p. 1208-1217, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TRAVIS, M. J.; et al. Greywater reuse for irrigation: effect on soil properties. **Science of The Total Environment**. v. 408, n. 12, p. 2501–2508, 2010.

Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.005>>

Acesso em: 23 ago. 2018.

TREVORS, J. T. Hypothesized origin of microbial life in a prebiotic gel and the transition to a living biofilm and microbial mats. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, p. 269-272, 2011.

TUNDISI, J.G. Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções. **Estudos Avançados**. v. 22, p. 7–16, 2008.

Disponível em:<<https://doi.org/10.1590/S0103-40142008000200002>>

Acesso em: 23 ago. 2018.

UNC, A.; GARDNER, J.; SPRINGTHORPE, S. Recovery of *Escherichia coli* from soil after addition of sterile organic wastes. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, p. 2287–2289, 2006.

Disponível em:< [10.1128/AEM.72.3.2287-2289.2006](https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2287-2289.2006)>

Acesso em: 23 ago. 2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Guidelines for Water Reuse**. Environmental Protection Agency and U.S. Agency for International Development, 2012.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Guidelines for Water Reuse**. Environmental Protection Agency and U.S. Agency for International Development, 2004.

VALENTINA R. S. D. **Gerenciamento da qualidade e da quantidade de água cinza em uma edificação residencial de alto padrão com vistas ao seu reuso não- potável**. 2009. 162 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória – ES, 2009.

VAN ELSAS, J. D.; HILL, P.; CHRONAKOVA, A.; GREKOVA, M.; TOPALOVA, Y.; ELHOTTOVA, D.; KRISTUFEK, D. Survival of genetically marked *Escherichia coli* O157:H7 in soil as affected by soil microbial community shifts. **The ISME Journal**, v. 1, p. 204-214, 2007.

VAZ, L. O. **Avaliação do risco microbiológico decorrente do reuso de águas cinza em uma edificação residencial de alto padrão**. 2009. 132 f. – Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória – Es, 2009.

VIANNA, J. T. D. da S. **Análise de alternativas para conservação de água em edificações residenciais funcionais em Brasília-DF**. 2017. 196 f. – Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília. Brasília – DF, 2017.

VITAL, M. FREDERIK, H. THOMAS, E. *Escherichia coli* O157 can grow in natural freshwater at low carbon concentrations. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 2387-2396, 2008.

Disponível em:< <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01664.x>> Acesso em: 13 nov. 2018.

VITOUSEK, P. M.; ABER, J. D.; HOWARTH, R. W.; LIKENNS, G. E.; MATSON, P. A.; SCHINDLER, D. W.; SCHLESINGER, W. H.; TILMAN, D. G. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. **Ecological Applications**, v. 7, p. 737-750, 1997.

Disponível em:

< <https://pdfs.semanticscholar.org/6d07/8e91a2dac95768ed22bb95b91ca2e99117f9.pdf>>

Acesso em: 23 jun. 2018.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. v. 1. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1996.

VUPPALADADIYAM, A. K.; *et al.* A review on greywater reuse: quality, risks, barriers and global scenarios. **Reviews Environmental Science and Bio/Technology**. p. 1-23, 2018.
Disponível em:< <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11157-018-9487-9>>
Acesso em: 12 jan. 2019.

WANG, Y.; HAMMES, F.; EGLI, T. The impact of industrial-scale cartridge filtration on the native microbial communities from groundwater. **Water Research**, v. 42, p. 4319-4326, 2008.

WANG, Y.; HAMMES, F.; BOON, N.; EGLI, T. Micro-filterable bacteria are omnipresent in natural freshwater. **Environ Sci Technol**, v. 41, p. 7080–7086, 2007.
Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17993151?dopt=Abstract>>
Acesso em 12 out. 2018.

WANNER, U.; EGLI, T. Dynamics of microbial growth and cell composition in batch culture. **FEMS Microbiol Ver**, v. 6, p. 19–43, 1990.
Disponível em:< <10.1111/j.1574-6968.1990.tb04084.x>>
Acesso em: 12 out. 2018.

WATER RESOURCES GROUP (2030 WRG). Charting our water future: Economic frameworks to inform decision-making. **2030 WRG**, Washington DC, 2009.

WINFIELD, M. D.; GROISMAN, E. A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3687–3694, 2003.
Disponível em:< <https://aem.asm.org/content/69/7/3687>>
Acesso em: 23 out. 2018.

WINWARD, G. P., *et al* 2. A study of the microbial quality of grey water and an evaluation of treatment technologies for reuse. **Ecological Engineering**, v. 32, n. 2, p. 187-197, 2008B.
Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2007.11.001>.>
Acesso em: 20 dez. 2018.

WORLD ECONOMIC FORUM (WEF). Insight Report. **Global Risks**. 2014, 9º ed.
Disponível em:<http://www3.weforum.org/docs/WEF_GlobalRisks_Report_2014.pdf>.
Acesso em: 20 dez. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for the safe use of wastewater, excreta, and greywater**, vol. 1; 2006 (Retrieved on 7, August, 2013).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for drinking-water quality**, v. 2, 1996.

WORLD WATER ASSESSMENT PROGRAMME (WWAP). The United Nations World Water Development Report 2015: Water for a Sustainable World. **UNESCO**, Paris, France, 2015.

ZANCHETA, P. G. **Recuperação e tratamento da urina humana para uso agrícola**. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória – ES, 2009.
ZHANG, S.; YE, C.; LIN, H.; LV, L.; YU, X. UV disinfection induces a VBNC state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Environ. Sci. Technol.** v. 49, p. 1721-1728, 2015.

ZHANG, Y.; GRANT, A., SHARMA, A.; CHEN, D. Assessment of rainwater use and greywater reuse in high-rise buildings in a brownfield site. **Water Science Technology**, v. 60, p.575-581, 2009.
Disponível em:< <10.2166/wst.2009.364>>
Acesso em: 10 set. 2018.

ZHAO, L.; MATTHEWS, K.R. Influence of starvation, temperature, and pH on culturability of *Escherichia coli* O157:H7. **J Food Saf**, v. 20, p. 193–206, 2000.

Disponível em:< <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2000.tb00297.x> >

Acesso em: 10 set. 2018.

ZHU, J. *et al.* Feasibility of on-site grey-water reuse for toilet flushing in China. **Journal of Water Reuse and Desalination**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2017

Disponível em:< [10.2166/wrd.2016.086](https://doi.org/10.2166/wrd.2016.086) >

Acesso em: 10 set. 2018.

ZIMMERMAN, B. D.; *et al.* Human mitochondrial DNA an endogenous bacterial surrogates for risk assessment of graywater reuse. **Environmental Science & Technology**. v. 48, p. 7993-8002, 2014.

Disponível em:< [dx.doi.org/10.1021/es501659r](https://doi.org/10.1021/es501659r)>

Acesso em: 10 set. 2018.

YU, Z. L., DESHAZO, J. R., STENSTROM, M. K., & COHEN, Y. Cost–benefit analysis of onsite residential graywater recycling: a case study on the City of Los Angeles. **Journal-American Water Works Association**, v. 107, n. 9, p. E436-E444, 2015.

Disponível em:< [10.5942/jawwa.2015.107.0124](https://doi.org/10.5942/jawwa.2015.107.0124)>

Acesso em: 10 set. 2018.

ANEXOS

ANEXO A

Recomendações para transporte, quantidade, preservação, armazenamento e prazo de validade da amostra conforme o parâmetro a ser analisado.

Ensaio	Recipiente	Quantidade da amostra	Preservação	Armazenamento	Prazo de validade
Cloro residual total e livre (em campo)	-	-	-	-	Ensaio imediato
Turbidez	Frasco plástico descartável (polímero inerte); Frasco de vidro neutro	250 mL	Resfriamento (em gelo)	Refrigeração a 4°C ± 2°C	48 horas
Turbidez (em campo)	-	-	-	-	Ensaio imediato
pH (em campo)	-	-	-	-	Ensaio imediato
Condutividade	Frasco plástico descartável (polímero inerte); Frasco de vidro neutro	250 mL	Resfriamento (em gelo)	Refrigeração a 4°C ± 2°C	28 dias
Condutividade em campo	-	-	-	-	Ensaio imediato
Nitrogênio amoniacal, Nitrogênio Kjeldahl, Fósforo total	Frasco plástico descartável (polímero inerte); Frasco de vidro neutro	250 mL	H ₂ SO ₄ 1+1 até pH < 2 Resfriamento (em gelo)	Refrigeração a 4°C ± 2°C	Nitrogênio – 7 dias; Fósforo total – 28 dias
Ortofosfato	Frasco plástico descartável (polímero inerte); Frasco de vidro neutro	250 mL	Resfriamento (em gelo). Filtrar em campo em membrana 0,45mm	Refrigeração a 4°C ± 2°C	48 horas
DBO ₅	Frasco plástico descartável (polímero inerte); Frasco de vidro neutro	2 frascos de 1 L	Resfriamento (em gelo)	Refrigeração a 4°C ± 2°C	24 horas 48 horas

DQO	Frasco plástico descartável (polímero inerte); Frasco de vidro neutro	250 mL	H ₂ SO ₄ 1+1 até pH≤2 Resfriamento (em gelo)	Refrigeração a 4°C ± 2°C	7 dias 28 dias
Indicadores bacterianos	Frasco plástico descartável (de polímero inerte); Frasco de vidro neutro; Sacos plásticos estéreis.	100 mL	Resfriamento (em gelo)	Refrigeração entre 2 °C e 8°C e proteger da luz. Não congelar	30h (prazo regulatório) 24h (análise para controle)
Sólidos totais	Frasco plástico descartável (polímero inerte); Frasco de vidro neutro	500 mL	Resfriamento (em gelo)	Refrigeração a 4°C ± 2°C	7 dias
Sólidos sedimentáveis	Frasco plástico descartável (polímero inerte); Frasco de vidro neutro	1,5 L	Resfriamento (em gelo)	Refrigeração a 4°C ± 2°C	24 horas

Fonte: Adaptado de CETESB, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Acompanhamento da DO x tempo: Meio A1 acrescido de *Escherichia coli* isolada do meio

Amostra 1		Amostra 2	
Tempo (horas)	DO (600 nm)	Tempo (horas)	DO (600 nm)
0	0,024	0	0,017
1	0,05	1	0,024
2	0,088	2	0,035
3	0,166	3	0,05
4	0,294	4	0,106
5	0,532	5	0,192
6	0,712	6	0,302
7	0,841	7	0,476
8	0,918	8	0,7
9	0,97	9	0,839
10	1,02	10	0,894
11	1,02	11	0,931

APÊNDICE B

Acompanhamento da DO x tempo: comportamento da *Escherichia coli* em água cinza

Amostra 1		Amostra 2	
Tempo (horas)	DO (600 nm)	Tempo (horas)	DO (600 nm)
0	0,011	0	0,015
24	0,03	24	0,02
48	0,039	48	0,042
72	0,1	72	0,1
144	0,091	144	0,094
168	0,147	168	0,151
192	0,146	192	0,146
216	0,099	216	0,01
240	0,16	240	0,172
264	0,144	264	0,148
288	0,110	288	0,113
312	0,105	312	0,110

APÊNCICE C**Acompanhamento da DO x tempo: água cinza bruta acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio**

Amostra 1		Amostra 2	
Tempo (horas)	OD (600 nm)	Tempo (horas)	OD (600 nm)
0	0,022	0	0,03
24	0,412	24	0,473
48	0,47	48	0,55
72	0,531	72	0,531
144	0,539	144	0,905
192	0,43	192	0,479
216	0,41	216	0,48
240	0,36	240	0,43

APÊNDICE D

Acompanhamento da DO x tempo: água cinza bruta estéril acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio

Amostra 1		Amostra 2	
Tempo (horas)	OD (600 nm)	Tempo (horas)	OD (600 nm)
0	0,008	0	0,008
24	0,033	24	0,033
48	0,175	48	0,180
72	0,204	72	0,208
96	0,223	96	0,229
120	0,243	120	0,250
144	0,225	144	0,230
168	0,23	168	0,235
192	0,228	192	0,0227
216	0,241	216	0,234

APÊNDICE E

Acompanhamento da DO x tempo: água cinza bruta estéril + Meio A1 acrescido de *Escherichia coli* isolada do meio

Amostra 1		Amostra 2	
Tempo (horas)	DO (600 nm)	Tempo (horas)	DO (600 nm)
0	0,018	0	0,024
24	0,459	24	0,05
48	0,327	48	0,088
72	0,292	72	0,166
96	0,35	96	0,294
120	0,41	120	0,532
144	0,495	144	0,490
168	0,53	168	0,570
192	0,674	192	0,601
216	0,7	216	0,7

APÊNDICE F**Acompanhamento da DO x tempo: controle negativo.**

Amostra 1		Amostra 2	
Tempo (horas)	DO (600 nm)	Tempo (horas)	DO (600 nm)
0	0,015	0	0,018
24	0,108	24	0,112
48	0,273	48	0,275
96	0,398	96	0,398
120	0,418	120	0,420
144	0,406	144	0,403
168	0,43	168	0,45

APÊNDICE G

Acompanhamento da DO x tempo: água cinza bruta estéril acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio suplementada com 0,2g de fósforo.

Amostra 1		Amostra 2	
Tempo (horas)	DO (600 nm)	Tempo (horas)	DO (600 nm)
0	0,02	0	0,02
24	0,083	24	0,085
48	0,194	48	0,192
96	0,194	96	0,197
120	0,173	120	0,169
144	0,16	144	0,171
168	0,18	168	0,179

APÊNDICE H

Acompanhamento da DO x tempo: água cinza bruta estéril acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio suplementada com 2,0g de fósforo.

Amostra 1		Amostra 2	
Tempo (horas)	DO (600 nm)	Tempo (horas)	DO (600nm)
0	0,011	0	0,015
24	0,147	24	0,144
48	0,28	48	0,32
96	0,271	96	0,273
120	0,279	120	0,28
144	0,289	144	0,287
168	0,285	168	0,288

APÊNDICE I

Acompanhamento da DO x tempo: água cinza bruta estéril acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio suplementada com 1,0g de nitrogênio.

Amostra 1		Amostra 2	
Tempo (horas)	DO (600 nm)	Tempo (horas)	DO (600 nm)
0	0,012	0	0,014
24	0,142	24	0,145
48	0,252	48	0,26
72	0,337	72	0,34
96	0,294	96	0,289
120	0,212	120	0,218
144	0,217	144	0,22

APÊNDICE J

Acompanhamento da DO x tempo: água cinza bruta estéril acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio suplementada com 10,0g de nitrogênio.

Amostra 1		Amostra 2	
Tempo (horas)	DO (600 nm)	Tempo (horas)	DO (600nm)
0	0,009	0	0,01
24	0,084	24	0,09
48	0,125	48	0,128
72	0,222	72	0,225
96	0,186	96	0,189
120	0,153	120	0,16
144	0,143	144	0,149

APÊNDICE K

Acompanhamento da DO x tempo: água cinza bruta estéril acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio suplementada com 0,5g de glicose.

Amostra 1		Amostra 2	
Tempo (horas)	DO (600 nm)	Tempo (horas)	DO (600 nm)
0	0,003	0	0,005
24	0,091	24	0,095
48	0,084	48	0,082
72	0,371	72	0,38
96	0,649	96	0,653
120	0,882	120	0,887
144	0,824	144	0,833

APÊNDICE L

Acompanhamento da DO x tempo: água cinza bruta estéril acrescida de *Escherichia coli* isolada do meio suplementada com 10,0g de glicose.

Amostra 1		Amostra 2	
Tempo (horas)	DO (600 nm)	Tempo (horas)	DO (600 nm)
0	0,2	0	0,22
24	0,364	24	0,38
48	0,253	48	0,252
72	0,194	72	0,201
96	0,294	96	0,298
120	0,571	120	0,599
144	0,718	144	0,719

APÊNCIDE M

Acompanhamento da DO x tempo: água cinza bruta estéril acrescida de inóculo de *Escherichia coli* endógena suplementada com 0,2g de fósforo + 1,0g de nitrogênio.

Amostra 1		Amostra 2	
Tempo (horas)	DO (600 nm)	Tempo (horas)	DO (600 nm)
0	0,019	0	0,018
24	0,323	24	0,330
48	0,290	48	0,275
72	219	72	0,225
96	0,235	96	0,240
