

II-1275 - REMOÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS EM WETLANDS CONSTRUÍDOS EMPREGADOS NO TRATAMENTO DE EFLUENTE SANITÁRIO

Amanda Silva Nunes⁽¹⁾

Engenheira Ambiental e Sanitarista pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR/Londrina). Mestre em Engenharia Ambiental pela UTFPR/Londrina. Doutoranda em Engenharia Ambiental na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/Florianópolis).

Lucas Pocywiecki⁽²⁾

Engenheiro Sanitarista e Ambiental pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/Florianópolis).

Vitor Pereira Vaz⁽³⁾

Engenheiro Sanitarista e Ambiental pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/Florianópolis). Mestre em Engenharia Ambiental pela UFSC/Florianópolis. Doutorando em Engenharia Ambiental na UFSC/Florianópolis e em Ciências Ambientais na Université du Québec à Montréal (UQAM/ Montréal).

Pablo Heleno Sezerino⁽⁴⁾

Engenheiro Sanitarista e Ambiental pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/Florianópolis). Mestre e Doutor em Engenharia Ambiental pela UFSC/Florianópolis. Docente do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC/Florianópolis.

Maria Elisa Magri⁽⁵⁾

Engenheira Sanitarista e Ambiental pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/Florianópolis). Mestre e Doutora em Engenharia Ambiental pela UFSC/Florianópolis. Docente do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC/Florianópolis.

Endereço⁽¹⁾: Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, GRUPO RReSSa – Recuperação de Recursos em Sistemas de Saneamento. Rua Delfino Conti - Trindade - Florianópolis - SC - CEP: 88.040-970 - Brasil - Tel: (48) 3721-7740 - e-mail: amandaanunes19@gmail.com

RESUMO

A remoção de micro-organismos patogênicos de efluentes sanitários é crucial para proteger a saúde humana. Atualmente, os *wetlands* construídos têm sido recomendados não apenas para a remoção de carbono orgânico e nutrientes, mas também para remoção de patógenos de efluentes sanitários; no entanto, há poucas informações sobre os mecanismos e fatores que podem influenciar a remoção destes micro-organismos. O objetivo principal deste estudo foi avaliar a remoção dos micro-organismos modelos *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, Colifago somático e bacteriófago RNA F-específico, em diferentes arranjos tecnológicos de *wetlands* construídos empregados para o tratamento de efluente sanitário. Para atingir o objetivo proposto, cinco amostras do afluente e efluentes gerados por um *wetland* construído vertical descendente de fundo saturado, e um sistema híbrido (*wetland* construído vertical descendente de fundo saturado seguido de *wetland* construído de fluxo horizontal), foram coletadas e submetidas a análises microbiológicas entre os meses de setembro de 2022 a novembro de 2022. A caracterização microbiológica do afluente indicou uma concentração média de $4.15E+04$ UFC.ml⁻¹ (4,62 log₁₀) para *Escherichia coli*, $6.04E+03$ UFC.ml⁻¹ (3,78 log₁₀) para *Enterococcus faecalis*, $3.60E+03$ UFP.ml⁻¹ (3,56 log₁₀) para Colifago somático e $1.25E+04$ UFP.ml⁻¹ (4,10 log₁₀) para RNA F-específico. Globalmente, o arranjo híbrido alcançou maiores remoções dos modelos do que o arranjo individual (até 4,62 logs para os indicadores bacterianos e 1,02 logs para os indicadores virais). Além disso, observou-se que os modelos bacterianos tiveram uma maior remoção do que os modelos virais independentemente do arranjo tecnológico. Ademais, este estudo também demonstra o potencial dos *wetlands* construídos para remoção de contaminação microbiológica e, conseqüentemente para gerar efluentes mais seguros para serem descarregados no meio ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: Patógenos, Remoção microbiológica, *Wetlands* construídos, Efluente sanitário, Saneamento.

INTRODUÇÃO

A falta de acesso à água potável, coleta e tratamento de efluentes está diretamente associada à incidência de doenças de veiculação hídrica, isto é, doenças que tem como principal via de transmissão água contaminada com micro-organismos patogênicos (COLIER et al., 2021; WANG; FENG, 2021). Atualmente, as doenças de veiculação hídrica representam um fardo significativo para a saúde pública, sendo umas das principais causas de morbidade e mortalidade da população em países de baixa e média renda (GOWDA et al., 2022; MORGAN et al., 2021). Globalmente, estima-se que cerca de 1,8 bilhões de pessoas fazem uso de água contaminada por fezes e 2,1 milhões de pessoas perdem suas vidas em decorrência de doenças de veiculação hídrica (BUCCI et al., 2017).

Os micro-organismos patogênicos são inseridos no ambiente aquático principalmente através das descargas de efluentes não tratados e/ou inadequadamente tratados (SLEYTR et al., 2007). Em todo o mundo, os sistemas de saneamento centralizados são a opção mais comum para o gerenciamento de efluentes sanitários (WERKNEH; GEBRU, 2023). Os sistemas centralizados estão associados a alto investimento financeiro para implantação e manutenção, limitações topográficas (GARCÍA; PAREDES; CUBILLOS, 2013), elevado consumo de energia (FERNÁNDEZ DEL CASTILLO et al., 2022), grandes instalações de bombeamento e extensas redes de tubulações, o que podem ser fatores limitantes para sua utilização em países de baixa e média renda.

Os sistemas de saneamento descentralizados apresentam-se como uma opção factível e viável para o gerenciamento de efluentes, especialmente, para localidades onde os sistemas centralizados são uma limitação (MUZIOREVA et al., 2022; GEETHA VARMA et al., 2022). Os sistemas descentralizados se destacam devido à eficiência, flexibilidade, benefícios econômicos e ambientais (OLIVEIRA et al., 2021; EZEAH; REYES; GUTIÉRREZ, 2015; HORN et al., 2014). Ainda, são reconhecidos pela possibilidade de fornecer benefícios além da proteção da qualidade da água e a saúde pública, como por exemplo, a recuperação de recursos (MASSOUD; TARHINI; NASR, 2009).

Existem vários sistemas de saneamento descentralizados que, se projetados e operados adequadamente, fornecerão tratamento adequado. Os *wetlands* construídos são uma das tecnologias descentralizadas mais comumente conhecidas para tratamento de efluente sanitário. Esses sistemas têm como componentes meio filtrante, vegetação e micro-organismos e, processos físicos, químicos e biológicos como os responsáveis pela remoção de poluentes (SHARMA; MALAVIYA, 2022). Os *wetlands* construídos removem uma grande variedade de poluentes, incluindo micro-organismos patogênicos. No entanto, o entendimento sobre o destino e remoção de tais micro-organismos nos *wetlands* construídos ainda é limitado devido à complexidade dos mecanismos de remoção e fatores de influência (STEFANAKIS et al., 2019; WU et al., 2016). Outra fragilidade existente nos estudos é a avaliação microbiológica de patógenos limitada ao uso de coliformes totais e termotolerantes ou *Escherichia coli*, os quais não são bons indicadores do comportamento de bactérias patogênicas mais resistentes ou vírus entéricos.

Neste contexto, o objetivo principal desse estudo foi avaliar a remoção de micro-organismos modelos/indicadores em diferentes arranjos tecnológicos de *wetlands* construídos: (1) *wetland* construído vertical descendente de fundo saturado, e (2) sistema híbrido - *wetland* construído vertical descendente de fundo saturado, seguido de *wetland* construído de fluxo horizontal. Para demonstrar a aplicabilidade e a confiabilidade dos *wetlands* na eliminação de micro-organismos patogênicos presentes em efluente sanitário, os diferentes arranjos tecnológicos foram avaliados quanto à remoção de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, como modelos bacterianos; e Colifago somático e bacteriófago RNA F-específico, como modelos virais.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no sul do Brasil, em Florianópolis, município do estado de Santa Catarina (27° 35' 49" Sul e 48° 32' 58" Oeste). O clima de Florianópolis é classificado como subtropical mesotérmico úmido, equivalente a classificação Cfa de Köppen-Geiger. A temperatura média anual é de 21 °C, a umidade média do ar é de 82% e a precipitação fica em torno de 1500 mm por ano.

- Descrição dos *wetlands* construídos

Dois arranjos tecnológicos de *wetlands* construídos empregados para tratamento de esgoto sanitários, operados em paralelo, foram investigados. O arranjo 1 consiste em um *wetland* construído vertical descendente de fundo saturado (WCV-FS₁), e o arranjo 2 em um *wetland* construído vertical descendente de fundo saturado (WCV-FS₂), seguido de um *wetland* construído de fluxo horizontal (WCH), também chamado de arranjo híbrido. Ambos os arranjos foram utilizados como unidades de tratamento secundário, precedidas por tratamento primário via tanque séptico. Na Figura 1 apresenta-se um esquema representativo dos arranjos tecnológicos 1 e 2 estudados.

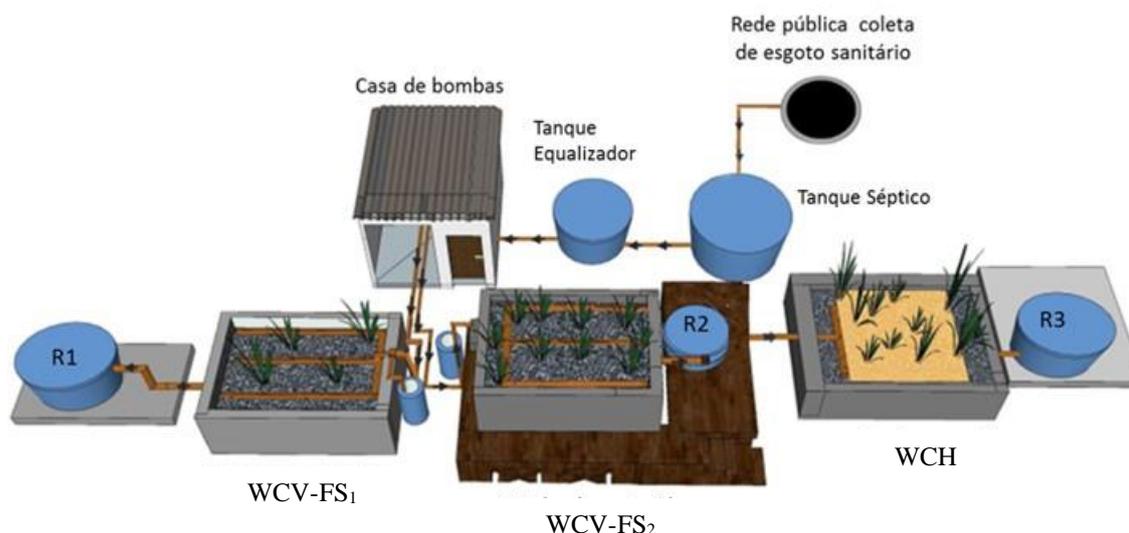


Figura 1: Esquema representativo dos arranjos tecnológicos 1 e 2. (Fonte: Acervo GESAD).

Todos os *wetlands* foram construídos acima do nível do solo, em alvenaria e com impermeabilização das áreas internas, e foram dimensionados para operar sob um carregamento orgânico médio de $41\text{gDQO}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$. Os *wetlands* foram alimentados com esgoto sanitário proveniente da rede coletora de esgoto municipal. Ambos os arranjos foram operados de forma intermitente (3 a 4 pulsos por dia), e seguindo um ciclo operacional que inclui 3,5 dias de operação (alimentação) e 3,5 dias em descanso (sem alimentação). A espécie vegetativa adotada foi a *Typha domingensis*, ou mais popularmente conhecida como Taboa.

O WCV-FS₁ tinha uma área superficial de $7,5\text{ m}^2$, profundidade do meio filtrante de $0,75\text{ m}$ e altura de saturação de $0,40\text{ m}$. Já o arranjo híbrido, tinha área superficial de $7,5\text{ m}^2$ e 16 m^2 para, respectivamente, WCV-FS₂ e WCH. Para o WCV-FS₂ e WCH, a altura de saturação era de $0,40\text{ m}$ e $0,50\text{ m}$, respectivamente. Ambos os arranjos tecnológicos tinham brita nº1 na zona de entrada ou distribuição, areia grossa ($d_{10} = 0,29\text{ mm}$; $d_{60} = 1,16\text{ mm}$; $d_{60}/d_{10} = 4,05$) na zona filtrante principal e brita nº1 na zona de saída do efluente, como meio filtrante.

- Procedimento de amostragem

Um total de cinco amostras foram coletadas quinzenalmente entre os meses de setembro de 2022 à novembro de 2022. As amostras foram coletadas sempre no momento da alimentação dos *wetlands* (por volta de 11 horas da manhã). Os pontos de amostragem foram: afluente aos sistemas *wetlands* (pós-tratamento por tanque séptico), efluente tratado do WCV-FS₁, efluente tratado do WCV-FS₂ e efluente tratado do WCH. Os recipientes utilizados para as coletas foram frascos de vidro de boca larga, previamente esterilizados em autoclave e com capacidade para 200 ml . Todas as amostras foram acondicionadas em caixa térmica e mantidas sob refrigeração até o momento dos ensaios em laboratório.

- Análises microbiológicas

Amostras do afluente e efluentes dos dois arranjos tecnológicos foram analisadas para *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, Colifago somático e bacteriófago RNA F-específico. As análises microbiológicas

resumiam-se em diluições decimais seriadas de 1 ml das amostras em 9 ml de solução salina peptonada estéril, seguida pelo plaqueamento e quantificação dos micro-organismos. Selecionou-se para as análises, uma sequência de 3 diluições de cada amostra.

Para as bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, alíquotas de 0,1 ml foram semeadas em placas de ágar *MacConkey* e *SlaBa* (*Slanetz and Bartley Agar*), respectivamente. As placas de ágar *MacConkey* foram incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, enquanto as placas de ágar *SlaBa* foram incubadas a $41^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, em estufa bacteriológica. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro ($\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$).

A detecção e a enumeração dos bacteriófagos foram realizadas de acordo com o método da dupla camada de sobreposição de ágar de Adams (1959), e seguindo os requisitos da ISO 10705-1:1995, para o RNA F-específico; e da ISO 10705-2:2000, para o Colifago somático. Para o bacteriófago RNA F-específico foi utilizado o meio de cultura TYGA (*Tryptone-Yeast extract-Glucose Agar*) e a bactéria hospedeira *Salmonella enterica* (WG49 NCTC12484). Logo, para o Colifago somático foi utilizado o meio de cultura MSA (*Modified Scholtens' Agar*) e a bactéria hospedeira *Escherichia coli* (ATCC 13706).

Resumidamente, as bactérias hospedeiras foram cultivadas nos respectivos meios e incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 3 a 5 horas, para crescimento e propagação. Em tubos de ensaios foram combinados um volume de 1 ml de amostra diluída, 1 ml de bactéria hospedeira e 2 ml de meio de cultura semi-sólido. Os tubos foram homogeneizados com o auxílio de um agitador do tipo Vórtex e então, a mistura foi depositada em placas previamente preparadas e contendo os respectivos meios. Após a solidificação, as placas foram incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 horas e quantificadas em unidades formadoras de placas por mililitros ($\text{UFP} \cdot \text{ml}^{-1}$).

- Análise dos dados

No *software Microsoft Excel*, uma análise estatística descritiva foi realizada para sumarizar e descrever os conjuntos de dados obtidos. Os dados foram apresentados em tabela, com médias e desvios padrão. Para calcular a remoção microbiológica, os dados microbiológicos foram transformados em \log_{10} e posteriormente, foram calculadas a diferença entre as \log -concentrações obtidas para o afluente e efluentes tratados gerados.

RESULTADOS OBTIDOS

Na Tabela 1, são apresentados os resultados da caracterização microbiológica (concentrações médias e desvios padrão) do afluente aos sistemas *wetlands* construídos (pós-tratamento por tanque séptico), e dos efluentes tratados gerados (efluentes gerados por WCV-FS₁, WCV-FS₂ e WCH); além disso, são apresentados na sequência os resultados de remoção microbiológica média alcançada, em termos de unidades logarítmicas (Log_{10}).

Tabela 1: Caracterização Microbiológica do Afluente e Efluentes Gerados por WCV-FS₁, WCV-FS₂ e WCH (n = 5). (N.D, não detectado pelo método analítico utilizado).

| Parâmetros | Dados | Afluente | Efluentes | | |
|---|---------------|-----------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| | | Pós-TS | WCV-FS ₁ | WCV-FS ₂ | WCH |
| <i>Escherichia coli</i> ($\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$) | Média | 4.15E+04 | 5.67E+02 | 1.14E+03 | N.D |
| | Desvio Padrão | 1.90E+04 | 2.08E+02 | 1.23E+03 | - |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ($\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$) | Média | 6.04E+03 | 2.00E+02 | 4.00E+02 | N.D |
| | Desvio Padrão | 3.75E+03 | 7.07E+00 | 4.08E+02 | - |
| Colifago somático ($\text{UFP} \cdot \text{ml}^{-1}$) | Média | 3.60E+03 | 2.98E+03 | 1.87E+03 | 2.32E+03 |
| | Desvio Padrão | 3.33E+03 | 2.44E+03 | 2.43E+03 | 1.80E+03 |
| RNA F-específico ($\text{UFP} \cdot \text{ml}^{-1}$) | Média | 1.25E+04 | 6.09E+03 | 6.73E+03 | 6.38E+02 |
| | Desvio Padrão | 2.29E+04 | 8.08E+03 | 8.94E+03 | 8.78E+02 |

Durante o período de estudo, o arranjo tecnológico 1 (WCV-FS₁) alcançou uma remoção logarítmica média de *Escherichia coli* de 1,86 \log_{10} , enquanto a remoção logarítmica média de *Enterococcus faecalis* foi de 1,48 \log_{10} . Para os bacteriófagos, os resultados revelaram uma remoção logarítmica média de 0,08 e 0,31 \log_{10} para os bacteriófagos Colifago somático e RNA F-específico, na respectiva ordem.

Para o arranjo tecnológico 2 (WCV-FS₂ + WCH), os resultados obtidos indicam para WCV-FS₂ uma remoção logarítmica média para as bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* de 1,56 e 1,18 log₁₀, respectivamente; enquanto para WCH, as concentrações das bactérias estavam abaixo do limite de detecção do método analítico empregado e, por isso, foram consideradas não detectadas. A remoção logarítmica média de Colifago somático e bacteriófagos RNA F-específico para WCV-FS₂ foi de 0,28 e 0,27 log₁₀; e para WCH foi de 0 e 1,02 log₁₀, respectivamente.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados descritos na seção anterior mostram que ambos os arranjos tecnológicos possuem potencial para remoção de micro-organismos patogênicos. A redução das concentrações de micro-organismos observada nos efluentes pode ser resultado de uma ação combinada de vários mecanismos físicos (filtração, adsorção e sedimentação), químicos (oxidação e exposição a biocidas excretados pela vegetação) e biológicos (predação e morte natural) que ocorrem no interior dos *wetlands* construídos (RAMPURIA et al., 2021; WU et al., 2016).

De modo geral, observou-se que os bacteriófagos foram mais resistentes à eliminação do que as bactérias, tal como mencionado por Torrens et al. (2009). Um estudo disponível na literatura apresenta a diferença entre os mecanismos de remoção de bactérias e vírus nos *wetlands* construídos como uma justificativa para esse comportamento (TORRENS et al., 2010). Além disso, os resultados mostram que as bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, utilizadas frequentemente como modelos bacterianos para testar a qualidade sanitária de efluentes, foram os micro-organismos removidos mais eficientemente no presente estudo.

O WCV-FS₁ removeu parcialmente os micro-organismos patogênicos estudados, com remoção logarítmica média variando de 0,08 a 1,86 log₁₀. Esses resultados são comparáveis aos relatados por outros estudos. Por exemplo, Torrens et al. (2010) registraram remoção logarítmica inferior a 2 unidades logarítmicas para *Escherichia coli*, Colifago somático e RNA F-específico, em um sistema similar. Enquanto, Bohórquez, Paredes e Árias (2017) alcançaram reduções entre 0,03 e 2,6 unidades logarítmicas para *Escherichia coli*. Em contrapartida, o sistema avaliado neste trabalho apresentou valores inferiores aos descritos por Sleytr et al. (2007). Ao avaliar sistemas de fluxo vertical subsuperficial, plantados com *Miscanthus gigantea* e preenchidos com cascalho na camada principal (0,06-4 mm), esse autor obteve uma remoção média de 4,35 log₁₀ para *Escherichia coli* e 4,80 log₁₀ para *Enterococcus faecalis*.

Imagina-se que, a ampla faixa de remoção logarítmica registrada para *wetlands* de fluxo vertical na literatura possa ser uma consequência da diferença de condições operacionais e ambientais, tais como: regime hidráulico, da granulometria do meio filtrante, das características do efluente tratado ou até mesmo das características climáticas (WU et al., 2016). É bem documentado pelo estudo realizado por Alufasi et al. (2017), que essas diferentes condições que afetam a remoção de micro-organismos patogênicos dificultam a comparação de resultados e a identificação dos mecanismos de remoção exatos que ocorrem em um *wetland* construído, independentemente do arranjo tecnológico adotado.

No arranjo híbrido (WCV-FS₂ + WCH), as concentrações dos micro-organismos também foram menores no efluente do que no afluente. Em termos globais, o arranjo híbrido alcançou remoções logarítmicas mais elevadas em comparação as obtidas no arranjo individual. Diferenças na remoção de micro-organismos patogênicos entre os dois arranjos eram esperadas. Isso porque, já é de conhecimento que os arranjos híbridos sustentam maiores remoções de poluentes, quando comparados a sistemas individuais (LÓPEZ et al., 2019). A melhor atuação do arranjo híbrido pode ser atribuída ao fato de que são explorados os benefícios individuais de cada uma das configurações de *wetlands* adotadas; destacando-se o expressivo aumento do tempo de detenção hidráulica promovido no sistema horizontal (ELFANSSI et al., 2018).

A maioria dos micro-organismos estudados foram parcialmente e/ou totalmente removidos à medida que passava pelo sistema; exceto os Colifagos somáticos, que os resultados indicaram um pequeno aumento da concentração do bacteriófago no interior do *wetland*. Pode-se supor que esse aumento da concentração é uma consequência do recrescimento biológico, o que neste caso é dependente da presença de bactérias hospedeiras dos vírus. Observou-se que a maior parte dos micro-organismos avaliados foi removida na segunda etapa do arranjo tecnológico. Isto está de acordo com Zurita e Carreón-Alvarez (2015), que afirmou que o alto tempo de detenção nos *wetlands* horizontais expõe os micro-organismos patogênicos a um ambiente hostil durante um maior período de tempo e; conseqüentemente, favorece a sua remoção.

Para efeito comparativo, o arranjo tecnológico 2 apresentou bons resultados na redução das concentrações das bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, assim como foi obtido por Lavrnić et al. (2020). Os resultados obtidos para os bacteriófagos foram inferiores aos apresentados Carlon et al. (2018), que avaliando o mesmo sistema obteve remoções de 2 a 4 log₁₀ para os bacteriófagos Colifago somático e RNA F-específico, respectivamente.

Vale ressaltar que, embora a ausência dos modelos bacterianos objetos de estudo no efluente do arranjo híbrido, a detecção dos bacteriófagos Colifago somático e RNA F-específico pode representar a presença de outras bactérias e de vírus do grupo entérico. Portanto, sugere-se um período experimental mais longo e ampliar o monitoramento de outros grupos de micro-organismos, para além da *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*.

CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados obtidos com o presente estudo ressaltam que os *wetlands* construídos podem verdadeiramente representar uma solução eficaz para o tratamento de efluente sanitário. Foi possível reduzir as concentrações de micro-organismos indicadores e, conseqüentemente gerar efluentes mais seguros para serem descarregados no meio ambiente. O tipo de arranjo tecnológico teve efeito claro na redução de micro-organismos, sendo que os resultados obtidos mostraram que o arranjo híbrido (WCV-FS₂ + WCH) reduziram micro-organismos patogênicos mais eficientemente em comparação com arranjo individual (WCV-FS₁). Porém, fica claro que independentemente do arranjo tecnológico os modelos bacterianos foram removidos mais facilmente que os modelos virais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALUFASI, R., GERE, J., CHAKAUYA, E., LEBEA, P., PARAWIRA, W., & CHINGWARU, W. *Mechanisms of pathogen removal by macrophytes in constructed wetlands. Environmental Technology Reviews*, 6(1), 135–144, 2017.
2. BOHÓRQUEZ, E., PAREDES, D., & ARIAS, C. A. *Vertical flow-constructed wetlands for domestic wastewater treatment under tropical conditions: effect of different design and operational parameters. Environmental Technology*, 38(2), 199–208, 2017.
3. BUCCI, A., PETRELLA, E., CELICO, F., & NACLERIO, G. *Use of molecular approaches in hydrogeological studies: the case of carbonate aquifers in southern Italy. Hydrogeology Journal*, 25(4), 1017–1031, 2017.
4. CARLON, P., INÁCIO, D. P., WILVERT, J., SEZERINO, P. H., MAGRI, M. E. *Evaluating bacteriophages removal as surrogates for enteric viruses in constructed wetlands for wastewater treatment. IV Latin American Symposium of Environmental Virology*. 2018.
5. COLLIER, S. A., DENG, L., ADAM, E. A., BENEDICT, K. M., BESHEARSE, E. M., BLACKSTOCK, A. J., BRUCE, B. B., DERADO, G., EDENS, C., FULLERTON, K. E., GARGANO, J. W., GEISSLER, A. L., HALL, A. J., HAVELAAR, A. H., HILL, V. R., HOEKSTRA, R. M., REDDY, S. C., SCALLAN, E., STOKES, E. K., BEACH, M. J. *Estimate of Burden and Direct Healthcare Cost of Infectious Waterborne Disease in the United States. Emerging Infectious Diseases*, 27(1), 140–149, 2021.
6. ELFANSSI, S., OUAZZANI, N., LATRACH, L., HEJJAJ, A., & MANDI, L. *Phytoremediation of domestic wastewater using a hybrid constructed wetland in mountainous rural area. International Journal of Phytoremediation*, 20(1), 75–87, 2018.
7. EZEAH, C., REYES, C. A. R., & GUTIÉRREZ, J. F. C. *Constructed Wetland Systems as a Methodology for the Treatment of Wastewater in Bucaramanga Industrial Park. Journal of Geoscience and Environment Protection*, 03(03), 1–14, 2015.
8. FERNÁNDEZ DEL CASTILLO, A., GARIBAY, M. V., SENÉS-GUERRERO, C., OROZCO-NUNNELLY, D. A., DE ANDA, J., & GRADILLA-HERNÁNDEZ, M. S. *A review of the sustainability of anaerobic reactors combined with constructed wetlands for decentralized wastewater treatment. Journal of Cleaner Production*, 371, 133428, 2022.
9. GARCÍA, J. A., PAREDES, D., & CUBILLOS, J. A. *Effect of plants and the combination of wetland treatment type systems on pathogen removal in tropical climate conditions. Ecological Engineering*, 58, 57–62, 2013.
10. GEETHA VARMA, V., JHA, S., HIMESH KARTHIK RAJU, L., LALITH KISHORE, R., & RANJITH, V. *A review on decentralized wastewater treatment systems in India. Chemosphere*, 300, 134462, 2022.

11. GOWDA, H. N., KIDO, H., WU, X., SHOVAL, O., LEE, A., LORENZANA, A., MADOU, M., HOFFMANN, M., & JIANG, S. C. *Development of a proof-of-concept microfluidic portable pathogen analysis system for water quality monitoring. Science of The Total Environment*, 813, 152556, 2022.
12. HORN, T. B., ZERWES, F. V., KIST, L. T., & MACHADO, Ê. L. *Constructed wetland and photocatalytic ozonation for university sewage treatment. Ecological Engineering*, 63, 134–141, 2014.
13. LAVRNIC, S., ZAPATER PEREYRA, M., CRISTINO, S., CUPIDO, D., LUCCHESI, G., PASCALE, M. R., TOSCANO, A., & MANCINI, M. *The Potential Role of Hybrid Constructed Wetlands Treating University Wastewater—Experience from Northern Italy. Sustainability*, 12(24), 10604, 2020.
14. LÓPEZ, D., LEIVA, A. M., ARISMENDI, W., & VIDAL, G. *Influence of design and operational parameters on the pathogens reduction in constructed wetland under the climate change scenario. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18(1), 101–125, 2019.
15. MASSOUD, M. A., TARHINI, A., & NASR, J. A. *Decentralized approaches to wastewater treatment and management: Applicability in developing countries. Journal of Environmental Management*, 90(1), 652–659, 2009.
16. MORGAN, C. E., BOWLING, J. M., BARTRAM, J., & KAYSER, G. L. *Attributes of drinking water, sanitation, and hygiene associated with microbiological water quality of stored drinking water in rural schools in Mozambique and Uganda. International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 236, 113804, 2021.
17. MUZIOREVA, H., GUMBO, T., KAVISHE, N., MOYO, T., & MUSONDA, I. *Decentralized wastewater system practices in developing countries: A systematic review. Utilities Policy*, 79, 101442, 2022.
18. OLIVEIRA, G. A., COLARES, G. S., LUTTERBECK, C. A., DELL'OSBEL, N., MACHADO, Ê. L., & RODRIGUES, L. R. *Floating treatment wetlands in domestic wastewater treatment as a decentralized sanitation alternative. Science of The Total Environment*, 773, 145609, 2021.
19. RAMPURIA, A., GUPTA, A. B., KULSHRESHTHA, N. M., & BRIGHU, U. *Microbiological Analysis of Two Deep Constructed Wetlands with Special Emphasis on the Removal of Pathogens and Antibiotic-Resistant Bacteria. Water, Air, & Soil Pollution*, 232(5), 174, 2021.
20. SHARMA, R., & MALAVIYA, P. *Constructed wetlands for textile wastewater remediation: A review on concept, pollutant removal mechanisms, and integrated technologies for efficiency enhancement. Chemosphere*, 290, 133358, 2022.
21. SLEYTR, K., TIETZ, A., LANGERGRABER, G., & HABERL, R. *Investigation of bacterial removal during the filtration process in constructed wetlands. Science of The Total Environment*, 380(1–3), 173–180, 2007.
22. STEFANAKIS, A. I., BARDIAU, M., TRAJANO, D., COUCEIRO, F., WILLIAMS, J. B., & TAYLOR, H. *Presence of bacteria and bacteriophages in full-scale trickling filters and an aerated constructed wetland. Science of The Total Environment*, 659, 1135–1145, 2019.
23. TORRENS, A. M. FOLCH, J. SASA, M. LUCERO, E. HUERTAS. *Removal of bacterial and viral indicators in horizontal and vertical subsurface flow constructed wetlands. 12th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control, Venice, Italy. pp.4, Oct 2010.*
24. TORRENS, A., MOLLE, P., BOUTIN, C., & SALGOT, M. *Removal of bacterial and viral indicator in vertical flow constructed wetlands and intermittent sand filters. Desalination*, 246(1–3), 169–178, 2009.
25. WANG, W., & FENG, Z. *Influence of environmental pollution to a waterborne pathogen model: Global dynamics and asymptotic profiles. Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*, 99, 105821, 2021.
26. WERKNEH, A. A., & GEBRU, S. B. *Development of ecological sanitation approaches for integrated recovery of biogas, nutrients and clean water from domestic wastewater. Resources, Environment and Sustainability*, 11, 100095, 2023.
27. WU, S., CARVALHO, P. N., MÜLLER, J. A., MANOJ, V. R., & DONG, R. *Sanitation in constructed wetlands: A review on the removal of human pathogens and fecal indicators. Science of The Total Environment*, 541, 8–22, 2016.
28. ZURITA, F., & CARREÓN-ÁLVAREZ, A. *Performance of three pilot-scale hybrid constructed wetlands for total coliforms and Escherichia coli removal from primary effluent – a 2-year study in a subtropical climate. Journal of Water and Health*, 13(2), 446–458, 2015.