

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE PESQUISAS HIDRÁULICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS HÍDRICOS E SANEAMENTO AMBIENTAL

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE COLIFAGOS COMO INDICADORES VIRAIS
A PARTIR DA ANÁLISE DE ENTEROVÍRUS E ADENOVÍRUS EM EFLUENTES
TRATADOS POR DIFERENTES PROCESSOS BIOLÓGICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARIA CRISTINA DE ALMEIDA SILVA

Porto Alegre, abril de 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE PESQUISAS HIDRÁULICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS HÍDRICOS E SANEAMENTO AMBIENTAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE COLIFAGOS COMO INDICADORES VIRAIS
A PARTIR DA ANÁLISE DE ENTEROVÍRUS E ADENOVÍRUS EM EFLUENTES
TRATADOS POR DIFERENTES PROCESSOS BIOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientador:
Dr. Luiz Olinto Monteggia

Co-orientador:
Dr. Luis Alcides Schiavo Miranda

Porto Alegre

2010

**Dedico este trabalho à minha família,
principalmente ao meu Pai, que sempre me
incentivou e me apoiou em todos os sentidos.
Obrigada pela força, que me fez seguir em
frente e chegar aqui.**

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Luiz Monteggia e Luis Miranda, que me inseriram nesse projeto, obrigada pela confiança e os ensinamentos passados;

À Profa. Dra. Dolores Ursula Mehnert, pela orientação e pela confiança ao dispor a estrutura e reagentes de seu laboratório no Instituto de Ciências Biomédicas da USP, para a realização dos testes de PCR e RT-PCR. O agradecimento se estende a toda sua equipe que sempre estava disposta a ajudar: Telma e Luana;

Paty e Ari, a vida fez com que o destino colocasse essas duas pessoas maravilhosas na minha vida! Obrigada pela ajuda, treinamento, a hospitalidade em São Paulo, a amizade, as risadas, o alto astral inerente a vocês duas! Adoro vocês!

Aos meus amados colegas e amigos do IPH, sempre presentes em todas as horas: na troca de conhecimento, nos estudos, no café, no desabafo, no Garibaldi de mesa seco, na descontração, no RU, etc. Sempre é bom encontrar pessoas como vocês que proporcionam um ótimo ambiente de trabalho, em especial Bibi e Daya!

Ao pessoal da Bioquímica/UFRGS, que “socializaram” o espaço físico para a realização das ultracentrifugações, mesmo com as reclamações a respeito do “suave” perfume das minhas amostras;

À Assessoria Estatística da UFRGS, pela ajuda com as análises estatísticas;

À Márcia da Divisão de Pesquisas do DMAE, pela realização das análises de colifagos.

Marcelo, obrigada por sempre me ajudar, principalmente nos piores momentos! Correria de um lado para outro, formatação de trabalhos, caronas até o aeroporto, ajuda na compra das passagens. Sei que pessoas como você são raras, e eu tive a sorte grande de te encontrar na minha vida.

Às minhas grandes amigas, que fazem com que minha vida seja sempre doce. É muito bom poder compartilhar alegrias e ter sempre um ombro amigo nas tristezas!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

RESUMO

Os esgotos domésticos contêm uma alta quantidade de bactérias e outros organismos patogênicos e não patogênicos que são descarregados em corpos hídricos. A contaminação da água, pela presença de bactérias e vírus patogênicos, traz consequências indesejáveis, principalmente de saúde pública. O objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de emprego da análise de colifagos, como indicador viral. Para isso, amostras de esgoto bruto, efluente tratado por reator UASB e efluente de lodo ativado, da Estação de Tratamento de Esgotos São João Navegantes, Porto Alegre, foram coletadas durante o período de junho/2006 a junho/2007. As análises físicas, químicas e microbiológicas, DBO₅, turbidez, sólidos totais, quantificação de coliformes totais, fecais e de colifagos foram realizadas em 99 amostras, conforme APHA, 2005. Na determinação da presença de adenovírus e enterovírus foram testadas 36 amostras, utilizando-se a técnica de concentração por filtração-eluição e ultracentrifugação. Posteriormente, purificação e avaliação da infectividade. Por fim, as amostras foram submetidas a teste de *nested* PCR e RT-PCR, a fim de verificar a presença de adenovírus e enterovírus, respectivamente. Nas 36 amostras testadas, a presença de enterovírus foi confirmada em apenas 5,56% das amostras e, adenovírus, em 16,67% das amostras. Não foram encontradas correlações significativas entre colifagos e bactérias coliformes totais e fecais, bem como entre colifagos e os parâmetros físicos e químicos. Desta independência encontrada entre vírus e bactérias se destaca a necessidade de monitoramento conjunto de ambos os microrganismos. Verificou-se uma similaridade em relação à sazonalidade referente ao comportamento de colifagos e o descrito na literatura referente a vírus entéricos. Observou-se, também, a baixa eficiência do tratamento para remoção de microrganismos, ressaltando-se a importância de realização de um tratamento terciário para assegurar a qualidade microbiológica do efluente. As relações entre colifagos e vírus entéricos não foram possíveis de serem analisadas, devido aos dados inconclusivos obtidos no presente trabalho.

Palavras-chave: Tratamento de esgotos, colifagos, bactérias coliformes, parâmetros físicos e químicos, sazonalidade, vírus entéricos.

ABSTRACT

Domestic sewage contains a high amount of bacteria and other pathogens and non pathogens that are discharged into water bodies. Contamination of water by the presence of pathogenic bacteria and viruses, brings undesirable consequences, especially for public health. The objective of this work was to evaluate the possibility of using analysis of coliphages as viral indicator. Samples of raw sewage, treated effluent by UASB reactor and by activated sludge, from Wastewater Treatment Systems São João Navegantes, Porto Alegre, were collected during the period of june/2006 to june/2007. Physical, chemical and microbiological analyzes, namely BOD₅, turbidity, total solids, quantification of total coliforms, fecal coliforms and coliphages were performed in 99 samples, following the techniques described in APHA 2005. The presence of enteric viruses was tested on 36 samples. The technique of concentration by filtration-elution and ultra-centrifugation was used for this purpose. Subsequently, purification and infectivity test was performed. The samples were tested to nested PCR and RT-PCR to verify the presence of adenovirus and enterovirus, respectively. In 36 samples tested, the presence of enteroviruses was confirmed in only 5.56% of the samples, and adenovirus, in 16.67% of the samples. No significant correlation was found among coliform bacteria and coliphages, and also between the presence of coliphages and physical and chemical parameters. The independence found between viruses and bacteria indicates the need for joint monitoring of both microorganisms. The behavior of coliphages was observed to follow the path described in the literature about enteric viruses in relation to seasonality. There was observed a low efficiency in terms of microorganisms removal, emphasizing the need for a tertiary treatment to ensure the microbiological quality of the effluents tested. Relations between coliphages and enteric viruses were not able to be analyzed, due to inconclusive data obtained in this work.

Key-words: *Wastewater treatment, coliphages, coliform bacteria, enteric viruses, physical and chemical parameters, seasonality.*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Água e esgoto	12
2.2	Sistemas de tratamento de esgotos sanitários	14
2.2.1	<i>Operações Físicas</i>	14
2.2.2	<i>Processos Biológicos</i>	15
2.2.3	<i>Processos Químicos</i>	18
2.2.4	<i>Estações de Tratamento de Esgotos em Porto Alegre</i>	18
2.3	Legislação	18
2.4	Análises físicas e químicas	20
2.4.1	<i>Matéria Orgânica</i>	21
2.4.2	<i>Turbidez</i>	21
2.4.3	<i>Sólidos Totais</i>	22
2.4.4	<i>Parâmetros, periodicidade e pontos de coleta da análise exigidos pela legislação</i>	23
2.5	A presença de microrganismos na água e no esgoto	23
2.5.1	<i>Bactérias</i>	24
2.5.2	<i>Vírus</i>	26
2.5.2.1	<i>Métodos de concentração e detecção de vírus entéricos em amostras ambientais</i>	27
2.5.2.2	<i>Epidemiologia dos vírus entéricos</i>	30
2.5.3	<i>Colifagos como indicadores de qualidade da água e de esgotos</i>	35
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos específicos	38
4	METODOLOGIA	39
4.1	Procedimento e local de coleta das amostras	39
4.2	Identificação e quantificação de coliformes totais e coliformes fecais na amostra	41
4.3	Identificação e quantificação de colifagos na amostra	42
4.4	Determinação da presença e da infectividade de enterovírus e adenovírus	43
4.5	Análises físicas e químicas	50
4.5.1	<i>Demanda Bioquímica de Oxigênio</i>	50
4.5.2	<i>Turbidez</i>	51
4.5.3	<i>Sólidos Totais</i>	51
4.6	Análise estatística para determinação da correlação entre duas variáveis	52
5	RESULTADOS	53
5.1	Temperatura e precipitação médias	53
5.2	Qualidade do afluente e dos efluentes analisados	53
5.3	Correlações e tendências dos microrganismos	55
5.4	Detecção de enterovírus e adenovírus	61
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes e suas respectivas quantidades necessárias para a preparação do reagente para a síntese do cDNA do RNA viral	46
Tabela 2: Reagentes e suas respectivas quantidades necessárias para a preparação do reagente para a realização do PCR, a partir do cDNA.....	47
Tabela 3: <i>Primers</i> utilizados para RT-PCR e a respectiva localização no genoma viral.	47
Tabela 4: Reagentes e suas quantidades utilizadas na primeira reação de PCR, para detecção de adenovírus.....	48
Tabela 5: Reagentes e suas quantidades utilizadas na segunda reação de PCR (nested), para detecção de adenovírus.....	49
Tabela 6: <i>Primers</i> utilizados na reação de PCR e nested PCR para detecção de adenovírus. .	49
Tabela 7: Dados referentes à temperatura média (°C) e a precipitação média (mm) da respectiva estação em Porto Alegre – RS, no período de junho/2006 e junho/2007, com base nos dados da Defesa Civil do RS e do Banco de Dados do CPTEC/INPE.	53
Tabela 8: Médias dos valores obtidos de DBO ₅ (mg O ₂ /L), Sólidos Totais (mg/L) e Turbidez (NTU) das amostras coletadas de afluente bruto, reator UASB e lodo ativado, coletados no período de junho/2006 à junho/2007 na ETE São João Navegantes, Porto Alegre.	54
Tabela 9: Análise de Correlação de Pearson entre Colifagos, <i>E. coli</i> , coliformes totais, no afluente e efluente da ETE são João Navegantes do DMAE – Porto Alegre, RS, e no efluente do reator UASB da unidade experimental do IPH/UFRGS, no período de junho de 2006 a junho de 2007. R significante a nível de 5%.....	56
Tabela 10: Análise de Correlação de Pearson entre colifagos, <i>E. coli</i> , coliformes totais e sólidos totais no afluente e efluente da ETE são João Navegantes do DMAE – Porto Alegre, RS., e no efluente do reator UASB da unidade experimental do IPH/UFRGS, no período de junho/2006 à junho/2007. R significante em nível de 5%.....	58
Tabela 11: Análise de Correlação de Pearson entre colifagos, <i>E. coli</i> , coliformes totais e DBO ₅ no afluente e efluente da ETE são João Navegantes do DMAE – Porto Alegre, RS., e no efluente do reator UASB da unidade experimental do IPH/UFRGS, no período de junho/2006 à junho/2007. R significante em nível de 5%.....	58
Tabela 12: Análise de Correlação de Pearson entre colifagos, <i>E. coli</i> , coliformes totais e turbidez no afluente e efluente da ETE são João Navegantes do DMAE – Porto Alegre, RS., e no efluente do reator UASB da unidade experimental do IPH/UFRGS, no período de junho de 2006 à junho de 2007. R significante em nível de 5%.	59
Tabela 13: Resultados dos testes realizados de <i>nested</i> PCR e RT-PCR, para análise de adenovírus e enterovírus, nas amostras de efluente de lodo ativado, efluente de reator UASB e afluente bruto, e suas respectivas datas de coleta.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principais processos físicos, químicos e biológicos empregados no tratamento de esgotos domésticos (Fonte: http://ib.ufpel.edu.br/micro_aquatica.pdf).	15
Figura 2: Rotas de transmissão de vírus entéricos no ambiente. (adaptado de Metcalf et al., 1995).	27
Figura 3: Fluxograma das unidades experimentais do IPH/UFRGS, instaladas na ETE São João Navegantes. Porto Alegre 2006.	39
Figura 4: Fluxograma geral da ETE São João Navegantes (DMAE). Porto Alegre 2006.	40
Figura 5: Comportamento de coliformes totais, <i>Escherichia coli</i> e colifagos no afluente bruto e nos dois bioprocessos: efluente do reator UASB da unidade experimental do IPH/UFRGS e efluente dos lodo ativado da ETE São João Navegantes do DMAE – Porto Alegre, de junho/2006 à junho/2007.	55
Figura 6: Linhas de Tendência do comportamento dos microrganismos analisados: colifagos, <i>E. coli</i> e coliformes totais, no afluente bruto, no período analisado.	56
Figura 7: Linhas de Tendência do comportamento dos microrganismos analisados: colifagos, <i>E. coli</i> e coliformes totais, no efluente do reator UASB, no período de junho de 2006 à junho de 2007.	57
Figura 8: Linhas de Tendência do comportamento dos microrganismos analisados: colifagos, <i>E. coli</i> e coliformes totais, no efluente reator de lodo ativado, no período de junho de 2006 à junho de 2007.	57
Figura 9: Linhas de tendência mostrado o comportamento dos microrganismos quando relacionados às diferentes estações do ano em esgoto bruto, no período de estudo analisado.	59
Figura 10: Efeito das estações do ano sobre os microrganismos presentes no efluente do reator UASB, no período de junho/2006 a junho/2007.	60
Figura 11: Microrganismos presentes no efluente de lodo ativado no período de estudo, analisados sob as diferentes estações do ano.	60

1 INTRODUÇÃO

Os esgotos domésticos contêm uma alta quantidade de bactérias e outros organismos patogênicos e não patogênicos que são descarregados em corpos hídricos. A contaminação da água, pela presença de bactérias e vírus patogênicos, traz conseqüências indesejáveis, principalmente relacionados à saúde pública. As doenças de veiculação hídrica são causadas, principalmente, por microrganismos patogênicos de origem entérica, animal ou humana, transmitidos pela rota fecal-oral, ou seja, são excretados nas fezes de indivíduos infectados e ingeridos na forma de água ou alimento contaminado por água poluída com fezes (Amaral et al., 2003).

As bactérias coliformes, por estarem sempre presentes no excremento humano, são organismos indicadores, adotados atualmente como referência para indicar e medir a grandeza da contaminação (Silveira, 2004). E, ainda que sejam utilizados como indicadores de contaminação fecal, sua utilização tem apresentado algumas desvantagens, já que estudos comprovam a maior resistência dos vírus em relação aos coliformes ao tratamento de esgotos (Tavares et al., 2005; Bofill-Mas et al., 2006). Além disso, já foram registrados casos de enfermidades entéricas por consumo de água na qual não se havia detectado coliformes (Pusch et al, 2005). Os indicadores bacterianos não indicam a presença de contaminação viral entérica e, entre eles, não existe nenhuma correlação quantitativa significativa (Tavares et al., 2005). Por isso, sugere-se a utilização de vírus como indicadores da eficácia do processo de remoção microbiana em plantas de tratamento e durante a potabilização da água.

Autoridades governamentais européias incluíram, nos padrões microbiológicos utilizados na avaliação da qualidade da água, a pesquisa de enterovírus como indicadores virológicos, além dos indicadores bacterianos (Mehnert et al., 2001). No Brasil, a portaria nº 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde faz referência à necessidade da inclusão desses vírus como parâmetros de avaliação virológica da água e, segundo estudos realizados, sabe-se que enterovírus podem ser considerados importantes indicadores de contaminação ambiental e fecal de origem humana e animal. No entanto, nenhuma portaria ou legislação foi ainda elaborada no país preconizando a pesquisa de vírus como indicadores em amostras de água, de acordo com a revisão feita por Tavares et al. (2005). Devido a isso, as informações sobre a presença destes em águas e efluentes tratados são ainda insuficientes. Porém, sabe-se que o acúmulo de informações sobre a concentração e o destino destes vírus no ambiente é de

suma importância para direcionar os estudos epidemiológicos a partir do monitoramento e caracterização destes organismos (Miranda et al., 2007).

Assim, sugere-se a inclusão de colifagos, vírus que infectam bactérias do grupo coliforme, como indicador de poluição e como possível modelo do comportamento de enterovírus em esgotos sanitários, pelas suas semelhanças morfológica e estrutural, bem como, concentrações semelhantes em esgoto e fezes. A principal vantagem da análise de colifagos está na simplicidade analítica, rapidez e baixo custo, quando comparada a metodologia empregada para a detecção e quantificação de enterovírus em águas (Pedroso et al., 2003; Sobsey et al., 2005).

Para que a análise de colifagos seja válida, é necessário que as possíveis correlações existentes entre esses e vírus entéricos sejam estabelecidas. Esse resultado pode incentivar os órgãos competentes a incluírem colifagos como candidatos a serem indicadores da qualidade virológica de águas potáveis e outros usos. A identificação destes em águas potáveis é um indicativo de sua resistência aos processos convencionais de tratamento, colocando-os, também, como indicadores potenciais da eficiência do tratamento de água e efluentes (Pedroso et al., 2003). Além disso, é interessante avaliar se existe comportamento distinto, referente à sazonalidade, e se há alguma correlação entre a presença de colifagos e aqueles fatores físico-químicos que se acredita que contribuam para uma maior retenção e manutenção da infectividade dos mesmos, e que costumam ser analisados rotineiramente nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs).

Este trabalho avalia a viabilidade da utilização de colifagos como indicadores virais. Para tal, os vírus entéricos enterovírus e adenovírus foram detectados nas amostras estudadas, para posterior busca de correlações entre todas as partículas virais. Foi proposto, também, o estudo do comportamento de colifagos frente às diferentes estações climáticas e frente a alguns parâmetros já analisados nas ETEs e previstos em lei, como coliformes fecais e totais, DBO₅, turbidez e sólidos totais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Água e esgoto

A água é o elemento fundamental da vida e é, provavelmente, o único recurso natural que participa de todos os aspectos da civilização humana, desde o desenvolvimento agrícola e industrial aos valores culturais e religiosos arraigados na sociedade. A água é um recurso essencial, pois, além de participar da composição bioquímica de seres vivos, é habitat de várias espécies vegetais e animais. Seus múltiplos usos são indispensáveis a um largo espectro das atividades humanas, onde se destacam, entre outros, o abastecimento público e industrial, a irrigação agrícola, a produção de energia elétrica e as atividades de lazer e recreação. As águas utilizadas para o consumo humano e para as atividades sócio-econômicas são provenientes de recursos hídricos - rios, lagos, represas e aquíferos, também conhecidos como águas interiores (CETESB, 2007).

Em consequência da utilização da água para o abastecimento urbano, há a geração de esgotos. Esgoto é o termo usado para as águas que, após a utilização humana, apresentam as suas características naturais alteradas (Mancuso e Santos, 2003). Os esgotos são classificados em dois grupos principais: os esgotos sanitários e os industriais. Os primeiros são constituídos essencialmente de despejos domésticos, uma parcela de águas pluviais, águas de infiltração e, eventualmente, uma parcela não significativa de despejos industriais, tendo características bem definidas.

Os esgotos domésticos ou domiciliares provêm principalmente de residências, edifícios comerciais, instituições ou quaisquer edificações que contenham instalações de banheiros, lavanderias, cozinhas, ou qualquer dispositivo de utilização da água para fins domésticos. Compõem-se essencialmente de água de banho, urina, fezes, papel, restos de comida, sabão, detergentes e águas de lavagem. Os esgotos industriais provêm de qualquer utilização da água para fins industriais e adquirem características próprias em função do processo industrial empregado. Assim sendo, os efluentes de cada indústria devem ser considerados separadamente, uma vez que os mesmos diferem até mesmo em processos industriais similares (Jordão e Pessôa, 1995).

A prática de descarregar esses efluentes, tratados ou não, em corpos de água superficiais é a solução normalmente adotada pelas comunidades para afastamento de resíduos líquidos no mundo inteiro. Geralmente esses corpos de água servem como fonte de abastecimento a mais de uma comunidade, havendo casos em que a mesma cidade lança seus esgotos no mesmo corpo hídrico que ela faz uso como manancial para potabilização (Mancuso e Santos, 2003).

O desenvolvimento das cidades sem um correto planejamento ambiental resulta em prejuízos significativos para a sociedade. Esse crescimento é mais intenso em regiões metropolitanas, na capital dos estados e nas cidades pólos regionais. Os efeitos dessa realidade fazem-se sentir sobre todo o aparelhamento urbano relativo a recursos hídricos, ao abastecimento de água e ao tratamento de esgotos pluvial e cloacal. Uma das conseqüências do crescimento urbano foi o aumento da poluição doméstica e industrial, comprometendo as águas dos rios, lagos e reservatórios, criando condições ambientais inadequadas e propiciando o desenvolvimento de doenças (CETESB, 2007).

O estado de poluição das águas caracteriza-se pela presença de poluentes que afetam apenas os aspectos estéticos e ambientais. O conceito técnico de contaminação, por sua vez, está relacionado à presença de substâncias tóxicas ou de organismos patogênicos causadores de doenças de veiculação hídrica, que oferecem riscos à saúde da população. A contaminação pela presença de diversos organismos patogênicos, como algumas bactérias, protozoários, vermes e vírus, traz conseqüências indesejáveis não apenas de natureza de saúde pública como também econômica, tais como: maior incidência de doenças, aumento de mortalidade infantil, redução da produtividade, redução da vida média e aumento dos custos hospitalares (Jordão e Pessôa, 1995).

A água, desde tempos remotos, foi associada à disseminação de diversas enfermidades devido à inexistência tanto de formas adequadas e higiênicas para sua coleta, como de seu tratamento, antes e depois do consumo. Somente no século XIX, a água foi reconhecida como meio de transmissão de doenças. Em 1849, o médico John Snow estabeleceu ser a água o meio pelo qual o cólera era transmitida ao ser humano. Após os estudos de Snow, sucederam-se a identificação e a classificação dos agentes patogênicos causadores de diversas doenças de

veiculação hídrica, como a febre tifóide (1880), o cólera (1884), a disenteria (1898) e a febre paratifóide (1900) (Daniel, 2001).

No Brasil, o lançamento indiscriminado de esgotos domésticos não tratados é ainda a principal fonte de poluição dos corpos hídricos. Nas maiores regiões metropolitanas, como as do Rio de Janeiro e São Paulo, o lançamento de esgotos domésticos não tratados constitui cerca de 70% da poluição das águas, sendo os efluentes industriais responsáveis pelo restante da poluição. Por isso, existe hoje uma grande preocupação em relação ao grau de tratamento e ao destino final dos esgotos, e as conseqüências sobre o meio ambiente, a qualidade das águas e seus usos benéficos (Jordão e Pessôa, 1995).

2.2 Sistemas de tratamento de esgotos sanitários

As estações de tratamento de esgotos são sistemas que tratam águas residuárias de origem doméstica, chamadas de esgotos sanitários. O tratamento é dado por uma série de operações e processos unitários, visando à remoção de substâncias indesejáveis, para depois serem escoadas para o mar ou rio com um nível de contaminação e poluição conforme estabelece a legislação relacionada ao controle e preservação dos recursos hídricos (Pessôa e Jordão, 1995).

O tratamento de esgotos é realizado através de operações físicas, processos biológicos e químicos, os quais são chamados de tratamento primário, secundário e terciário, respectivamente (Jordão e Pessôa, 1995), conforme ilustra a figura 1. Os processos físicos se dão pela separação da matéria sólida. O tratamento biológico é resultante da transformação da matéria orgânica, pela ação de microrganismos, aeróbios e/ou anaeróbios, e, por fim, o tratamento químico, que é dado pela desinfecção e liberação do efluente ao recurso hídrico.

2.4.1 Operações Físicas

As operações físicas são assim definidas devido à predominância dos fenômenos físicos adotados por um sistema ou dispositivo de tratamento dos esgotos. Estes fenômenos caracterizam-se, principalmente, pelos processos de remoção das substâncias fisicamente separáveis ou que não se encontram dissolvidas. Os processos físicos têm como objetivo a

retirada de sólidos grosseiros que podem afetar a eficiência dos processos subsequentes. Entre estes, destacam-se:

1. Grades, para a remoção de sólidos grosseiros;
2. Caixa de areia, para a remoção dos sólidos decantáveis;
3. Caixa de gordura, para a remoção dos sólidos flutuantes.

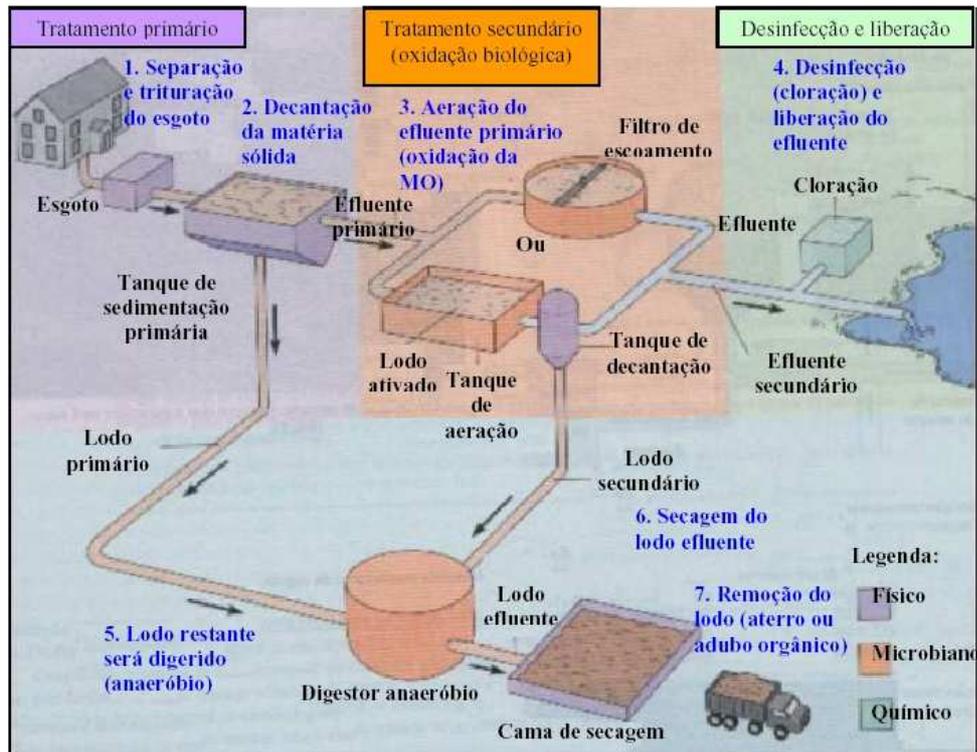


Figura 1: Principais processos físicos, químicos e biológicos empregados no tratamento de esgotos domésticos (Fonte: http://ib.ufpel.edu.br/micro_aquatica.pdf).

2.4.2 Processos Biológicos

São processos que dependem da ação de microrganismos presentes nos esgotos, os quais transformam a matéria orgânica presente nos mesmos. Os fenômenos inerentes à respiração e à alimentação são predominantes na transformação dos componentes complexos em compostos simples, tais como sais minerais, gás carbônico e outros. Os dispositivos racionalmente projetados para o tratamento de esgotos procuram propiciar condições para que ocorram esses processos observados na natureza, condicionando-os em área e tempo economicamente justificáveis.

Os principais processos biológicos de tratamento de esgotos ocorrem através de oxidação biológica no processo de lodo ativado. Este é um dos métodos biológicos mais eficientes e utilizados no tratamento de esgotos. Neste processo, o esgoto afluente e o lodo ativado (biomassa ativa) são misturados e aerados, em tanques de aeração.

A microbiota presente (bactérias, fungos, protozoários e nematodos) utiliza o substrato presente no afluente como fonte de energia. A biodegradação da matéria orgânica ocorre com a geração de energia, a qual, juntamente com nutrientes (nitrogênio e fósforo), é utilizada para a formação de novas células (Melchior et al., 2003).

No decantador secundário, ocorre a sedimentação de sólidos, permitindo que o efluente final saia clarificado. Os sólidos sedimentados no decantador secundário são recirculados para o reator, aumentando a concentração de biomassa no mesmo, o que é responsável pela elevada eficiência do sistema, ou são retirados para tratamento específico ou destino final (von Sperling, 2005).

O lodo ativado é dotado de enorme atividade autodepuradora de esgotos, ou seja, é capaz de restabelecer o equilíbrio no meio após as alterações induzidas pelos despejos afluentes (von Sperling, 2005). Assim, quando esse lodo é misturado a novas quantidades de esgoto fresco e em presença de aeração, ele promove a rápida depuração, em muito menos tempo do que o necessário somente com a introdução de ar. Por este motivo, nos sistemas de lodo ativado, parte do lodo secundário é recirculado e o excesso de lodo é conduzido a um decantador, passando por um digestor e, depois, por um concentrador de lodo para a desidratação. A digestão dos lodos é um processo de decomposição anaeróbica e que tem por finalidades destruir as bactérias patogênicas, reduzir o volume dos lodos e aproveitar os gases resultantes.

No lodo ativado, a autodepuração e, entre outras coisas, a destruição de microrganismos patogênicos é consequência de processos físicos, físico-químicos, bioquímicos e biológicos. Segundo Branco (1986), esses processos são principalmente os seguintes:

Físicos

1. Luz solar – radiação ultravioleta
2. Temperatura

3. Adsorção
4. Flocculação
5. Sedimentação

Físico-químicos

1. pH
2. Efeitos osmóticos
3. Toxicidade química

Biológicos e bioquímicos

1. Predação
2. Competição
3. Falta de nutrientes

O UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) é um reator anaeróbio de manta de lodo no qual o esgoto afluente entra na sua parte inferior e, em movimento ascendente, atravessa uma camada de lodo biológico que se encontra no fundo, e passa por um separador de fases enquanto escoar em direção à superfície.

O reator UASB em sua coluna ascendente consiste de um leito de lodo, *sludge bed*, uma zona de sedimentação, *sludge blanket*, e o separador de fase, *gas-solid separator – GSS*. Este separador de fases, um dispositivo característico do reator, tem a finalidade de dividir a zona de digestão (parte inferior), onde se encontra a manta de lodo responsável pela digestão anaeróbia, e a zona de sedimentação (parte superior).

O efluente segue uma trajetória ascendente dentro do reator, desde a sua parte mais baixa, e atravessa a zona de digestão, escoando a seguir pelas passagens do separador de fases e alcançando a zona de sedimentação. O esgoto, após entrar e ser distribuída pelo fundo do reator UASB, flui pela zona de digestão, onde se encontra o leito de lodo, ocorrendo a mistura do material orgânico nela presente com o lodo. Os sólidos orgânicos suspensos são quebrados, biodegradados e digeridos através de uma transformação anaeróbia, resultando na produção de biogás e no crescimento da biomassa bacteriana. O biogás segue em trajetória ascendente com o líquido, após este ultrapassar a camada de lodo, em direção ao separador de fases.

2.2.3 Processos Químicos

São os processos em que há utilização de produtos químicos e, devido aos maiores custos que isto implica, esta etapa no tratamento tem sido menos aplicada. Eles são utilizados quando os processos físicos e biológicos não atendem ou não atuam eficientemente nas características que se deseja reduzir ou remover. O processo mais comumente utilizado é a cloração do efluente da estação de tratamento, visando a sua desinfecção. Essa deve ser realizada a fim de se manter as condições sanitárias do corpo de água receptor, utilizado, por exemplo, para abastecimento de água ou para atividades de lazer e desportivas.

Os agentes desinfetantes utilizados são o cloro e seus compostos, em dosagem de acordo com as características das águas de esgoto. No caso de ser utilizada a desinfecção dos efluentes numa estação de tratamento de esgotos, esta geralmente é a última fase de todo o tratamento. Outros processos químicos também adotados em tratamento de esgotos são precipitação química, floculação, neutralização ou correção do pH.

2.4.4 Estações de Tratamento de Esgotos em Porto Alegre

É atribuição do Departamento Municipal de Água e Esgotos (DMAE) conservar e operar o sistema de esgotamento cloacal público e executar ligações de esgoto no município. São nove as unidades de tratamento de esgoto de Porto Alegre são: São João-Navegantes, Ipanema, Belém Novo, Restinga, Arvoredo, Rubem Berta, IAPC, Lami e Esmeralda.

2.3 Legislação

Os critérios de seleção do tipo e grau de tratamento estão também relacionados às exigências da legislação ambiental, cuja peça fundamental, no âmbito, no Brasil, é a Lei 6.938 de 31 de agosto de 1981, que institui a Política Nacional do Meio Ambiente (PNMA), e o Decreto 99.274, de 06 de junho de 1990, que a regulamenta. De acordo com esses dispositivos, entre os principais instrumentos da PNMA pode-se ressaltar o estabelecimento de padrões de qualidade ambiental, a avaliação de impactos ambientais e o licenciamento de atividades poluidoras (Jordão e Pessôa, 1995). A Lei nº 9.433 de 8 de janeiro de 1997 institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de

Recursos Hídricos, visando uma série de planos, como outorga e cobrança pelo uso da água, visando à manutenção e à preservação dos mananciais.

O objetivo desses instrumentos é que os lançamentos dos esgotos sanitários tratados nos corpos d'água considerem e preservem (Jordão e Pessôa, 1995):

1. O aspecto estético;
2. A vida aquática;
3. A saúde pública.

O licenciamento ambiental é um procedimento pelo qual o órgão ambiental competente permite a localização, a instalação, a ampliação e a operação de empreendimentos e atividades utilizadores de recursos ambientais, e que possam ser considerados efetiva ou potencialmente poluidores, ou de outras que, sob qualquer forma, possam causar degradação ambiental. Cabe aos órgãos ambientais estaduais, responsáveis pelo licenciamento (a Fundação Estadual de Proteção Ambiental – FEPAM, no Rio Grande do Sul), determinar padrões de lançamento de efluentes em corpos hídricos pelos empreendimentos, de acordo com as legislações já existentes do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) ou do Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA). Os procedimentos e critérios utilizados no licenciamento dos empreendimentos pelos órgãos ambientais estão estabelecidos na Resolução CONAMA nº 237 de 19 de dezembro de 1997, bem como, também, as atividades e empreendimentos sujeitos ao licenciamento ambiental. De acordo com a referida Resolução, a atividade de tratamento de esgoto sanitário é sujeita ao licenciamento ambiental.

Os padrões de qualidade desejada para a água devem ser cumpridos, por meio da legislação, pelas entidades envolvidas com a água a ser utilizada. Os tipos de padrões ou as diretrizes de interesse que tangem à qualidade da água em corpos d'água e ao reuso de efluentes tratados são: padrões de lançamento no corpo receptor, padrões de qualidade do corpo receptor e padrões de qualidade para determinado uso do efluente tratado.

Os padrões nacionais são definidos por cada país, têm status de lei e são baseados nas características específicas do país. Padrões regionais também podem existir para cada estado ou outra forma de divisão política. A Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005), a nível federal, dividiu as águas doces do território nacional, criando cinco classes. A Classe Especial pressupõe os usos mais nobres e a Classe 4, os menos nobres. A cada uma dessas

classes corresponde uma determinada qualidade a ser mantida no corpo hídrico. Essa qualidade é expressa em forma de padrões, através da referida Resolução. Além dos padrões de qualidade dos corpos receptores, a referida resolução do CONAMA apresenta padrões para lançamento de efluentes em corpos d'água (von Sperling, 2005). A Resolução CONSEMA 128/2006 (BRASIL, 2006), a nível estadual, fixa valores de padrões de emissão de efluentes líquidos para fontes de emissão que lancem seus efluentes em águas superficiais do Rio Grande do Sul. A Resolução CONAMA 274/2000 estabelece padrões para balneabilidade, prevendo categorias de acordo com o perfil de coliformes fecais e coliformes totais presentes nas águas (von Sperling, 2005).

As citadas Resoluções do CONAMA e do CONSEMA fazem referência ao nível de coliformes termotolerantes e eficiência exigida de sua remoção pelos sistemas de tratamento. Nenhuma faz referência direta ou indireta a respeito da quantidade ou a simples presença de vírus entéricos ou seus possíveis indicadores, colifagos, em efluentes tratados, principalmente quando estabelecidos padrões para determinação de água própria e excelente para balneabilidade ou água apropriada ao consumo humano.

2.4 Análises físicas e químicas

As águas usadas pela população e descartadas geram impacto em cursos d'água, pois apresentam diferentes características físico-químicas e biológicas daquelas utilizadas para abastecimento. As análises físicas e químicas são realizadas a fim de se caracterizar não só a qualidade dos esgotos, mas também do corpo hídrico que o recebe. Com o monitoramento dos recursos hídricos que recebem efluentes, é possível se acompanhar as conseqüentes alterações de sua qualidade, podendo-se, assim, desenvolver instrumentos de gestão, fornecendo subsídios para ações saneadoras, assegurando o bem estar e a saúde da população.

Os dados obtidos com esta atividade são interpretados segundo a Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005, a nível Federal, que fixa o padrão de qualidade que deve ter a água no meio ambiente em função do uso a ela destinada. Esta resolução também estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes. E, baseada nela, são feitas as licenças ambientais para que todos os empreendimentos, inclusive as estações de tratamento de esgotos, tenham determinados os parâmetros e seus respectivos valores máximos que devem ser atendidos e monitorados (FEPAM, 2007). A Resolução CONSEMA 128/2006

(BRASIL, 2006), a nível Estadual, estabelece valores mais rigorosos de limites de lançamento ou de parâmetros que não são contemplados na referida Resolução Federal.

Os principais parâmetros físicos e químicos relativos a esgotos predominantemente domésticos e que merecem destaque especial face à sua importância são sólidos, turbidez, indicadores de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo (von Sperling, 2005).

2.4.1 Matéria Orgânica

A matéria orgânica é o principal elemento de contaminação fecal. A introdução deste composto em um corpo d'água resulta no consumo excessivo de oxigênio dissolvido, devido aos processos de estabilização da matéria orgânica realizados pelas bactérias decompositoras.

A capacidade da matéria orgânica presente em uma amostra de água em consumir oxigênio é chamada de demanda bioquímica de oxigênio (DBO_5) (Baird, 2001). O consumo de oxigênio é resultado da oxidação da matéria orgânica dissolvida por decomposição microbiana aeróbia até uma forma inorgânica estável. O esgoto sanitário com alta DBO_5 indica que este provocará um grande consumo de oxigênio pelos microrganismos presentes no corpo hídrico aonde desaguará, justamente por ser rico em matéria orgânica. Por sua vez, uma amostra com baixa DBO_5 indica pequena concentração de matéria orgânica presente, ocasionando pouco consumo de oxigênio dissolvido. Já a demanda química de oxigênio (DQO) é a quantidade de oxigênio consumida para oxidação da matéria orgânica através de uma solução de dicromato de potássio.

Para lançamento de esgotos, a Resolução CONSEMA 128/2006 estabelece DBO_5 com o valor máximo de 40 mg O_2/L para vazões maiores 10.000 m³/dia e 180 mg O_2/L para vazões menores que 20 m³/dia.

2.4.2 Turbidez

A turbidez representa o grau de interferência com a passagem da luz através da água, conferindo uma aparência turva à mesma, e é causada principalmente pelos sólidos em suspensão, podendo ser de origem natural ou antropogênica. A primeira é proveniente de partículas de rochas, argila ou silte. A segunda é relacionada a despejos domésticos e

industriais ou à erosão, podendo estar associada a compostos tóxicos e organismos patogênicos. A turbidez pode acarretar em inconvenientes sanitários diretos. Além de ser esteticamente desagradável na água potável, os sólidos em suspensão podem servir de abrigo para microrganismos patogênicos (diminuindo a eficácia da desinfecção). Este parâmetro é utilizado frequentemente para caracterização de águas de abastecimento brutas e tratadas, controlando a operação das estações de tratamento de água (von Sperling, 2005). Nenhuma das duas Resoluções fazem referência ao valor limite de turbidez aceitável para lançamento de efluentes em corpos hídricos. No entanto, como turbidez está diretamente relacionada a sólidos suspensos, podem-se relacionar esses parâmetros a sólidos sedimentáveis. Este é, por definição, a porção de sólidos em suspensão que se sedimenta sob a ação da gravidade durante uma hora, a partir de um litro de amostra mantida em repouso em um cone Imhoff. A Resolução CONSEMA faz referência à quantidade de sólidos sedimentáveis, estabelecendo que o padrão de lançamento dos referidos sólidos deve ser menor ou igual a 1,0 mL/L de efluente tratado.

2.4.3 Sólidos Totais

Os sólidos presentes em esgotos sanitários geram uma série de impactos que afetam diretamente os microrganismos aquáticos. Os principais efeitos da poluição pela matéria sólida são aumento da turbidez; impedimento à penetração da luz no corpo d'água, necessária para muitos organismos para a realização da fotossíntese e conseqüente produção de oxigênio dissolvido; assoreamento de reservatórios e geração de maus odores por condições anaeróbias em depósitos de lodos (Jordão e Pessôa, 1995).

Os sólidos podem ser classificados de acordo com seu tamanho e estado, suas características químicas e sua sedimentabilidade. A separação dos sólidos é feita passando-se a amostra por um papel de filtro com porosidade de tamanho padronizado. Os sólidos retidos no filtro são considerados sólidos em suspensão, enquanto que os sólidos que passam com o filtrado são considerados sólidos dissolvidos. Por meio de pesagem do papel de filtro (antes e depois, excluindo-se a água do filtro por evaporação), tem-se a massa de sólidos em suspensão, que, dividida pelo volume da amostra, se obtém a concentração (mg/L) (von Sperling, 2005). A Resolução CONSEMA 128/2006 estabelece o limite de lançamento, em corpos hídricos, efluentes domésticos de até 180 mg/L em vazões menores que 20 m³/dia e 50 mg/L em vazões maiores que 10.000 m³/dia.

2.4.4 Parâmetros, periodicidade e pontos de coleta da análise exigidos pela legislação

A Resolução CONSEMA 128/2006 estabelece padrões para o lançamento de efluentes líquidos domésticos em corpos d'água, fazendo referência aos seguintes parâmetros: demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅), demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos, fósforo total, nitrogênio amoniacal e coliformes termotolerantes. A Resolução confere a possibilidade do órgão ambiental responsável pelo licenciamento exigir condições especiais para o lançamento de efluentes líquidos domésticos, independente das já referidas, além de poder incluir outros parâmetros, como o controle de metais pesados e compostos organoclorados.

Para as Estações de Tratamento de Esgotos de Porto Alegre, a Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM) exige o monitoramento de alguns parâmetros físico-químicos, que estão definidos na Licença de Operação de cada empreendimento. Entre eles, os mais comuns são: sólidos sedimentáveis, temperatura, pH, óleos e graxas, além dos exigidos pela Resolução CONSEMA. A FEPAM exige, também, que o empreendedor realize análises do afluente bruto e efluente final, para determinar a eficiência do tratamento. Todas essas análises devem ser realizadas, no mínimo, mensalmente.

2.5 A presença de microrganismos na água e no esgoto

Um dos mais importantes aspectos de contaminação das águas é relacionado ao fator higiênico associado às doenças de veiculação hídrica. Um corpo d'água receptor de esgotos pode incorporar a si toda uma ampla gama de agentes transmissores de doenças. Este fato pode não gerar um impacto à biota do corpo hídrico em si, mas afeta alguns dos usos preponderantes a ele destinados, tais como abastecimento de água potável, irrigação e balneabilidade (von Sperling, 2005). Por isso, a presença de microrganismos tem sido utilizada por décadas como indicador de qualidade das águas.

Os organismos mais comumente encontrados em águas e esgotos podem ser divididos em quatro grupos distintos: vírus, bactérias, protozoários e helmintos. A maioria deles é de origem entérica, ou seja, são excretados junto com o material fecal e liberados no esgoto, aonde poderão entrar em contato com os corpos d'água. Alguns microrganismos que sempre são encontrados no material fecal são utilizados como indicadores da presença de patógenos,

pois é técnica e economicamente impraticável a detecção de todos os microrganismos passíveis de serem encontrados em águas (Toze, 1999).

2.5.1 Bactérias

As bactérias coliformes são típicas do intestino humano e de outros animais homeotermos (mamíferos e aves em geral) e, por estarem sempre presentes no excremento humano (100 a 400 bilhões de coliformes/hab.dia) e serem de simples determinação, são adotadas como referência para indicar e medir a grandeza da contaminação (Silveira, 2004). Portanto, elas são o que chamamos de um organismo indicador. Algumas bactérias coliformes não transmitem qualquer doença, mas outras podem também ser causadoras de algumas doenças de veiculação hídrica.

Salmonella typhi, bactéria responsável pela febre tifóide, moléstia reconhecidamente transmitida pelas águas, e *Salmonella paratyphi*, causadora da febre paratifóide, também disseminada por águas, são exemplos de bactérias patogênicas. Outras linhagens de coliformes podem ser patogênicas, quando presentes em outras partes do corpo humano. Por exemplo, a bactéria *Escherichia coli*, chamada de enterotoxigênica, é uma importante causa de diarreias, infecções urinárias e meningites (von Sydow et al., 2006).

Seria demasiadamente trabalhoso e custoso realizar todas as análises de forma a determinar a presença ou não dos diversos organismos patogênicos na água e no esgoto. Por isso, se utiliza a presença de coliformes, como um indicador do seu potencial de patogenicidade (Jordão e Pessôa, 1995; Silveira, 2004).

A Portaria 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde determina, como padrão microbiológico de potabilidade para consumo humano, a ausência de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes em 100 mL da amostra de água analisada. Verifica-se que raramente ocorrem casos de distúrbios gastrointestinais em populações abastecidas com águas que obedeçam a esse padrão. Para o lançamento de esgotos domésticos, a Resolução CONSEMA 128/2006 estabelece o máximo de 10^3 NMP/100 mL de *Escherichia coli* ou a comprovação de uma eficiência de 99% de remoção deste microrganismo, numa vazão superior a 10.000 m³/dia.

Os principais indicadores de contaminação fecal comumente utilizados são coliformes totais, coliformes fecais, denominados de coliformes termotolerantes, e *Escherichia coli*. O grupo de coliformes totais constitui-se em um grande grupo de bactérias que têm sido isoladas de amostras de águas contaminadas e solos poluídos e não poluídos, bem como de fezes de seres humanos e outros animais de sangue quente. O grupo compreende bactérias Gram negativas, fermentadoras de lactose, não formadoras de esporos e que se desenvolvem a 37°C. Esse grupo foi muito utilizado como indicador, e continua a ser utilizado em algumas áreas, embora as dificuldades associadas com a ocorrência de bactérias não fecais seja um problema (von Sperling, 2005).

Não existe uma relação quantificável entre coliformes totais e microrganismos patogênicos. Os coliformes totais poderiam ser denominados de coliformes ambientais, dada a sua possível incidência em águas e solos não contaminados, representando, portanto, outros organismos de vida livre e não intestinal. Por esta razão, os coliformes totais não devem ser utilizados isoladamente como indicadores de contaminação fecal em águas superficiais (von Sperling, 2005).

Os coliformes termotolerantes são um grupo de bactérias indicadoras de organismos originários predominantemente do trato intestinal humano e de outros animais. O grupo consiste num subgrupo das bactérias do grupo coliforme que fermentam a lactose a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ em 24 horas. A quantidade destes na água está diretamente relacionada com riscos de contrair doenças gastrointestinais. Este grupo, de origem unicamente fecal, compreende o gênero *Escherichia* e, em menor grau, espécies de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*. A bactéria *Escherichia coli* é a principal representante do grupo de coliformes fecais, presente em fezes humanas e animais em percentuais que variam entre 94 e 96% (Cerqueira et al., 1998). Essa bactéria é encontrada em esgotos, efluentes tratados e águas naturais sujeitas à contaminação recente por seres humanos, atividades agropecuárias, animais selvagens e pássaros (WHO, 2004). A sua detecção laboratorial é bastante simples, principalmente devido aos recentes métodos fluorogênicos.

2.5.2 Vírus

Organismos indicadores convencionais são adequados para águas altamente contaminadas, como esgotos domésticos com concentrações maiores que 10^6 NMP/100 mL. Contudo, a natureza dos poluentes vem se alterando ao longo das décadas, tornando-se necessária uma nova ênfase na identificação da qualidade das águas.

Os vírus entéricos são alvo da preocupação dos estudos sobre a eficiência dos sistemas de tratamento de esgoto e de reuso da água, quando a fonte poluente são as fezes humanas, pois possuem uma maior resistência a estes tratamentos, em relação aos coliformes. Por isso, vários pesquisadores sugerem a inclusão desses microrganismos como indicadores de risco devido à gravidade das doenças causadas por esse tipo de agente, lançando a preocupação da possibilidade de sua transmissão direta ou indiretamente através de águas de esgoto contaminadas (Queiroz, 1999; Mocé-Llivina et al., 2003; Mocé-Llivina et al., 2005; Sobsey et al., 2005; Jiang et al., 2007).

A pesquisa de vírus na água iniciou após a ocorrência de um surto de hepatite E em Nova Délhi, Índia, em 1956, como consequência da contaminação do sistema de tratamento da água por patógenos virais provenientes do esgoto. Cerca de 60% da população, abastecida de águas aparentemente satisfatórias do ponto de vista de coliformes, foi infectada pelo vírus da hepatite E. A água era submetida à pré-sedimentação, coagulação e floculação com sulfato de alumínio, decantação por seis horas, filtração em filtros rápidos de areia e pós-cloração com cloro combinado, e os reservatórios de distribuição de água na cidade apresentavam 0,15 a 0,20 mg/L de cloro residual. Somente foi poupada da infecção a população que era abastecida com águas de uma estação de tratamento que incluía pré-cloração no seu tratamento e utilizava cloro livre, no lugar de cloro combinado (Branco, 1986).

Depois desse episódio, tiveram início os estudos na área da virologia aquática, atualmente denominada virologia ambiental (Bosch, 1998). O teor de cloro ativo, que permanece após a cloração, garante a qualidade microbiológica da água, desinfetando tubulações percorridas pela água. É recomendado, no Brasil, de acordo com a Portaria 1.469/2000 do Ministério da Saúde, que, após a cloração, a água deve conter o teor mínimo de cloro residual livre de 0,5 mg/L, sendo obrigatória a manutenção de, no mínimo, 0,2 mg/L em qualquer ponto da rede de distribuição. A pré-cloração auxilia a eficiência da coagulação e

floculação com sulfato de alumínio e, o cloro livre, apresenta eficiência germicida bem superior ao cloro combinado.

O seguimento dos estudos possibilitou que fossem traçadas as rotas mais comuns de transmissão de doenças (figura 2): mariscos que se desenvolvem em águas contaminadas, culturas vegetais que crescem em terras irrigadas com efluente ou são fertilizadas com lodos, águas recreacionais e demais que são consumidas e estão contaminadas por vírus (Metcalf et al., 1995). Com a determinação das possíveis maneiras do acesso destas partículas até a população, tecnologias que objetivassem a detecção viral em amostras ambientais puderam ser desenvolvidas e aprofundadas.

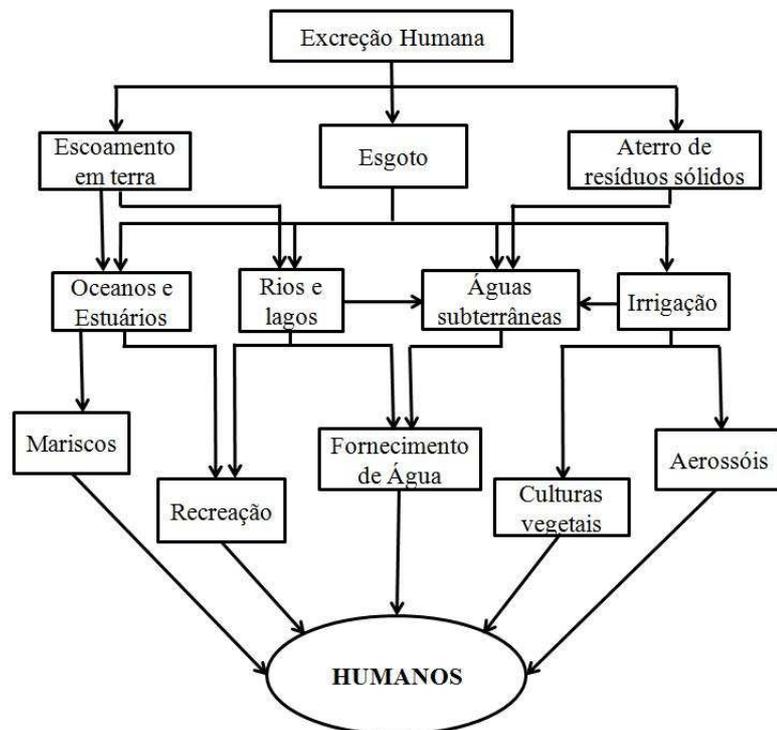


Figura 2: Rotas de transmissão de vírus entéricos no ambiente. (adaptado de Metcalf et al., 1995).

2.5.2.1 Métodos de concentração e detecção de vírus entéricos em amostras ambientais

Os diversos métodos desenvolvidos refletem a transição dos procedimentos para o isolamento de vírus. O primeiro método desenvolvido foi baseado na indução de doenças em cobaias animais para posterior detecção da existência ou não de efeitos citopáticos em teste culturas celulares. No entanto, algumas partículas virais não apresentam este efeito no

referido teste, como o vírus da Hepatite A ou do Norwalk (Garrafa, 2009). Posteriormente, técnicas baseadas em métodos imunológicos também foram testadas. Estas metodologias, também, não foram muito bem sucedidas, pois, durante o procedimento de análise, se perdia parte da sensibilidade requerida para detecção de baixas quantidades de vírus, que efetivamente são esperadas em amostras ambientais.

Assim, a preocupação com a saúde e segurança da população alertou para a necessidade do desenvolvimento de novos testes, com diferentes abordagens. Os novos procedimentos necessitavam ser rápidos, sensíveis e específicos, além de ser quantitativos e, preferencialmente, aptos para distinguir vírus infecciosos dos não infecciosos (Metcalf et al., 1999). Assim, não atendendo somente ao requisito de determinação de infectividade, os métodos moleculares são utilizados preferencialmente na detecção do genoma viral.

As etapas básicas para a análise virológica da água são amostragem, concentração, descontaminação e/ou remoção de inibidores e detecção específica (Bosch, 1998). Para detecção de baixas quantidades de vírus, são coletados grandes volumes das mesmas. Depois, é necessária uma metodologia distinta para a separação das partículas virais da amostra e a concentração em volumes reduzidos, para posterior análise molecular.

O método *Viradel*, por ter sido muito aperfeiçoado, foi incluído no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. Atualmente, é a técnica mais empregada para a concentração de vírus entéricos. É baseada na capacidade de adsorção dessas partículas a filtros de celulose microporosos e carregados positiva ou negativamente, para posterior eluição em soluções protéicas. A utilização de membranas eletronegativas tem o inconveniente da realização de uma etapa prévia de acidificação da amostra, o que pode ocasionar a inativação de alguns vírus, visto que estas partículas são sensíveis a faixas de pH baixo (Bosch et al., 2005). Já as membranas eletropositivas têm sido utilizadas com êxito, pois em conjunto com a purificação com Vertrel®, se obtiveram resultados satisfatórios em relação à remoção de inibidores de PCR (Queiroz et al., 2001).

Devido ao grande volume de solução eluente utilizada no método de filtração-eluição, este requer uma etapa adicional de reconcentração, denominada ultrafiltração, condensando os microrganismos em pequenos volumes (Queiroz, 1999).

A análise molecular mais empregada é a Reação em Cadeia da Polimerase - PCR. É baseada em uma amplificação enzimática, *in vitro*, de ácidos nucleicos marcados diretamente por um par de oligonucleotídeos específicos. Com a repetição dos ciclos na reação, são conseguidos cerca de 10^6 cópias do DNA original.

No caso de vírus que possuem RNA como material genômico, primeiro deve haver a síntese do cDNA, pela reação de transcrição reversa. Esta reação de amplificação realizada em duas etapas é denominada Transcrição Reversa em Cadeia da Polimerase (RT-PCR). A sensibilidade da técnica de PCR facilita a detecção de baixas quantidades de DNA e RNA presentes. Esta metodologia, além de ser capaz de encontrar partículas que não detectáveis em cultura celular, é capaz de determinar tipos virais específicos (Bosch, 1998; Jiang et al., 2001). Abbaszadegan et al. (2003) analisaram 448 amostras de águas subterrâneas dos Estados Unidos, e revelaram que 141 amostras (31,5%) resultaram positivas para a presença de vírus entéricos, analisados por RT-PCR, enquanto apenas 21 amostras (4,7%) resultaram positivas por detecção de infectividade viral por cultura celular.

Uma variação da técnica de PCR, denominada *nested* PCR, aumenta a sensibilidade e a especificidade de detecção do ácido nucleico de interesse, pois se utilizam dois *primers* internos para sua realização (Abbaszadegan et al, 1993). Jiang et al. (2001) comprovaram em seu estudo que a técnica de ultrafiltração combinada com *nested* PCR é um método efetivo para a detecção de adenovirus humanos de uma amostra de 20 litros.

A análise de PCR requer a ação conjunta de enzimas e co-fatores para sua efetiva realização. O principal exemplo é relacionado ao correto funcionamento da enzima DNA polimerase, que requer a presença de íons livres de magnésio (Vivantis, 2006). Entretanto, juntamente com os vírus, substâncias que prejudicam ou inibem a análise de PCR são concentradas (Bosch, 1998). As amostras ambientais contêm uma grande variedade de destas substâncias, como ácidos húmicos, polissacarídeos e íons de ferro e alumínio, que podem se adsorver a enzimas ou agir como quelantes do cátion divalente Mg^{2+} , podendo interferir quimicamente em seus sítios ativos e/ou ligando-se aos íons livres de Mg^{2+} , impedindo os seus funcionamentos corretos (Abbaszadegan et al., 1993). Por isso, procedimentos adicionais necessitam ser realizados a fim de se remover os inibidores, se análises moleculares forem aplicadas para a detecção viral (Bosch, 1998).

Tendo em vista a vantagem em relação à sensibilidade e especificidade da metodologia, técnicas moleculares falham na distinção entre partículas infecciosas das não infecciosas, o que pode ter importância significativa na virologia ambiental. Tal importância é relacionada à capacidade do vírus de infectar seu hospedeiro específico, e então ser considerado um verdadeiro agente etiológico. A utilização de linhagens celulares suscetíveis a suportar a propagação de uma ampla variedade de vírus entéricos permite a replicação viral em cultura celular. Este objetivo cumpre dois propósitos: o aumento do número de cópias do ácido nucléico alvo, o que facilita a posterior detecção por PCR, além da incorporação do ensaio de infectividade viral (Bosch, 1998).

Sempre que possível, a utilização combinada das técnicas de cultura celular e PCR oferece maiores vantagens do que as metodologias utilizadas separadamente. Além de determinar se as partículas virais estão ou não aptas a infectar o seu hospedeiro específico e facilitar a detecção no teste de PCR, a diluição da amostra pelo meio de cultura também fornece uma redução do efeito de compostos tóxicos em cultura de células e substâncias inibidoras de PCR (Bosch, 1998; Ballester et al., 2005).

2.5.2.2 Epidemiologia dos vírus entéricos

Os vírus entéricos, como os enterovírus, rotavírus, vírus da hepatite A e E, e alguns tipos de adenovírus, são excretados nas fezes e na urina de indivíduos infectados em grandes quantidades (Schwartzbrod, 1995; Mehnert & Stewien, 1993). Segundo revisão realizada por Tavares et al. (2005), os vírus entéricos são capazes de contaminar direta ou indiretamente águas destinadas ao consumo humano.

A presença destes patógenos em águas ou alimentos contaminados por resíduos fecais, provenientes de descargas de esgotos, tem contribuído para a ocorrência de doenças em indivíduos suscetíveis, tais como paralisias, meningites, doenças respiratórias, gastroenterites, miocardites e infecções oculares (Muscillo et al., 2008). A dose infectante destes agentes é extremamente baixa, podendo variar de uma a dez unidades infecciosas.

Os vírus entéricos podem permanecer viáveis e potencialmente infectantes durante vários meses na água, resistindo a condições ambientais adversas, embora não se multipliquem, pois são parasitas intracelulares obrigatórios (Tavares et al., 2005). Alguns

podem resistir a processos de tratamento de água e esgoto aplicados no controle bacteriano, inclusive cloração (Alwood et al., 2003). Bofill-Mas et al. (2006), utilizando a técnica de PCR quantitativo, avaliaram a presença de adenovírus e poliomavírus humanos em efluentes de esgotos tratados, demonstrando que os mesmos apresentam uma alta estabilidade nesse ambiente. Devido a essa maior resistência, as partículas virais não apresentam nenhuma correlação em termos qualitativos e quantitativos com os atuais indicadores bacterianos de contaminação de águas (Tavares et al., 2005).

Um estudo realizado por Orlandi et al. (2006), em Porto Velho (RO), indicou enterovírus como o maior responsável por diarreias em crianças de até seis anos. Das 470 crianças que apresentavam diarreia aguda, 30% apresentaram contaminação por enterovírus, sendo adenovírus um dos principais vírus encontrados nas fezes.

Uhnoo et al. (1984) determinou em seus estudos que adenovírus são fortemente relacionados com gastroenterites infantis. Verma et al. (2009) relatam em seu trabalho que associações de enterovirus, calicivirus, astrovírus e adenovírus são fortemente reportadas a surtos esporádicos de diarreias, em todo o mundo. Dalla Vecchia & Spilki (2009), em análises de amostras de águas de rio, de estações de tratamento, água mineral e efluente de origem pecuária, encontraram prevalência na presença de adenovírus e enterovírus, em relação aos outros vírus estudados.

Em estudos recentes, tem sido evidenciada a prevalência de adenovírus, em relação aos demais vírus estudados, em diferentes ambientes aquáticos, como efluentes, rios e mares e suprimentos de água potável (Pusch et al., 2005, Muscillo et al., 2008). Pela grande quantidade encontrada nas amostras e sua persistência em amostras de água, alguns autores têm sugerido a utilização de adenovirus como possível modelo de vírus entéricos humanos, presentes em águas contaminadas (Jiang et al., 2001, Bofill-Mas et al., 2000, Piña et al, 1998; Martins, 2006).

2.5.2.2.1 Características dos enterovírus

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), o gênero *Enterovirus* pertencente à família *Picornaviridae*. É constituído por enterovírus humanos (tipos A a D), rinovírus humanos (A, B e C), enterovírus bovino e suíno (B), e enterovírus símio (A) (ICTV, 2010).

O vírion apresenta forma esférica, não possui envelope, tem capsídeo constituído por 12 capsómeros (60 protómeros) densamente empacotados, de simetria icosaédrica e mede de 24 nm a 30 nm de diâmetro. Cada protómero é composto por quatro poliproteínas estruturais: VP1, VP2, VP3 e VP4, sendo a VP1 mais superficial e responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira e a VP4, mais interna e associada ao ácido nucléico. O genoma viral é formado por uma molécula linear de RNA de filamento simples com polaridade positiva (Palacios & Oberste, 2005).

Enterovírus possuem diversas regiões genômicas altamente conservadas, entre os vários tipos de vírus do mesmo gênero. Deste modo, a escolha de *primers* para tais regiões permite a amplificação das seqüências da maioria dos vírus deste gênero simultaneamente, dando mais validade ao teste para identificação destes vírus. A disponibilidade de seqüência de dados para todos os membros do gênero permitiu a diferenciação dos vírus, baseado, principalmente, na seqüência do ácido nucléico responsável pela codificação da proteína VP1 do capsídeo (Palacios & Oberste, 2005).

Dos 89 sorotipos conhecidos de enterovírus, 64 são conhecidos por infectar humanos (Palacios e Oberste, 2005). De maneira geral, são eliminados por longos períodos através das fezes (um mês ou mais) e, normalmente, causam infecções assintomáticas, embora também possam causar paralisias, meningites ou cardiomiopatias. São encontrados em todas as partes do mundo e estão amplamente distribuídos durante o ano inteiro, porém com uma maior freqüência no verão e no outono em países de clima temperado (Melnick, 1996; Tavares et al., 2005).

2.5.2.2.2 Características dos adenovírus

Adenovírus humanos pertencem à família *Adenoviridae*, que pode ser dividida em cinco gêneros: *Siadenovírus*, *Mastadenovírus*, *Ichtadenovírus*, *Aviadenovírus* e *Atadenovírus* (ICTV, 2010).

O gênero *Mastadenovírus* é dividido em 22 espécies: adenovírus humanos (A a G), adenovírus bovino (A a C), adenovírus canino, adenovírus eqüino (A e B), adenovírus murino (A e C), adenovírus ovino (A e B), adenovírus suíno (A a C), adenovírus símio e adenovírus de réptil (ICTV, 2010). Os adenovírus humanos são divididos em sete subgêneros (A a G) (ICTV, 2010), baseados na homologia de DNA e propriedades biológicas e bioquímicas. São

os únicos vírus entéricos humanos que contém DNA em vez de RNA, tendo assim, uma maior estabilidade quando expostos ao ambiente, quando comparados a vírus de RNA (Jiang et al., 2001). A estabilidade desses vírus também é determinada pelas suas características estruturais, ou seja, capsídeo protéico, o arranjo conformacional do hexon e a estabilidade do conjunto formado pelo penton e a fibra (Martins, 2006).

São vírus não envelopados, com capsídeo e 17 nucleocapsídeos protéicos de simetria icosaédrica, com diâmetro entre 70 e 100 nm. O capsídeo é formado por 252 capsômeros, dos quais 240 são estruturas denominadas hexon que formam as 20 faces triangulares, e 12 são estruturas denominadas penton, que formam os vértices do icosaedro (Oliveira, 1994). O hexon é uma proteína trimérica, formada por moléculas do polipeptídeo II fortemente associadas (Horwitz et al., 1970 *apud* Martins, 2006). O penton é formado pelo polipeptídeo IV, projetando um trímero desse polipeptídeo que se constitui na fibra (van Osstrum e Burnett, 1985 *apud* Martins, 2006). O DNA dupla-fita linear codifica uma DNA-polimerase-DNA-dependente. A região do DNA que codifica o hexon possui uma parte variável que se define pela antigenicidade viral e outra região muito conservada que define pela estrutura do capsídeo viral (Martins, 2006).

A região que codifica as proteínas do capsídeo viral é altamente conservada entre os membros da família *Adenoviridae* (Silva et al., 2009). E, por isso, a escolha de *primers* para esta região permite a identificação de todos os 51 sorotipos de adenovírus de humanos (Martins, 2006).

Alguns sorotipos de adenovírus humanos, como 40 (HAdV40) e 41 (HAdV41), do espécie F, são denominados adenovírus entéricos, e são os únicos responsáveis pela maioria dos casos de adenovírus associados à gastroenterites em crianças, além de ocuparem o segundo lugar em termos de importância no estabelecimento de diarreia em nosso país. Além disso, HAdV40 e HAdV41 possuem uma estabilidade a ação de agentes físicos e químicos, possibilitando uma permanência prolongada no meio ambiente (Enriquez et al., 1995). Outros, em espécie B, são responsáveis por 5-10% de doenças respiratórias em crianças e conjuntivite (Albiñana-Gimenez, 2009).

O comportamento dos microrganismos em efluentes de estações de tratamento de esgotos pode ser influenciado por diversos fatores, dentre eles, a presença de sólidos.

Gonçalves (2006) descreveu uma estabilidade maior de vírus em relação às bactérias no meio ambiente, devido a sua adsorção a partículas em suspensão. Martins et al. (1991) justificam esse comportamento pelo fato dos vírus adsorverem mais facilmente às partículas do solo do que as bactérias. Segundo a revisão realizada por Quignon et al. (1998), se o vírus não é inativado em esgotos, a sua remoção da fase líquida é altamente dependente de sua capacidade de interação com a fase sólida, o chamado fenômeno de adsorção. Bradford et al., (2006) estudaram o comportamento do transporte de vírus em águas com poluição fecal, com e sem sólidos, e verificaram que os sólidos retêm as partículas virais, e o transporte das mesmas é dependente destes sólidos presentes, podendo ser controlados por deposição, ocorrendo pouca inativação dos vírus. Na ausência de sólidos, o transporte viral é independente e se caracteriza por ser mais efetivo.

Todos os contaminantes da água, com exceção dos gases dissolvidos, contribuem para a carga de sólidos. No entanto, a matéria orgânica constitui cerca de 50% da quantidade de sólidos totais presentes e de 72,5% da quantidade de sólidos em suspensão, ambos presentes em esgoto bruto (von Sperling, 2005).

Devido à maior prevalência de matéria orgânica como constituinte dos sólidos em suspensão, acredita-se que ela também interfira diretamente no comportamento dos microrganismos presentes em esgotos sanitários. Por isso, pode-se relacionar a variação da demanda bioquímica de oxigênio, como principal medida de matéria orgânica, com o comportamento de microrganismos e verificar se há ou não uma real interferência.

Além dos sólidos em suspensão e da demanda bioquímica de oxigênio, a turbidez também influencia na ação de bactérias e vírus. A presença de materiais em suspensão é a causa da turbidez nas águas e gera uma série de inconvenientes, principalmente relacionados ao processo de desinfecção. A eficácia desse processo está relacionada à ausência de turbidez, pois as partículas presentes em águas turvas evitam que os microrganismos sejam inativados (Amaral et al., 2006).

A menor eficiência da ação da luz solar sobre *Escherichia coli*, nas amostras de água com turbidez elevada (maior que 200 NTU), está relacionada à baixa penetração da radiação ultravioleta, já que menos de 1% de sua total incidência penetra mais do que 2 cm em sua superfície, o que diminui significativamente a sua ação germicida (Joyce et al., 1996).

O comportamento dos microrganismos também pode variar em relação à sazonalidade. Este pode ser mais um parâmetro divergente entre o comportamento de vírus e bactérias, contudo, pode ser um ponto em comum entre comportamento de bacteriófagos e vírus entéricos. Noble e Fuhrman (2001) e Jiang et al., (2007) associaram altos índices de indicadores bacterianos a períodos chuvosos e relatam que, ao contrário dos indicadores bacterianos, genomas virais humanos são encontrados em maior quantidade em tempo seco, quando comparados a períodos chuvosos. Cardoso et al (1992) relatam uma maior estabilidade de alguns enterovírus frente à climas secos. Ballester et al., (2005) encontraram maior prevalência de vírus entéricos totais na primavera.

2.5.3 Colifagos como indicadores de qualidade da água e de esgotos

O índice de coliformes ainda é o parâmetro microbiológico correntemente utilizado para avaliar a qualidade dos diferentes tipos de água. No entanto, devido à maior resistência de partículas virais aos processos de tratamento e à freqüente presença destes em fezes humanas e esgoto, a detecção de níveis de bacteriófagos somáticos (vírus que infectam bactérias via membrana celular externa), na água poluída por esgoto, tem sido proposta por diversos autores como uma forma de avaliar o nível de contaminação da mesma (Cole et al., 2003; Mocé-Llivina et al., 2003; Mocé-Llivina et al., 2005; Jiang et al., 2007; Love e Sobsey, 2007). De acordo com Schwartzbrod (1995), o indicador viral ideal precisa satisfazer as seguintes condições:

1. Estar sempre presente quando o vírus entérico estiver presente;
2. Sua incidência e persistência necessitam ser similar a dos vírus entéricos;
3. Sua contagem deve ser uma estimativa do número de vírus patogênicos presentes;
4. Deve estar presente em grandes quantidades, comparado aos vírus entéricos;
5. Necessita ser resistente a pressões ambientais e desinfetantes, como os vírus entéricos;
6. Precisa ser não patogênico e ter fácil quantificação;
7. Deve ter fácil detecção em todos os tipos de amostras.

Visto as condições, autores (Paz-y-Miño, 2003; Pedroso et al., 2003; Durán et al., 2002; Feng et al., 2003; Havelaar et al., 1993, Reynolds, 2006, LeChevallier et al., 2006,

Arraj et al., 2005) sugerem a inclusão de bacteriófagos como indicadores de poluição e como possível modelo do comportamento de enterovírus em esgotos sanitários.

Três grupos básicos de bacteriófagos têm sido propostos para serem candidatos de vírus entéricos: colifagos somáticos, bacteriófagos F⁻ específicos ou FRNA, e fagos que infectam *Bacteroides fragilis*. Os bacteriófagos que infectam *Escherichia coli* e outros coliformes são chamados de colifagos, e são o grupo de bacteriófagos mais homogêneo (Leclerc et al., 2000) e o que será analisado no presente trabalho.

Autores citam as semelhanças de vírus entéricos e colifagos em relação ao tamanho, resistência a tratamentos e densidades em esgotos ou amostras sépticas. Em adição, os colifagos são encontrados em grandes números no meio ambiente (Pedroso et al., 2003; Havelaar et al., 1993; Bosch, 1989, Jiang et al., 2001; Arraj et al., 2005). Outras pesquisas relatam a persistência de fagos no ambiente (Pedroso et al., 2003; Sobsey et al., 2005; Pillai, 2006). Além disso, apresentam uma metodologia mais simplificada e podem ser ensaiados apenas com uma fração do custo que é necessário para realização de ensaios típicos de vírus entéricos.

No entanto, alguns autores relatam alguns problemas na utilização de colifagos como indicadores. Muniesa & Jofre (2004) citam que, devido à multiplicação de fagos no ambiente, sua utilização como indicadores não é conveniente. Hot et al., (2003) não encontrou correlações entre vírus entéricos humanos e os níveis de concentração de colifagos, nas amostras de águas de superfície analisadas. Leclerc et al., (2000) descrevem que colifagos somáticos não são considerados bons indicadores, pois seus hospedeiros muitas vezes não tem procedência fecal devido as diversas fontes não fecais de bactérias coliformes. Assim, justamente por não haver uma definição a respeito da confiabilidade da utilização de colifagos como indicadores de vírus entéricos em amostras ambientais, trabalhos que visam esclarecer este viés são de suma importância.

Tanto bactérias como vírus são causadores de sérias doenças. Porém, o controle de doenças bacterianas veiculadas pela água têm sido mais efetivo devido ao sucesso da inativação das bactérias durante o tratamento de água e esgoto, já que há muito se conhece sobre estes microrganismos, seu metabolismo e suas condições ideais de sobrevivência. Em relação aos vírus, o mesmo não é recíproco (Tavares et al., 2005). Por isso, faz-se necessário o

estudo do comportamento entre microrganismos, principalmente vírus, e em relação a parâmetros físicos e químicos em Estações de Tratamento de Efluentes, principalmente entre o afluente e o efluente final.

Há décadas já se sabe das enfermidades causadas por vírus e que são veiculadas pela água. No entanto, não é previsto, em nenhuma legislação brasileira, o monitoramento destes em águas (Tavares et al., 2005).

Sabe-se que a detecção de vírus entéricos é uma técnica relativamente custosa, quando comparada com a metodologia de contagem de colifagos, pois além de necessitar habilidade técnica para sua realização, necessita também de várias etapas subsequentes, equipamentos e reagentes específicos. A análise de colifagos vem sendo reconhecida como uma alternativa para este impasse, já que é uma técnica barata e de fácil execução (Pedroso et al., 2003). Para que essa análise seja válida, é necessário que se esclareçam as divergências a respeito desse microrganismo, se é ou não um indicador potencial.

Também, é necessário avaliar as correlações existentes entre colifagos e vírus entéricos, a respeito do seu comportamento entre si, e frente a diferentes condições climáticas. Além disso, é interessante também avaliar se há alguma correlação entre a presença de colifagos e aqueles fatores físicos e químicos que se acredita que contribuam para uma maior retenção e manutenção da infectividade dos mesmos, e que costumam ser analisados rotineiramente nas Estações de Tratamento de Esgotos. Dessa forma, poderemos talvez sugerir um procedimento que seja viável e mais eficaz de análise de contaminação fecal e que possa ser efetivamente utilizado como indicador de qualidade de águas e de eficiência de tratamento de esgotos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a viabilidade de emprego de colifagos como indicador viral em efluentes tratados, a partir da análise de correlação dos mesmos com enterovírus e adenovírus.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer uma relação de qualidade microbiológica entre os diferentes efluentes estudados e os processos de tratamento utilizados;
- Detectar e quantificar colifagos presentes nas amostras de efluente bruto, efluente do reator UASB e efluente do processo de lodo ativado;
- Avaliar a existência de correlação entre colifagos e bactérias coliformes;
- Correlacionar colifagos e demanda bioquímica de oxigênio, sólidos totais e turbidez, em afluente bruto e efluentes tratados por lodo ativado e reator UASB;
- Verificar a influência da temperatura e do regime pluviométrico sobre o comportamento dos colifagos;
- Detectar a presença de enterovírus por RT-PCR e adenovírus por *nested* PCR, em esgoto sanitário bruto e tratado, por processo de lodo ativado e por reator anaeróbio do tipo UASB.

4 METODOLOGIA

4.1 Procedimento e local de coleta das amostras

O estudo foi conduzido com amostras de esgoto sanitário coletadas na Estação de Tratamento de Esgotos São João Navegantes, do Departamento Municipal de Água e Esgotos (DMAE), em Porto Alegre. Foram coletadas amostras do afluente bruto a ETE, bem como de efluentes tratados provenientes de dois processos distintos:

1. Processo anaeróbico empregando reator de manta de lodos de fluxo ascendente (reator UASB) com volume de 18,3 m³, operando com um tempo de detenção hidráulico (TDH) de 12 horas. Reator este que é parte da unidade experimental do Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IPH/UFRGS), em conjunto a uma lagoa de maturação com volume de 300 m³, operando com TDH de 10 dias, conforme mostrado na figura 3.

A lagoa de estabilização, da unidade experimental, foi desativada prematuramente, devido a problemas operacionais e hidráulicos, impedindo que uma análise criteriosa dos dados do efluente fosse realizada.

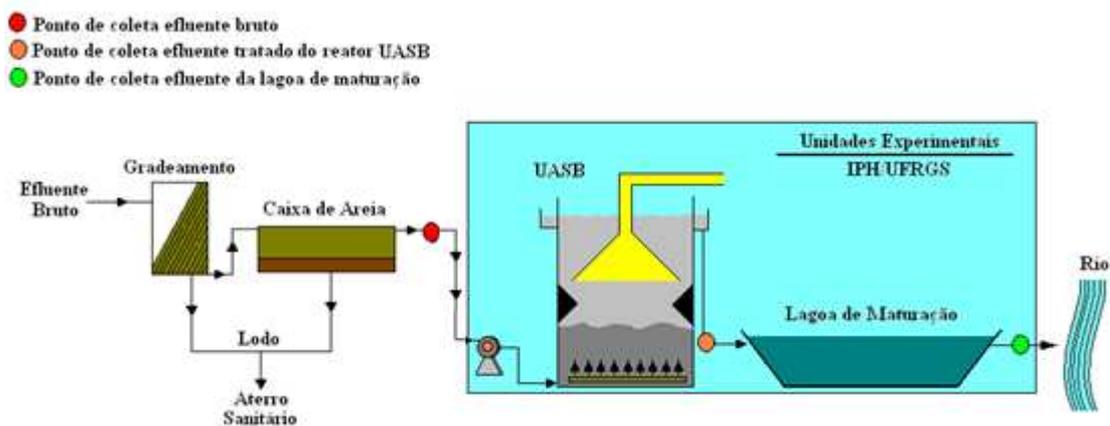


Figura 3: Fluxograma das unidades experimentais do IPH/UFRGS, instaladas na ETE São João Navegantes. Porto Alegre 2006.

2. Processo aeróbio de lodo ativado, principal tratamento da referida ETE, conforme figura 4

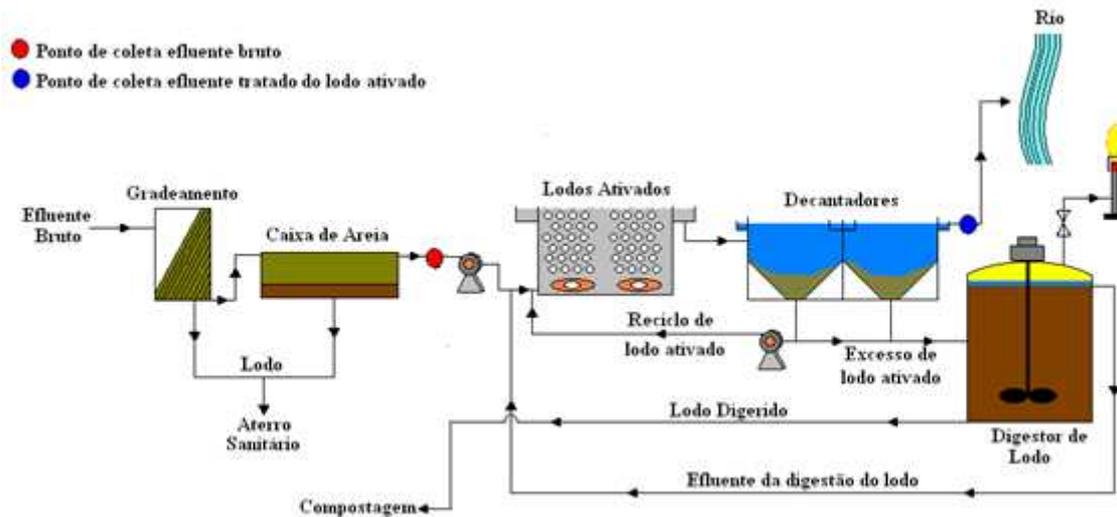


Figura 4: Fluxograma geral da ETE São João Navegantes (DMAE). Porto Alegre 2006.

As amostras foram colhidas durante o período de junho de 2006 a junho de 2007. A coleta de amostra foi realizada semanalmente, no turno da manhã. Uma alíquota de 100 mL de cada amostra foi coletada e enviada à Divisão de Pesquisa do DMAE, para realização da análise de colifagos. Para as análises físicas, químicas, e bacteriológicas, foram coletados vinte e dois litros de cada amostra e encaminhadas ao Laboratório de Saneamento do IPH/UFRGS. Também foi realizada a primeira etapa de concentração viral a partir desta amostragem, no mesmo laboratório.

A metodologia de reconcentração por ultracentrifugação foi realizada no Departamento de Bioquímica/UFRGS, em janeiro/2009, e, a identificação molecular e teste de infectividade no Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo (ICB-II/USP), em novembro e dezembro/2009.

Foram analisadas 99 amostras coletadas durante o período de estudo: 33 amostras de afluente bruto, 33 de efluente de reator UASB e 33 de efluente de lodo ativado, para determinação da quantidade de colifagos e coliformes, além da caracterização físico-química, com os testes de DBO_5 , sólidos totais e turbidez.

Para análise molecular e teste de infectividade, foram testadas 36 amostras, também coletadas durante o período descrito: 12 amostras de afluente bruto, 12 de efluente de reator UASB e 12 de efluente de lodo ativado.

4.2 Identificação e quantificação de coliformes totais e coliformes fecais na amostra

Para detecção de coliformes totais, substratos cromogênicos, como orto-nitrofenil- β -galactosídeo (ONPG) ou clorofenol β -galactosídeo (CPRG) foram utilizados para a detecção da atividade da enzima β -galactosidase, que é produzida por bactérias deste grupo. A enzima β -galactosidase hidrolisa o substrato e produz uma mudança de coloração, indicando um teste positivo de coliformes totais em 24 horas (ONPG) ou 28 horas (CPRG), sem procedimentos adicionais.

Para coliformes fecais, foi utilizado um substrato fluorogênico, como o 4-metil-umbeliferil- β -galactosídeo (MUG), para a detecção da atividade da enzima β -glicuronidase, que é produzida por *Escherichia coli*. A enzima β -glicuronidase hidrolisa o substrato e gera um produto que fluoresce quando exposto à luz ultravioleta. A presença da fluorescência indica um teste positivo para *Escherichia coli*.

A identificação e quantificação de coliformes fecais e totais foi realizada de acordo com *Standard Methods for the Examination of Wastewater* (APHA, 2005).

Para a determinação de coliformes totais e de *Escherichia coli* pelo substrato cromogênico-fluorogênico-hidrolizável, 100 mL das duas amostras mais diluídas de cada uma das amostras dos diferentes pontos de coleta foram misturados ao meio de cultura Colilert® (IDEXX), após homogeneização, toda a mistura é transferida para uma cartela Quantitray, que é selada em seladora específica. Em seguida, as cartelas são incubadas a 35°C por 24 horas. Passado o período da incubação, o número de coliformes totais é indicado pelas células da cartela Quantitray que apresentam coloração amarela.

O número de *E. coli* é determinado pelo número de células da cartela que apresentam fluorescência, quando a mesma for exposta a raios ultravioleta. Tanto na determinação da

quantidade de coliformes totais como na de *E. coli*, se faz uso de consulta subsequente à tabela específica, que determina o número mais provável destes organismos.

4.3 Identificação e quantificação de colifagos na amostra

A análise foi realizada utilizando-se o método de plaqueamento com dupla camada de meio sólido, de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Wastewater* (APHA, 2005), que descreve o procedimento mais comum e eficiente para análise e quantificação de fagos. Foi utilizada a cepa hospedeira de *Escherichia coli* 13.706.

Inicialmente, as bactérias mantidas em estoque sólido no laboratório foram inoculadas em 3 mL de meio de cultura líquido (TSB – *Tryptone Soy Broth*, Merck ou semelhante) e incubadas a 37°C por 18-24 horas para reativação das mesmas. Essas bactérias são o pré-inóculo, o qual foi preparado um dia antes de ser realizado o procedimento para quantificação dos colifagos.

No dia da análise, foram utilizados 1,5 mL do pré-inóculo para inocular 30 mL de meio de cultura líquido em um frasco Erlenmeyer de 125 mL, o qual foi incubado por 4 horas 37°C com agitação. Para cada amostra, foram feitas três avaliações: amostra não diluída e diluída 10 e 100 vezes, preparadas de forma seriada (diluições 10^{-1} e 10^{-2}). Cada avaliação foi feita em duplicata. Para cada avaliação, foram misturados 1 mL de amostra e 0,1 mL das bactérias crescidas por 4 horas. A essa mistura, acrescentou-se 3 mL de meio de cultura semi-sólido (TSA – *Tryptic Soy Agar* - 0,7% ou semelhante), mantido a 45°C, e imediatamente verteu-se sobre uma placa de Petri previamente preparada com 25 mL de meio de cultura sólido. Após solidificação do meio semi-sólido, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por aproximadamente 16 horas.

Contaram-se as placas de lise formadas, reportando-se os resultados como Unidades Formadoras de Placas (UFP/100 mL). Além das placas para cada amostra, em duplicata, também foram preparadas mais duas placas: uma de controle positivo e uma de controle negativo. O controle positivo foi realizado a partir de uma diluição (30-80 UFP/mL) de suspensão estoque de colifagos (por exemplo, ϕ X174 ou λ) misturado à mesma quantidade de bactérias (0,1 mL), e o controle negativo foi preparado apenas utilizando-se as bactérias.

4.4 Determinação da presença e da infectividade de enterovírus e adenovírus

A concentração dos vírus entéricos em águas é baseada na propriedade deles serem adsorvidos por membranas especiais de filtração à base de celulose, carregadas eletricamente.

Para a filtração, as membranas de pré-filtragem e filtragem foram umedecidas com água destilada esterilizada, para ativação da sua carga. Schwartzbrod (1995) recomenda que se utilize de 1 a 20 L de esgoto tratado para concentração viral. Mehnert e Stewien (1993) utilizaram oito litros de água de esgoto bruto e de córregos da cidade de São Paulo para identificação de rotavírus nas amostras de água de esgoto. A partir das publicações realizadas pelos referidos autores, foi escolhido o volume de filtração para concentração viral de 8 L para esgoto bruto e 20 L para efluentes tratados.

Antes de transferir a amostra ao aparelho de filtração, se ajustou o pH da amostra de afluente bruto e dos efluentes tratados, para 6,5-7,0, com HCl ou NaOH. O processo da filtração iniciou-se a partir da ligação da bomba de vácuo, permitindo a passagem das amostras de esgoto bruto e efluentes tratados, pelo pré-filtro de microfibras de vidro AP20 (Millipore®) para retenção de partículas maiores de 8 µm. As partículas virais foram removidas por adsorção eletrocinética, passando pela membrana celulósica eletropositiva Zeta Plus 60S.

Depois de filtrado todo o volume da amostra, foi colocada no aparato de filtração cerca de 100 mL de uma solução de extrato de carne 3%, pH 7,0, com 0,05M de glicina, previamente autoclavado a 120 °C, por 15 minutos e sob pressão de 1 atm, deixando-se agir por, aproximadamente, 4 minutos, para eluição das partículas virais retidas na membrana. Este procedimento de eluição foi repetido pelo menos duas vezes, a fim de se garantir completa transferência das partículas virais adsorvidas na membrana para a solução de extrato de carne. As amostras eluídas foram coletadas, identificadas e armazenadas em freezer comum até o processamento para a reconcentração.

As amostras permaneceram no freezer cerca de dois anos até serem submetidas à etapa de reconcentração. Durante este tempo, ocorreram diversas quedas de energia no IPH, o que possivelmente comprometeu as amostras para análises posteriores.

Na etapa de reconcentração, realizada em janeiro/2009, foi verificada a contaminação de todas as amostras, devido ao cheiro forte e desagradável, além do aspecto leitoso que apresentavam. Mesmo assim, a reconcentração das mesmas foi realizada por ultracentrifugação a 133.000 x g por 130 minutos a 4°C, em ultracentrífuga Sorvall UltraPro 80 em rotor P28S. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em uma solução salina tamponada, PBS, cujo volume foi calculado para cada amostra, de acordo com sua concentração esperada de partículas virais, além do volume da amostra que foi filtrada:

Esgoto Bruto: Concentração de 8.000 vezes (Mehnert et al., 1997):

$$\text{Ex.: } 15.000 / 8.000 = 1,875 \text{ mL} = 1.875 \text{ } \mu\text{L}$$

Para volume de 15 litros de amostra (esgoto bruto) passada pelo vaso de pressão:

Esgoto Tratado: Concentração de 50.000 vezes (Garrafa, 2009):

$$\text{Ex.: } 60.000 / 50.000 = 1,2 \text{ mL} = 1.200 \text{ } \mu\text{L}$$

Para volume de 60 litros de amostra (esgoto tratado) passada pelo vaso de pressão:

Depois da reconcentração, as etapas de purificação, cultivo celular e detecção molecular das 36 amostras foram realizadas no Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Primeiramente, se realizou uma etapa de purificação com Vertrel® (DuPont™). Adicionou-se 500 μL deste em cada amostra e realizou-se a mistura, primeiramente em vórtex, por cinco minutos, e, posteriormente, centrifugou-se a 13.000 rpm por 15 minutos, em centrífuga comum não refrigerada, Eppendorf Centrifuge 5415C. O procedimento de purificação foi repetido pelo menos uma vez, ou até a obtenção de uma fina interface.

As amostras purificadas foram submetidas a um teste sugestivo de culturas de células, já que a realização de um teste conclusivo foi dificultada devido à alta contagem bacteriana. O mesmo foi realizado a fim de amplificar as seqüências de ácido nucléico viral alvo, pela replicação viral, antes da detecção por PCR, e eliminar as substâncias tóxicas das amostras.

Primeiramente, as amostras foram tratadas com Fungizona® 2% e antibiótico (penicilina e estreptomicina) 10%, por uma hora em temperatura ambiente. O teste de cultura celular consistiu de três passagens em placas. Cada etapa foi realizada com a mesma

metodologia descrita. Células de linhagem de carcinoma de laringe humana (HEp-2), foram cultivadas em placas de 24 concavidades com meio Eagle-MEM contendo 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e Fungizona® (2,5 µg/ml). As culturas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C durante 48 horas, para a formação da camada celular.

O meio de cultura inicial foi retirado e uma alíquota de 100 µL de cada amostra foi colocada nas placas de cultura celular, previamente preparadas. A mesma foi incubada em câmara de CO₂ por uma hora, para efetivar o contato das partículas virais presentes na amostra com as células suscetíveis a infecção. Decorrido o tempo, foi vertido 900 µL do meio de cultura Eagle-MEM, completando a capacidade das concavidades. A placa foi incubada novamente em CO₂ a 37 °C, cerca de 12 horas. Cada etapa ocorreu durante 5 dias, sem troca do meio.

Como controle positivo fez-se a inoculação de 50 µl de HAdV-5 e como controle negativo manteve-se concavidades apenas com meio de cultura. O monitoramento do efeito citopático (ECP) foi feito com leituras realizadas a cada dia do teste. Os volumes dos testes para cada amostra foram coletados, congelados a -70°C e descongelados três vezes para passagem subseqüentes ou para a extração do DNA ou RNA viral. No final da segunda passagem, foi retirada uma alíquota de 500 µL para o teste molecular, e o restante da amostra, foi destinado à terceira passagem em cultura.

A extração do RNA e do DNA dos eluatos foi realizada em capela de fluxo laminar, com Trizol® (Invitrogen). Foram pipetados 300 µL de amostra e aos mesmos foram acrescentados 900 µL de Trizol®. Se homogeneizou cada tubo e a mistura foi deixada à temperatura ambiente por 5 minutos. Se adicionou 240µL de clorofórmio (Merck) e se agitou vigorosamente por 15 segundos. Os tubos foram mantidos novamente à temperatura ambiente por 3 minutos e, decorrido este tempo, os mesmos foram levados a centrífuga, Eppendorf 5402, por 15 minutos a 12.000 rpm a 4°C. A parte superior, sobrenadante, sem a interface, resultante foi o RNA extraído e, a parte inferior, o DNA extraído. Separaram-se ambas as alíquotas para realização das metodologias separadamente.

A continuação da extração do RNA se deu com a adição de 600 µL de álcool isopropílico absoluto, deixando-se a temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugou-se a

12.000 rpm por 15 minutos, a 4°C e, retirou-se o sobrenadante. Após, lavou-se o sedimento com 900 µL de etanol 75% e centrifugou a 9.500 rpm por 15 minutos a 4°C. Secou-se o sedimento e o ressuspendeu em 15 µL de água DEPC. Incubou-se por 10 minutos a 55-60°C.

A extração de DNA foi prosseguida adicionando-se 300 µL de etanol absoluto e deixando-se 3 minutos em temperatura ambiente. Centrifugou-se novamente os tubos a 6.000 rpm por 15 minutos e 4°C. O sobrenadante formado foi desprezado. Lavou-se o sedimento com 500 µL de 0,1M de citrato de sódio e os tubos foram deixados 30 minutos em temperatura ambiente. A etapa de centrifugação-lavagem foi repetida até que a amostra não apresentasse fenol. Após a lavagem, o sedimento foi ressuspendido em 1,5 mL de etanol a 75% e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 5.500 rpm por 5 minutos a 4°C. O sedimento foi dissolvido em 50 µL de 8mM de NaOH.

Os reagentes e suas quantidades para a preparação do reagente para a síntese do cDNA estão descritas na Tabela 1. Os reagentes para realização do PCR, a partir do cDNA estão descritos na Tabela 2.

Tabela 1: Reagentes e suas respectivas quantidades necessárias para a síntese do cDNA do RNA viral

Quantidade	Reagente
6,0 µL	PCR Buffer (Tris HCl 250 mM pH 8.3, MgCl ₂ 15 mM, KCl 375mM; Invitrogen™)
3,1 µL	Água DEPC
2,5 U	Transcriptase Reversa (Invitrogen™)
10,0 mM	dNTP (Invitrogen™)
50,0 pmoles	Entero 1
50,0 pmoles	Entero 1A
15,0 µL	RNA extraído
0,1 M	DTT (Invitrogen™)
20,0 U	RNAse <i>out</i> (Invitrogen™)

Como controle positivo da reação foram utilizados 5 µL de RNA extraído do protótipo padrão Echovírus 30 e, como controle negativo 5 µL de água ultrapura MilliQ® (Millipore™). A reação de transcrição foi realizada a 37°C/90 min., seguido de 95°C/5 min. em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf®).

Tabela 2: Reagentes e suas respectivas quantidades necessárias para a preparação do reagente para a realização do PCR, a partir do cDNA

Quantidade	Reagente
36 µL	Água DEPC
5,0 µL	PCR Buffer (Tris HCl 7mM, MgCl ₂ 2mM, KCl 50mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 20mM; Biotools®)
10 mM	dNTP (Invitrogen™)
50 pmoles	Entero 1
50 pmoles	Entero 1 A
2,0 µL	DMSO 4%
1,5 U	TTH (Biotools®)
5,0 µL	cDNA Template
1,0 µL	Triton 5%

Para a detecção dos de enterovírus por RT-PCR foram utilizados os *primers* modificados para pan-enterovírus, originalmente designados por DeLeon et al. (1990) *apud* Noble & Fuhrman (2001): o *primer* Entero 1 e Entero 1 A (Tabela 3). Estes *primers* podem amplificar pelo menos 25 tipos enterovirais (Noble & Fuhrman, 2001).

Tabela 3: *Primers* utilizados para RT-PCR e a respectiva localização no genoma viral.

Primer	Seqüência (5'-3')	Grupo de vírus	Posição
Entero 1A	ACCGGATGGCCAATCCAA	Enterovírus	621-638
Entero 1	CCTCCGGCCCCTGAATG	Enterovírus	444-460

A reação de amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf®). A desnaturação ocorreu a 95°C/4 min., seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C/1,5 min., anelamento a 50°C/1,5min., extensão 72°C/ 1,5 min., e extensão final 72°C/ 5 min.

Nas reações de amplificação gênica foi utilizada água ultrapura (Milli-Q®) tratada com DEPC a 0,01% como controle negativo e cDNA de genoma do vírus padrão Echovírus 30 como controle positivo.

Os resultados foram analisados em gel de agarose 1,2% em tampão TAE, em cuba de eletroforese horizontal, submetidos a uma eletroforese a uma voltagem de 100 volts e corados com solução brometo de etídeo (0,5 µg/mL). A presença de produtos de amplificação foi evidenciada após exposição à luz UV.

Os reagentes e suas quantidades para a preparação do reagente para a realização do PCR e do *nested* PCR estão descritos nas tabelas 4 e 5, respectivamente. Para o PCR, utilizou-se *primers* que identificam a região conservada que codifica o *hexon*, comum para todas as espécies do gênero Mastadenovírus, descrito por Allard et al. (1992).

Tabela 4: Reagentes e suas quantidades utilizadas na primeira reação de PCR, para detecção de adenovírus.

Quantidade	Reagente
34 µL	Água DEPC
5,0 µL	PCR Buffer (Tris HCl 7 mM, MgCl ₂ 2 mM, KCl 50mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM)
10mM	dNTP (Invitrogen™)
60 pmoles	<i>Primer hexAA1885</i>
60 pmoles	<i>Primer hexAA1913</i>
1,5 U	TTH (Biotools®)
7,0 µL	DNA
10 mM	dNTP (Invitrogen™)

Como controle positivo da reação foram utilizados 5 µL de DNA extraído do protótipo padrão HadV-5 e, como controle negativo, 5 µL de água ultrapura (MilliQ®).

A reação de amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf®) nas seguintes condições: desnaturação das fitas de DNA a 94°C/1min., seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C/1min., anelamento a 57,2°C/1min, extensão a 72°C/45 seg e, extensão final a 72°C por 5 min.

Tabela 5: Reagentes e suas quantidades utilizadas na segunda reação de PCR (*nested*), para detecção de adenovírus.

Quantidade	Reagente
34 µL	Água DEPC
5,0 µL	PCR Buffer (Tris HCl 7 mM, MgCl ₂ 2 mM, KCl 50 mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM)
1,0 µL	dNTP
50 pmoles	Primer nehexAA1893
50 pmoles	Primer nehexAA1905
10mM	dNTP (Invitrogen™)
1,5 U	TTH (Biotools®)
7,0 µL	DNA
10 mM	dNTP (Invitrogen™)

A primeira amplificação foi realizada utilizando-se o par de iniciadores hexAA1885 e hexAA1913 (Tabela 6). O *nested* PCR foi realizado utilizando-se o par de *primers* nehexAA1893 e nehexAA1905 (Tabela 6).

Tabela 6: *Primers* utilizados na reação de PCR e nested PCR para detecção de adenovírus.

Primer	Seqüência (5'-3')	Grupo de vírus	Posição
hexAA1885	GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-	Mastadenovírus	18858-18883
hexAA1913	CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT	Mastadenovírus	19136-19158
nehexAA1893	CCACCGAGACGTA CTT CAGCCTG	Mastadenovírus	18937-18960
nehexAA1905	TGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC	Mastadenovírus	19051-19079

A reação foi realizada em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf®). Em todas as reações foi utilizado como controle positivo DNA de HAdV-5 e, como controle negativo, água ultrapura (MilliQ®). Os resultados foram analisados em gel de agarose 1,2% em tampão TAE, em cuba de eletroforese horizontal, submetidos a uma eletroforese a uma voltagem de 100 volts e corados com solução brometo de etídeo (0,5 µg/mL). A presença de produtos de amplificação foi evidenciada após exposição à luz UV.

4.5 Análises físicas e químicas

Dentre as análises físicas e químicas realizadas a fim de se caracterizar o efluente bruto e tratado, foi dada maior ênfase à matéria orgânica, medida na forma de demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅), sólidos totais e turbidez. Esses parâmetros foram utilizados por haver indícios da influência destes no comportamento de microrganismos indicadores de poluição fecal presentes em esgotos sanitários.

As análises de demanda bioquímica de oxigênio, turbidez e sólidos suspensos foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Wastewater* (APHA, 2005).

4.5.1 Demanda Bioquímica de Oxigênio

A determinação da DBO₅ foi realizada com o sistema Oxitop® (Merck), o qual se baseia no consumo de oxigênio dissolvido na fase líquida, durante a respiração aeróbica, com conseqüente reposição pelo oxigênio molecular presente na fase gasosa. Dessa forma, a pressão parcial do oxigênio no *headspace* (espaço livre entre a tampa e o nível do líquido num frasco) tende a diminuir devido à reposição do oxigênio consumido pela atividade microbiana.

Os equipamentos do sistema Oxitop® absorvem o gás carbônico, produzido durante a degradação aeróbica, através de pastilhas de NaOH colocadas em uma cestinha suspensa, através da qual os gases são obrigados a passar antes de atingirem o transdutor de pressão. Esse quantifica corretamente a queda de pressão devida ao consumo de oxigênio (Aquino et al., 2007).

Uma alíquota da amostra foi colocada em uma garrafa de vidro âmbar com capacidade de 500 mL, juntamente com um agitador magnético. A quantidade da amostra a ser colocada depende da faixa esperada de DBO₅ (APHA, 2005). Se possuir uma alta DBO₅, é colocada pouca quantidade de amostra e uma baixa DBO₅, maior quantidade de amostra. Antes do fechamento com os dispositivos Oxitop®, é colocada um recipiente de borracha com pastilhas de NaOH. Depois de fechado, o vidro é acondicionado durante cinco dias, em uma estufa, à

temperatura de 20°C. O resultado, depois de transcorrido o tempo necessário e consulta à tabela específica, foi dado em mg O₂/L.

4.5.2 Turbidez

A turbidez foi analisada através do método nefelométrico. Esse método é baseado na intensidade da luz que é dispersa pela amostra comparada à intensidade dispersa por uma referência padrão, ambas sob as mesmas condições. A alta intensidade da luz dispersada indica alta turbidez. Essa análise foi realizada através de um turbidímetro. Os resultados foram expressos em unidades nefelométricas de turbidez (NTU).

4.5.3 Sólidos Totais

Para a análise dos sólidos totais, primeiramente, se faz uma preparação prévia das cápsulas de porcelana, uma para cada amostra. A preparação da cápsula consistiu de três etapas sucessivas em forno tipo mufla, a temperatura de 530-550°C, durante 1 hora, e posterior colocação em dessecador para estabilização da temperatura. Após isso, a cápsula foi pesada em balança analítica.

Cada amostra submetida à análise foi homogeneizada. Posteriormente, foi separada uma alíquota de 100 mL de cada efluente e colocada na cápsula de porcelana, previamente preparada. As cápsulas foram enviadas a equipamentos de banho-maria, até secagem completa da água, sendo remanescentes nas cápsulas apenas os sólidos totais presentes em cada amostra.

Depois da secagem, as cápsulas foram colocadas em fornos tipo estufa, e secadas a temperatura de 103-105°C durante 1 hora. Decorrido esse tempo, as cápsulas foram retiradas do forno e armazenadas em dessecadores, para nova estabilização da temperatura e para possibilitar uma posterior leitura nas balanças analíticas.

O teor de sólidos totais presentes em cada amostra foi obtida a partir da diferença do peso da cápsula depois e antes do procedimento descrito.

4.6 Análises estatísticas para determinação da correlação entre duas variáveis

Para verificar a existência de correlação entre os resultados das análises foi aplicada a análise de correlação de Pearson, aonde a medida do grau e o sinal da correlação linear são dados pela covariância entre duas variáveis, através do programa estatístico SPSS 13.

O índice de correlação calculado varia entre -1 e 1, e os valores mais próximos a estes extremos indicam uma forte correlação. Quando os valores se distanciam dos extremos, tem-se uma correlação fraca. Essa pode ser evidenciada num diagrama de dispersão, quando não é obtido um bom ajustamento de nenhuma reta, verificando-se a maior probabilidade de acontecimentos ao acaso. Por isso, serão descartadas as hipóteses com coeficientes de regressão maiores que -0,5 e menores que 0,5, e as que não possuem significância, pelo menos, ao nível de 5%.

Uma correlação positiva ocorre quando a reta de regressão, obtida a partir do diagrama de dispersão, tem declive positivo. Isso significa um crescimento das duas variáveis em proporção linear. A correlação é positiva quando R varia de 0 a 1. Uma correlação negativa ocorre quando a reta tem declive negativo, significando o crescimento de uma variável em detrimento do decaimento da outra. Neste caso, o coeficiente de correlação varia de -1 a 0.

Foram traçadas linhas de tendência para verificação do comportamento dos microrganismos no afluyente bruto e nos dois bioprocessos, entre si e em relação à sazonalidade. Essas linhas demonstraram o comportamento de cada variável em relação às outras, quando foram comparadas entre si.

Para avaliar a significância da variação sazonal, as quantidades médias de cada microrganismo foram agrupadas de acordo com o período das diferentes estações climáticas, e submetidas a testes de ANOVA (5%). A análise de teste t-Student (5%) foi aplicada quando obtida diferença significativa na quantidade de microrganismos, a partir do teste de ANOVA.

Médias aritméticas foram realizadas para determinar a média de precipitação e média de temperaturas nas estações do ano, no período de junho/2006 a junho/2007.

5 RESULTADOS

5.1 Temperatura e precipitação médias

Os dados da tabela 7 indicam as médias calculadas de temperatura média e precipitação média em Porto Alegre - RS, de acordo com dados obtidos no *website* da Defesa Civil do Estado do Rio Grande do Sul e do Banco de Dados do CPTEC/INPE, durante o período de estudo. Foram obtidas as maiores médias de precipitação no verão e outono, com 159,1 e 136,8 mm, respectivamente. A maior média de temperatura, de 23,1°C, foi obtida no verão, e a menor média, de 14,4°C, no inverno.

Tabela 7: Dados referentes à temperatura média (°C) e a precipitação média (mm) da respectiva estação em Porto Alegre – RS, no período de junho/2006 e junho/2007, com base nos dados da Defesa Civil do RS e do Banco de Dados do CPTEC/INPE.

	Temperatura média (°C)	Precipitação média (mm)
<i>Inverno</i>	14,4	80,5
<i>Primavera</i>	19,4	102
<i>Verão</i>	23,1	159,1
<i>Outono</i>	17,4	136,8

5.2 Qualidade do afluente e dos efluentes analisados

Os resultados aqui apresentados, referente à análise de colifagos, coliformes e dados físicos e químicos, contemplam um total de 99 amostras.

Do afluente bruto coletado na Estação de Tratamento de Esgotos, observou-se uma obtenção de valores elevados na quantidade de matéria orgânica, turbidez e sólidos totais, tendo uma remoção significativa ao decorrer de cada tratamento analisado. As médias correspondentes podem ser visualizadas na tabela 8. As médias encontradas, referentes à DBO₅ em esgoto bruto foi de 289,2 mg/L, 121,4 mg/L em efluente de reator UASB e, em lodo ativado, 24 mg/L.

Para sólidos totais, as médias foram de 950,5 mg/L em efluente bruto, 511,7 mg/L em efluente de reator UASB e 607,7 mg/L em efluente de lodo ativado. Em relação à turbidez, foram encontradas médias para efluente bruto de 72,7 NTU, 70,8 NTU em efluente de UASB e 7,1 NTU em efluente dos lodo ativado.

Em porcentagem, a remoção de matéria orgânica, medida na forma de DBO₅ foi cerca de 58% no reator UASB e cerca de 92% em lodo ativado; a redução de sólidos totais foi cerca de 46% em reator UASB e cerca de 36% em lodo ativado; a redução de 2,6 % de turbidez em reator UASB e 90% em lodo ativado.

Tabela 8: Médias dos valores obtidos de DBO₅ (mg O₂/L), Sólidos Totais (mg/L) e Turbidez (NTU) das amostras coletadas de afluente bruto, reator UASB e lodo ativado, coletados no período de junho/2006 à junho/2007 na ETE São João Navegantes, Porto Alegre.

	DBO₅ (mg O ₂ /L)	Sólidos Totais (mg/L)	Turbidez (NTU)
<i>Afluente bruto</i>	289,2	950,5	72,7
<i>Reator UASB</i>	121,4	511,7	70,8
<i>Lodo ativado</i>	24,0	607,7	7,1

De acordo com a Resolução CONSEMA n° 128/2006, que estabelece padrões de emissão de efluentes líquidos para fontes de emissão que lançam seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul, os padrões de emissão não poderiam ultrapassar 40 mg O₂/L para DBO₅ em vazões maiores que 10.000 m³/dia. A referida resolução não faz referência à turbidez e quantidade de sólidos totais que deve ser atendida. Comparado à resolução, nota-se que o efluente final da Estação de Tratamento atendeu ao padrão de emissão de matéria orgânica estabelecido, no período de estudo.

O efluente bruto apresentou, também, uma elevada quantidade de microrganismos, tanto coliformes como vírus. Observou-se, também, um decréscimo na quantidade de microrganismos presentes (Figura 5) ao decorrer de cada tratamento analisado. Os valores das médias encontradas em esgoto bruto foram de $4,58 \cdot 10^7$ NMP/100 mL de coliformes totais, $5,78 \cdot 10^6$ NMP/100 mL de *E. coli* e $2,13 \cdot 10^5$ UFP/100 mL de colifagos. Em efluente do reator UASB foram encontrados $1,1 \cdot 10^7$ NMP/100 mL de coliformes totais, $3,24 \cdot 10^6$ NMP/100 mL de *E. coli* e $4,57 \cdot 10^4$ UFP/100 mL de colifagos. Como efluente final, do processo de lodo

ativado se obteve o decaimento microbiano mais significativo, com $4,67 \cdot 10^5$ NMP/100 mL de coliformes totais, $8,65 \cdot 10^4$ NMP/100 mL de *E. coli* e $4,59 \cdot 10^3$ UFP/100 mL de colifagos.

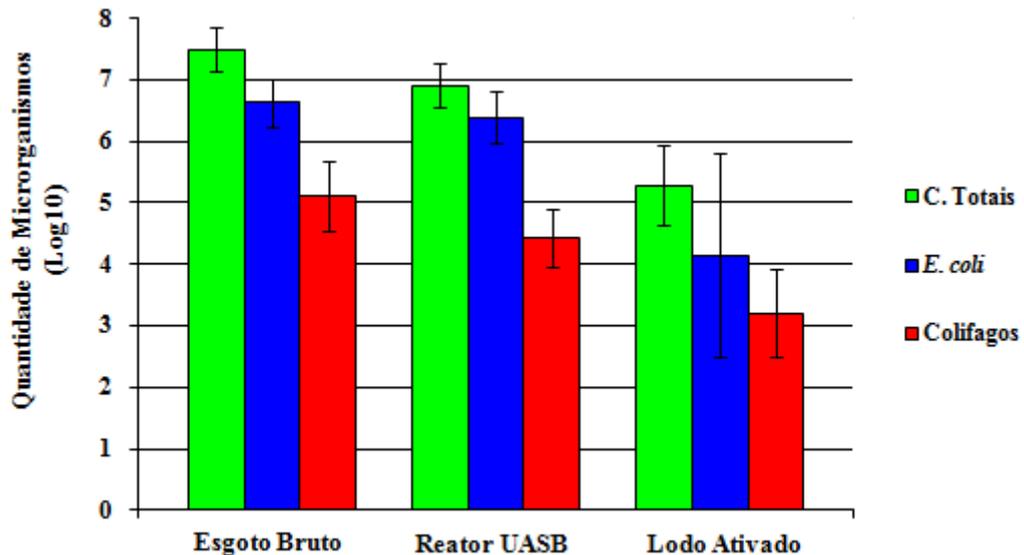


Figura 5: Comportamento de coliformes totais, *Escherichia coli* e colifagos no afluente bruto e nos dois bioprocessos: efluente do reator UASB da unidade experimental do IPH/UFRGS e efluente dos lodo ativado da ETE São João Navegantes do DMAE – Porto Alegre, de junho/2006 à junho/2007.

Em porcentagens, o processo anaeróbico apresentou uma eficiência de 75% para coliformes totais, 44% para *Escherichia coli* e 78,5% para colifagos. Já o processo aeróbico apresentou valores de eficácia de remoção de cerca de 98,9% de coliformes totais, 98,5% de coliformes fecais e 97,8% de colifagos.

Em relação à quantidade de microrganismos, a referida Resolução CONSEMA determina a liberação de até 10^3 NMP/100 mL de *Escherichia coli*. Verifica-se que o efluente final da ETE lançou no período estudado cerca de uma unidade logarítmica a mais do que o estabelecido.

5.3 Correlações e tendências dos microrganismos

Os baixos coeficientes de regressão obtidos (Tabela 9), entre -0,095 e 0,442, apontam uma independência em relação ao comportamento de coliformes e de colifagos.

Tabela 9: Análise de Correlação de Pearson entre Colifagos, *E. coli*, coliformes totais, no afluente e efluente da ETE são João Navegantes do DMAE – Porto Alegre, RS, e no efluente do reator UASB da unidade experimental do IPH/UFRGS, no período de junho de 2006 a junho de 2007. R significante a nível de 5%.

	Colifagos x <i>E. coli</i>	Colifagos x Coliformes Totais
Esgoto Bruto	0,442	0,002
Reator UASB	0,237	0,266
Lodo ativado	-0,095	0,160

Correlação de Pearson

A mesma independência pode ser visualizada nas linhas de tendência das figuras 5, 6 e 7, referente aos microrganismos presentes no afluente bruto, efluente do reator UASB e efluente do lodo ativado, respectivamente.

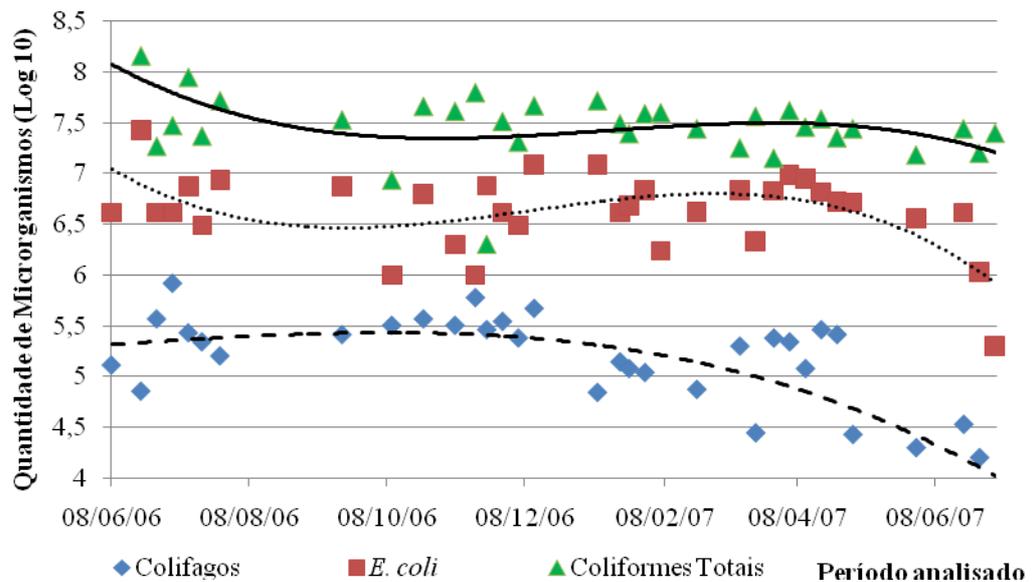


Figura 6: Linhas de Tendência do comportamento dos microrganismos analisados: colifagos, *E. coli* e coliformes totais, no afluente bruto, no período analisado.

A população de coliformes totais e *Escherichia coli* seguem uma mesma tendência na figura 6, ao contrário da população de colifagos. Este mesmo comportamento pode ser verificado na figura 7, referente ao efluente do reator UASB e na figura 8, referente ao efluente do lodo ativado.

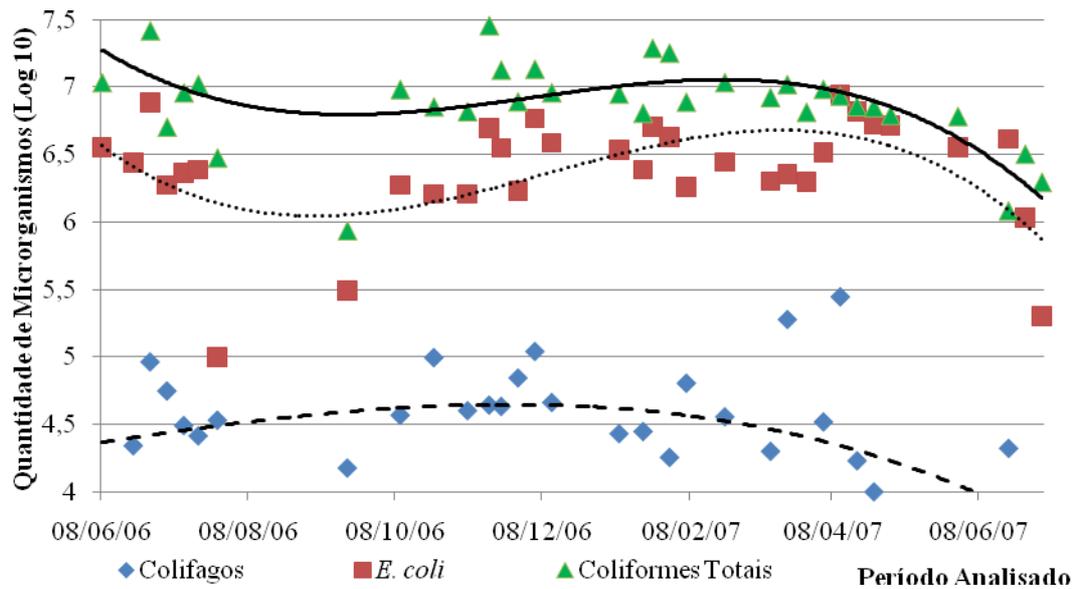


Figura 7: Linhas de Tendência do comportamento dos microrganismos analisados: colifagos, *E. coli* e coliformes totais, no efluente do reator UASB, no período de junho de 2006 à junho de 2007.

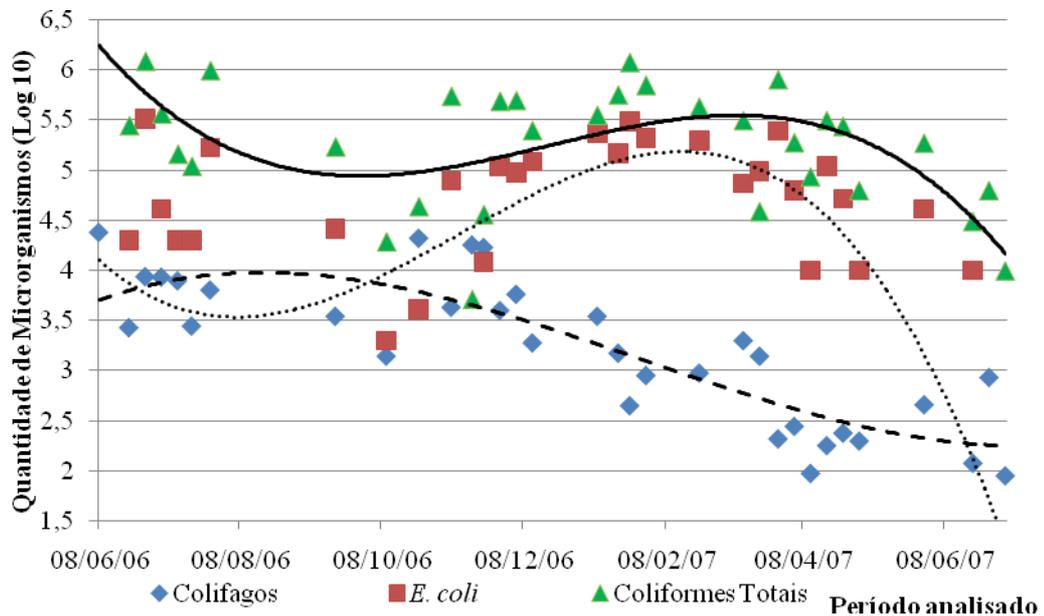


Figura 8: Linhas de Tendência do comportamento dos microrganismos analisados: colifagos, *E. coli* e coliformes totais, no efluente reator de lodo ativado, no período de junho de 2006 à junho de 2007.

Além da correlação realizada entre os organismos presentes em esgotos (coliformes e colifagos), eles foram correlacionados com os parâmetros físicos e químicos DBO₅, sólidos

totais e turbidez, a fim de ser verificada a efetiva influência desses parâmetros sobre o comportamento de microrganismos.

Os valores dos coeficientes de correlação de sólidos totais, DBO₅ e turbidez podem ser visualizados nas tabelas 10, 11 e 12, respectivamente.

Tabela 10: Análise de Correlação de Pearson entre colifagos, *E. coli*, coliformes totais e sólidos totais no afluente e efluente da ETE são João Navegantes do DMAE – Porto Alegre, RS., e no efluente do reator UASB da unidade experimental do IPH/UFRGS, no período de junho/2006 à junho/2007. R significante em nível de 5%.

	Sólidos Totais		
	Colifagos	<i>E. coli</i>	Coliformes totais
Esgoto Bruto	0,074	0,350	0,371
Reator UASB	0,458	0,101	0,005
Lodo ativado	0,155	-0,026	-0,047
	Correlação de Pearson		

A partir da análise de correlação realizada entre os microrganismos e sólidos totais, o valor dos coeficientes variou entre -0,026 e 0,458.

Tabela 11: Análise de Correlação de Pearson entre colifagos, *E. coli*, coliformes totais e DBO₅ no afluente e efluente da ETE são João Navegantes do DMAE – Porto Alegre, RS., e no efluente do reator UASB da unidade experimental do IPH/UFRGS, no período de junho/2006 à junho/2007. R significante em nível de 5%.

	DBO₅		
	Colifagos	<i>E. coli</i>	Coliformes totais
Esgoto Bruto	0,136	-0,192	-0,228
Reator UASB	0,156	-0,534	-0,125
Lodo ativado	0,442	0,044	0,085
	Correlação de Pearson		

Com a análise de correlação entre as bactérias coliformes, coliformes e DBO₅, foram obtidos valores de coeficientes entre -0,534 e 0,442.

Tabela 12: Análise de Correlação de Pearson entre colifagos, *E. coli*, coliformes totais e turbidez no afluente e efluente da ETE são João Navegantes do DMAE – Porto Alegre, RS., e no efluente do reator UASB da unidade experimental do IPH/UFRGS, no período de junho de 2006 à junho de 2007. R significativo em nível de 5%.

	Turbidez		
	Colifagos	<i>E. coli</i>	Coliformes totais
Esgoto Bruto	-0,477	-0,266	-0,046
Reator UASB	0,198	-0,029	-0,025
Lodo ativado	0,187	0,113	0,238

Correlação de Pearson

Valores de correlação entre -0,025 e 0,238 foram obtidos quando relacionados os microrganismos com turbidez.

As linhas de tendência foram analisadas também a fim de verificar a existência ou não de influência da sazonalidade sobre os microrganismos. As linhas de tendência mostram uma maior prevalência de colifagos entre inverno e primavera, e, coliformes, no verão e no outono, conforme mostram as figuras 8, referente ao comportamento em esgoto bruto, figura 9, referentes ao comportamento em efluente de UASB e figura 10, em efluente de lodo ativado.

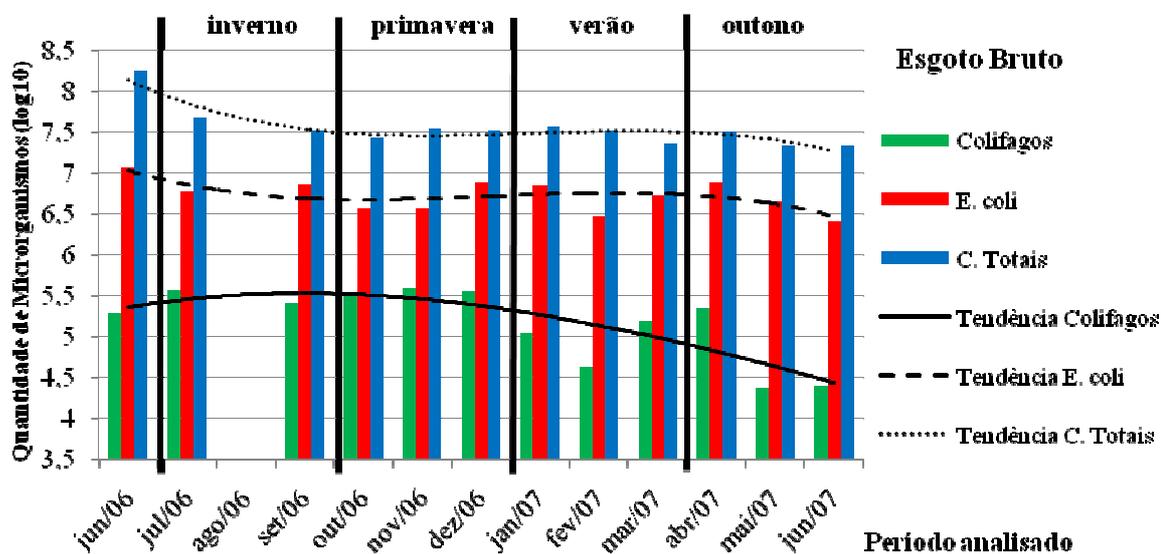


Figura 9: Linhas de tendência mostrando o comportamento dos microrganismos quando relacionados às diferentes estações do ano em esgoto bruto, no período de estudo analisado.

O afluente bruto apresentou maior média de colifagos entre o inverno e a primavera. Em contrapartida, as bactérias coliformes apresentaram maior média no verão e no outono.

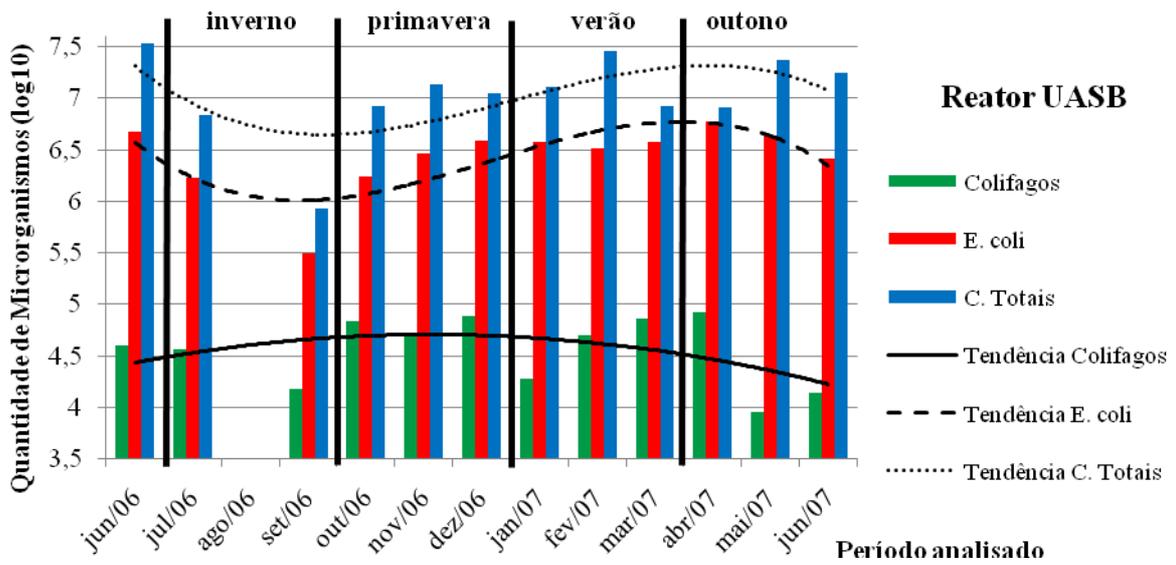


Figura 10: Efeito das estações do ano sobre os microrganismos presentes no efluente do reator UASB, no período de junho/2006 a junho/2007.

As bactérias coliformes apresentaram-se também em maior quantidade no verão e no outono. Em relação à colifagos, por sua vez, observou-se uma maior média na primavera.

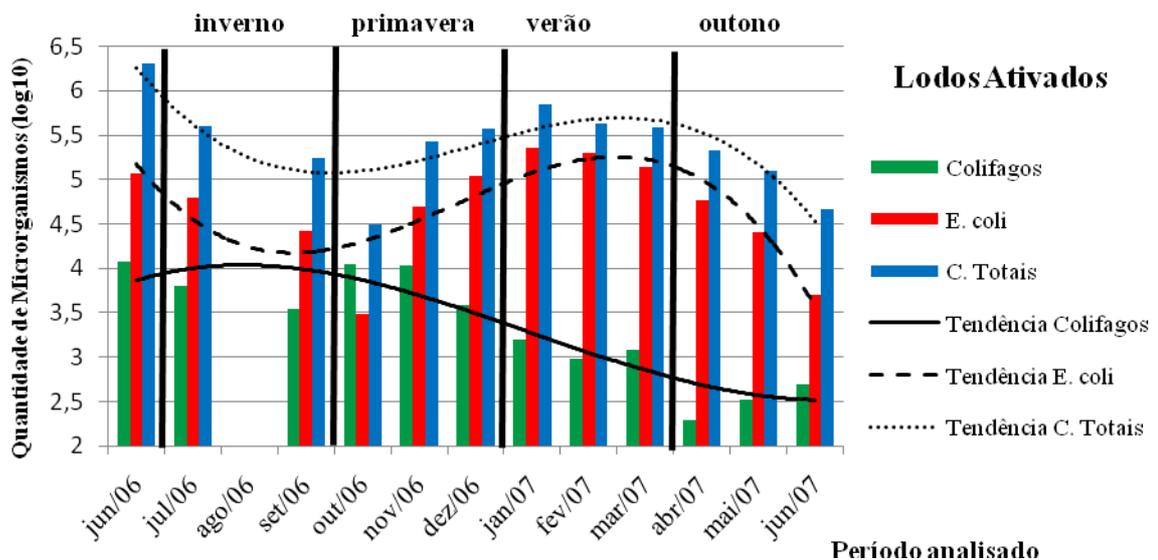


Figura 11: Microrganismos presentes no efluente de lodo ativado no período de estudo, analisados sob as diferentes estações do ano.

No efluente de lodo ativado, a tendência contrária entre colifagos e coliformes é mais acentuada, indicando a maior quantidade de fagos no inverno e primavera, e coliformes, no verão.

No entanto, a análise de variância (ANOVA) realizada a fim de se verificar verdadeira influência do fator sazonalidade sobre os microrganismos, mostrou que esta sazonalidade não foi verificada em nível de significância de 5%, exceto em relação à colifagos em lodo ativado, que mostrou diferenças significativas em suas quantidades, com uma maior prevalência nos períodos de inverno e primavera quando comparado aos períodos de verão e outono. Já que o processo de lodo ativado é o último tratamento a que o efluente é submetido, pode-se verificar que no período de inverno e primavera de foi liberada uma maior quantidade de vírus no ambiente, quando comparado ao verão e ao outono.

5.4 Detecção de enterovírus e adenovírus

Para a determinação da presença de enterovírus e adenovírus, foram analisadas 36 amostras. Tentou-se, também, a incorporação do teste de infectividade viral.

Com a análise de infectividade viral, não foi possível a obtenção de resultados conclusivos. Mesmo assim, o teste foi válido, já que, com este se tentou o aumento das partículas virais, devido a sua replicação nas células suscetíveis a infecção, além da tentativa de remoção de substâncias inibidoras das análises de *nested* PCR e RT-PCR.

Os resultados de RT-PCR e *nested* PCR das amostras podem ser visualizados na tabela 13, juntamente com as respectivas datas de coleta. Das 36 amostras analisadas, do teste de *nested* PCR foram obtidos 6 resultados positivos (16,67%) e, do teste de RT-PCR, apenas 2 resultados positivos (5,56%).

Tabela 13: Resultados dos testes realizados de *nested* PCR e RT-PCR, para análise de adenovírus e enterovírus, nas amostras de efluente de lodo ativado, efluente de reator UASB e afluente bruto, e suas respectivas datas de coleta.

Amostra	Tratamento	Data	<i>nested</i> PCR Adenovírus	RT-PCR Enterovírus
1	Lodo ativado	19/07/2006	negativo	negativo
2	UASB	19/07/2006	negativo	negativo
3	Afluente Bruto	19/07/2006	negativo	negativo
4	Lodo ativado	18/09/2006	negativo	negativo
5	UASB	18/09/2006	negativo	negativo
6	Afluente Bruto	18/09/2006	negativo	negativo
7	Lodo ativado	10/10/2006	positivo	negativo
8	UASB	10/10/2006	negativo	negativo
9	Afluente Bruto	10/10/2006	negativo	negativo
10	Lodo ativado	21/11/2006	positivo	negativo
11	Afluente Bruto	21/11/2006	negativo	negativo
12	UASB	21/11/2006	negativo	negativo
13	Lodo ativado	12/12/2006	negativo	negativo
14	UASB	12/12/2006	negativo	positivo
15	Afluente Bruto	12/12/2006	positivo	negativo
16	Lodo ativado	23/01/2007	negativo	positivo
17	UASB	23/01/2007	negativo	negativo
18	Afluente Bruto	25/01/2007	negativo	negativo
19	UASB	22/02/2007	negativo	negativo
20	Lodo ativado	22/02/2007	negativo	negativo
21	Afluente Bruto	23/02/2007	negativo	negativo
22	UASB	21/03/2007	negativo	negativo
23	Lodo ativado	21/03/2007	negativo	negativo
24	Afluente Bruto	21/03/2007	negativo	negativo
25	UASB	18/04/2007	negativo	negativo
26	Lodo ativado	18/04/2007	negativo	negativo
27	Afluente Bruto	19/04/2007	positivo	negativo
28	UASB	02/05/2007	negativo	negativo
29	Lodo ativado	02/05/2007	negativo	negativo
30	Afluente Bruto	03/05/2007	negativo	negativo
31	Afluente Bruto	27/06/2007	positivo	negativo
32	UASB	27/06/2007	negativo	negativo
33	Lodo ativado	27/06/2007	negativo	negativo
34	Afluente Bruto	04/07/2007	negativo	negativo
35	UASB	04/07/2007	positivo	negativo
36	Lodo ativado	04/07/2007	negativo	negativo

A comprovação da presença de adenovírus se deu nas amostras 7 (lodo ativado), 10 (lodo ativado), 15 (afluente bruto), 27 (afluente bruto), 31 (afluente bruto) e 35 (UASB). Em relação à presença de enterovírus, as amostras que resultaram em positivas foram apenas a 14 (UASB) e 16 (lodo ativado). A baixa detecção viral nos testes realizados não era o esperado, sugerindo-se, assim, a ocorrência de resultados falsos-negativos. Devido a isso, análises estatísticas apuradas não foram possíveis de serem realizadas.

Ressalta-se que, duas das seis amostras positivas para adenovírus são resultantes do processo de lodo ativado, bem como das duas positivas para enterovírus, uma é proveniente do mesmo efluente final da ETE.

6 DISCUSSÃO

A discussão dos resultados obtidos nesta pesquisa contemplou, primeiramente, a avaliação da relação entre colifagos, bactérias coliformes e os parâmetros físicos e químicos. Posteriormente, a discussão envolve a determinação de vírus entéricos e, por fim, a relação entre vírus entéricos e colifagos.

O comportamento de colifagos e bactérias coliformes foi inicialmente avaliado frente aos parâmetros físicos e químicos DBO₅, sólidos totais e turbidez, além de verificar se há ou não influência da sazonalidade sobre o comportamento dos mesmos.

Para tal propósito, se comparou a eficiência do processo de lodo ativado e reator UASB em relação aos valores dos referidos parâmetros e dos microrganismos.

Von Sperling (2005) indica como eficiência média de remoção de matéria orgânica valores próximos de 90%, para lodo ativado, e 75% para reatores UASB.

Conforme citado na literatura, estes valores de desempenho foram comprovados no presente trabalho. O processo de lodo ativado apresentou uma remoção média de 92% de DBO₅, comparado a 58% do reator anaeróbio. O melhor desempenho do processo aeróbio também foi verificado quando avaliado o parâmetro turbidez, com cerca de 90% de remoção, em comparação a 2,6% obtido no reator UASB. A mesma eficiência do processo de lodo ativado não foi verificada em relação a sólidos totais. No entanto, se este parâmetro for considerado em conjunto com sólidos suspensos e sólidos dissolvidos, pode-se relacionar uma grande remoção de sólidos suspensos neste processo, analisando-se concomitantemente com o parâmetro turbidez.

Em relação a microrganismos, a literatura cita eficiência de remoção de 90% de microrganismos em lodo ativado e 60% em reatores UASB (von Sperling, 2005). No presente estudo, foram obtidos valores acima de 97% referentes à remoção de microrganismos no lodo ativado e, em reator UASB, a remoção variou entre 44% (em relação a coliformes fecais) e 78% (em relação à colifagos).

Um processo de tratamento de esgotos ideal deve contemplar dois requisitos: possuir baixo custo operacional e oferecer efluente com boa qualidade higiênico-sanitária. O processo de lodo ativado se caracteriza por apresentar alta eficiência de remoção de matéria orgânica e excelente flexibilidade operacional (von Sperling, 2005). No presente estudo, apresentou efluente que atendeu ao exigido pela Resolução CONSEMA 128/2006, referente à quantidade de matéria orgânica. Contudo, essa eficiência é aliada a elevados custos operacionais. Este processo, além de produzir um excesso de lodo, que necessita de tratamento complementar (desinfecção) para sua disposição final ou reuso, também requer custos de implantação e operação, devido ao seu alto consumo energético (von Sperling, 2005). Mesmo apresentando o maior decaimento microbiano, quando comparado ao reator UASB, o efluente de lodo ativado neste trabalho ainda apresentou considerável quantidade de microrganismos (em média quatro unidades logarítmicas), não atendendo à referida Resolução quando relacionada a bactérias coliformes.

O reator UASB, por sua vez, pode ser uma alternativa interessante para o tratamento de esgoto, pois é uma tecnologia simples e de baixo custo, pois não necessita aeração, produz menos lodo e a energia é produzida em vez de ser consumida (Chernicharo, 2001). No entanto, os reatores anaeróbios dificilmente produzem efluente que atende aos padrões estabelecidos pela legislação ambiental brasileira. Destaca-se, portanto, a grande importância da utilização de um pós-tratamento dos efluentes dos reatores anaeróbios. Por isso, trabalhos têm sido desenvolvidos a fim de pesquisar alternativas para este impasse (Chernicharo, 2001). Esta etapa adicional tem a finalidade de completar a remoção da matéria orgânica, bem como propiciar a remoção dos microrganismos pouco afetados no tratamento anaeróbio, o que proporcionaria a proteção dos corpos d'água receptores dos lançamentos dos esgotos. Assim, além de poder propiciar efluentes com melhor qualidade microbiológica, a utilização de reator UASB combinado a um pós-tratamento também reduziria o valor agregado relacionado à operação, quando comparado a tratamento realizado unicamente por lodo ativado.

Na presente pesquisa, não foi verificada relação estatística significativa entre colifagos e as bactérias coliformes. Isso foi comprovado pelos baixos coeficientes de correlação obtidos, que podem ser visualizados na tabela 9. Nos resultados apresentados nas figuras 6, 7 e 8, se observa uma mesma tendência de coliformes totais e *E. coli*, ao contrário dos colifagos, que pareceu destoar da tendência bacteriana. De acordo com Tavares et al. (2005), não é esperado que haja correlação quantitativa significativa entre vírus e indicadores

bacterianos do grupo coliforme. Grabow et al. (1984) citam que as razões mais importantes dessa flutuação na relação entre coliformes e colifagos está associada as diferenças na sobrevivência e multiplicação de fagos e bactérias em diferentes ambientes aquáticos. Bactérias necessitam de condições ideais e para sua multiplicação, além de serem mais suscetíveis às condições ambientais adversas e a tratamentos (Metcalf et al., 1999; Tree et al., 2003). Já os vírus podem permanecer viáveis durante vários meses na água, embora não se multipliquem por serem parasitas intracelulares obrigatórios (Tavares et al., 2005). Ambos os microrganismos também apresentam comportamento distinto, influenciado pela sazonalidade, que será discutido a seguir. Baggi et al. (2001) e Ballester et al. (2005) não encontraram correlação aparente entre indicadores bacterianos e contaminação, seja ela medida por colifagos ou por vírus entéricos. Pusch et al. (2005) concluíram que águas de superfície, mesmo com padrão bacteriológico aceitável, são um potencial reservatório de vírus entéricos.

Este resultado enfatiza a necessidade do monitoramento em conjunto de bactérias e vírus, pois já que ambos possuem comportamento independente, a presença de um não indica necessariamente a presença do outro nos efluentes testados.

Também não foi verificada correlação significativa entre os parâmetros físicos e químicos analisados em relação à colifagos. Tal fato pode ser devido a não existência de uma correlação numérica entre as variáveis analisadas, conforme os resultados obtidos no presente trabalho. Entretanto, diversas pesquisas mencionam que a presença de sólidos, matéria orgânica e turbidez contribuem para uma maior retenção e manutenção da infectividade das partículas virais em águas e efluentes. Autores afirmam que vírus possuem capacidade de adsorção a matéria orgânica (Rusin et al., 2000) e à sólidos (Gonçalves, 2006; Martins et al., 1991; Bradford et al., 2006) e, conseqüentemente, apresentam uma maior proteção e resistência frente a processos de tratamento de água e efluentes.

O verão e o outono no Rio Grande do Sul, no período deste estudo (junho/2006 a junho/2007) apresentaram alto índice pluviométrico, enquanto que o baixo índice de chuvas foi observado no inverno e na primavera. Mesmo com a diferença significativa comprovada apenas em relação à colifagos em efluente de lodo ativado, podem-se observar os gráficos das linhas de tendência. A partir das curvas de tendência em relação às estações, apresentadas nas figuras 9, 10 e 11, se visualiza uma maior prevalência dos colifagos nos períodos de inverno e primavera, ou períodos secos, e as bactérias coliformes, no verão, ou período úmido, no

período analisado. Esta constatação está associada ao comportamento sazonal de vírus entéricos, conforme citado em outras pesquisas. Costa et al. (2003) também encontraram maior prevalência de bacteriófagos no inverno brasileiro, quando comparado ao verão, em efluentes de *wetlands*. Jiang et al. (2007) citam que, ao contrário dos indicadores bacterianos, genomas virais humanos são freqüentemente encontrados em maior quantidade em tempo seco, quando comparados a períodos chuvosos, no estado da Califórnia, EUA. Cardoso et al. (1992) e Cardoso et al. (2003) relatam uma maior estabilidade de vírus entéricos frente à climas secos, no estado de Goiás, Brasil.

Linhares (2000) cita a presença de uma sazonalidade também referente a casos de gastroenterites causadas por vírus entéricos no Brasil, bem marcante quando comparadas as regiões de clima tropical e clima subtropical. O autor relata que as regiões norte e nordeste brasileiros não apresentam uma sazonalidade tão marcante, quando comparada às regiões centro-oeste, sudeste e sul, que exibem um perfil sazonal predominante, observando-se uma maior incidência destes surtos nos períodos mais secos do ano.

A diferença na quantidade de colifagos foi comprovada apenas no efluente final da ETE, com valor significativamente maior nas estações inverno e primavera, que apresentaram o menor índice pluviométrico no período de estudo. Este fato pode ser associado com a variabilidade sazonal de lançamento de vírus entéricos no ambiente e/ou com a maior resistência de colifagos ao tratamento frente a climas com menor índice de chuvas. Tal relação coincide com o comportamento de vírus entéricos, já que estes apresentam a mesma semelhança nas mesmas condições. Além disso, tal fator também pode ser associado como uma das causas de surtos de gastroenterites causadas por vírus entéricos, já que tais surtos também têm predominância em períodos secos.

Contudo, apesar desta semelhança relacionada ao comportamento sazonal de fagos e vírus entéricos encontrada, são necessárias maiores verificações e associações a respeito de colifagos. Observações relacionadas à sua incidência, quantidade e resistência, comparadas ao comportamento de vírus entéricos são essenciais para avaliar a possibilidade da utilização destes fagos como indicadores virais.

A detecção dos vírus entéricos enterovírus e adenovírus e a verificação da sua infectividade são discutidas a seguir. Para tal, 36 amostras foram analisadas a fim de se estabelecer correlações entre colifagos e vírus entéricos.

A detecção dos vírus entéricos empregou a metodologia de filtração-eluição, reconcentração e análise molecular. As amostras coletadas foram submetidas diretamente ao processo de filtração-eluição, no Laboratório de Saneamento do IPH/UFRGS e, após esse procedimento, foram estocadas em freezer comum, até a realização das etapas posteriores. No entanto, a reconcentração foi realizada somente em janeiro/2009, no Departamento de Bioquímica/UFRGS e, até a realização das análises moleculares, no Instituto de Ciências Biomédicas/USP, em novembro e dezembro/2009, também foram armazenadas no mesmo freezer no IPH/UFRGS.

Durante o período de armazenamento, ocorreram diversas quedas de energia no Campus da Universidade. Algumas vezes o Instituto permaneceu mais de um dia sem energia elétrica. Acredita-se que tal fato comprometeu as amostras estocadas, principalmente em relação à resistência e à estabilidade viral, o que foi prejudicial para a manutenção da estrutura, e pôde ser constatado nas etapas de análise posteriores.

Antes das amostras serem submetidas à análise molecular, estas foram tratadas com Vertrel®, a fim de purificar a solução e evitar que substâncias presentes pudessem inibir a ação das enzimas transcriptase reversa e DNA polimerase. Depois desta etapa preliminar, as amostras também foram tratadas com antibióticos e fungicidas, para realização do teste de cultura celular. Mesmo com as condições em que as amostras se apresentavam, acreditou-se que este teste teria realização válida. Apesar de não ser possível uma determinação conclusiva da infectividade, devido à grande quantidade de bactérias presentes nas amostras, se diluiria a amostra pelo meio de cultura, reduzindo o efeito de compostos tóxicos em cultura de células e substâncias inibidoras, e aumentaria o número de vírus infecciosos, facilitando a detecção por *nested* PCR e RT-PCR.

Mesmo com as etapas de purificação descritas, não se obteve resultados satisfatórios na detecção viral. A análise molecular realizada nas 36 amostras indicou a efetiva presença de enterovírus em apenas duas amostras. Já com a análise de adenovírus, constatou-se, com segurança, a sua presença em seis amostras.

Autores relatam detecções satisfatórias de vírus entéricos em afluentes e efluentes tratados de ETEs. Em relação à presença de enterovírus, foram encontradas porcentagens de amostras positivas na faixa de 89% (Pusch et al., 2005) em afluente bruto e 43,7% (Gantzer et al., 1998) e 76% (Pusch et al., 2005) em efluente tratado em ETE. Adenovírus foram encontrados em porcentagens distintas. Piña et al. (1998) relataram a presença deste vírus em 93% das amostras de esgoto bruto, bem como em 65% das amostras de águas de rio, analisadas na Espanha. Garrafa (2009), com a mesma metodologia empregada nesta pesquisa, detectou em 80,8% das amostras de afluente a presença de adenovírus. Já em efluente tratado, a porcentagem encontrada foi 47,4%. Martins (2005), também baseado na técnica de filtração-eluição, encontrou adenovírus em 80% das amostras de afluente e efluente tratado por lagoas.

Os resultados apresentados na literatura descrita acima indicam a existência de adenovírus e enterovírus em amostras ambientais, principalmente em amostras de afluente sanitário bruto e amostras de efluente sanitário tratado. Assim, sabendo-se que esgotos sanitários incorporam em si uma ampla gama de microrganismos, a baixa detecção viral obtida no presente trabalho não foi atribuída à inexistência ou à reduzida concentração viral nas amostras que foram analisadas, a ponto de não serem passíveis de detecção pelos métodos empregados.

Os baixos resultados encontrados podem ser justificados, principalmente, pelos repetidos processos de congelamento e descongelamento das amostras armazenadas em freezer comum no IPH, antes e após a reconcentração por ultracentrifugação. Este processo, que sozinho já contribui para a degradação do material genético, também pode ter favorecido o crescimento de outros microrganismos, principalmente bactérias.

As partículas virais, após o processo de filtração-eluição, estavam suspensas em uma solução de extrato de carne, um meio rico em carbono orgânico, nitrogênio e vitaminas. Por isso, o aumento de temperatura associado a condições propícias para o desenvolvimento, favoreceu o crescimento bacteriano na solução. Tal fato também foi comprovado na prática por indícios sensoriais. Além de conter um cheiro forte e desagradável, as amostras apresentavam um aspecto turvo. A presença de inibidores nas reações moleculares também pode ser uma justificativa para o resultado obtido, apesar de que metodologias para a remoção dos mesmos foram realizadas.

Mesmo com as referidas condições adversas, adenovírus puderam ser detectados em seis amostras, enquanto enterovírus foram detectados em apenas duas amostras. Tang (2009) reportou em seu trabalho a maior resistência de adenovírus em relação a vírus de RNA, a condições ambientais adversas. Rusin et al. (2000) encontraram adenovírus em esgoto bruto e no lodo de esgoto primário em concentrações dez vezes maiores que enterovírus. Nwachuku et al. (2005) também constataram a maior resistência desses vírus, em relação a vírus entéricos, quando realizaram repetidos processos de congelamento e descongelamento, para posterior teste com radiação ultravioleta. É importante ressaltar a resistência inerente a estas partículas, e, embora tenham um potencial patogênico, não se pôde concluir se estas partículas estariam aptas a causar infecções em seus hospedeiros, pelos testes realizados.

Alguns vírus entéricos são muito resistentes ao congelamento, o que permite o armazenamento de amostras a -20°C , por um longo período. No entanto, repetidos processos de congelamento e descongelamento podem reduzir de 50 a 80% a quantidade de genoma viral (Formiga-Cruz et al., 2002). Oslon et al. (2004) relataram que formação de cristais de gelo no interior das células pode gerar forças de cisalhamento que interferem na estrutura de proteínas do capsídeo, além de destruir ácidos nucleicos. As forças geradas em múltiplos congelamentos e descongelamentos danificam os capsídeos virais, tornando as partículas mais suscetíveis a inativações (Nwachuku et al., 2005).

É conhecido que a temperatura é o fator determinante de maior importância para a sobrevivência de vírus no ambiente. Se a temperatura aumentar, o metabolismo de outros microrganismos, como bactérias e protozoários, acelera (Oslon et al., 2004).

Estes organismos, principalmente bactérias, presentes nas amostras com vírus, apresentam um papel importante na inativação e degradação da partícula viral. O capsídeo viral é composto de proteínas, e por isso pode ser uma fonte de nutrientes para as bactérias (Guardabassi et al., 2003). Além disso, as bactérias produzem enzimas proteolíticas (Guardabassi et al., 2003) e nucleases (Rodriguez et al., 2009). Devido ao capsídeo viral ser formado por proteínas, ele é extremamente suscetível à ação das referidas enzimas, que podem degradar a partícula viral, liberando o DNA ou o RNA no meio, danificando-a ou inativando-a, além de causar uma posterior perda de infectividade viral (Rodriguez et al., 2009).

Echavarría et al. (1998) também relataram uma degradação viral após estocagem não adequada. Le Guyader et al. (1998) determinaram que a maioria das amostras negativas, cerca de 87%, resultantes da detecção viral apresentaram contaminação bacteriana. Classen et al. (2008) concluem, em seu trabalho, que a contaminação bacteriana, em sistemas de teste de ácidos nucleicos, precisa ser reconhecida como perigo potencial em diagnóstico virológico, já que as enzimas RNAses e DNAses bacterianas podem acarretar em resultados falso-negativos ou inválidos, devido a degradação do RNA e DNA.

Ressalta-se, também, a presença de adenovírus no efluente final da Estação de Tratamento São João Navegantes. Este resultado ressalta a baixa eficiência da ETE para a remoção e/ou inativação de microrganismos, principalmente partículas virais. Esta constatação reforça a preocupação com a saúde pública, já que se sabe que estas partículas são a causa etiológica de diversas doenças de veiculação hídrica. Comparando os resultados obtidos com a análise de vírus entéricos, bactérias coliformes e colifagos, se pode destacar a importância da realização de um tratamento terciário na ETE em estudo. Este tratamento adicional removeria os microrganismos e asseguraria a qualidade microbiológica do efluente a ser lançado para o ambiente.

Se houver reuso dos esgotos sanitários tratados, é importante salientar que a desinfecção pode ser definida como a etapa responsável pela redução das densidades de microrganismos até os limites estabelecidos pela legislação, para os diferentes tipos de reusos (Gonçalves, 2003), sejam eles para abastecimento, irrigação agrícola ou balneabilidade. Assim, a qualidade do efluente a ser atingida pode depender da sua destinação final, não sendo necessária a realização da desinfecção de todo o volume de esgoto tratado. Algumas atividades que reaproveitam este efluente exigem que o mesmo seja livre ou tenha uma quantidade reduzida de microrganismos, tais como recreação primária ou irrigação. A proteção dos mananciais superficiais e subterrâneos também requer essa mesma qualidade mencionada. Outras atividades não exigem uma qualidade tão apurada do mesmo, como águas para harmonia paisagística ou outros usos menos exigentes.

Contudo, a discussão relacionando os vírus entéricos analisados e colifagos não foi possível de ser realizada. Os resultados obtidos são inconclusivos e não permitiram a determinação de uma análise mais aprofundada de adenovírus e enterovírus presentes nas amostras. Por isso, também não foi possível estabelecer a sazonalidade e relação entre

adenovírus, enterovírus e bactérias do grupo coliforme, tampouco entre adenovírus, enterovírus e os parâmetros físicos e químicos DBO₅, turbidez e sólidos totais.

Sabe-se que, mesmo após os tratamentos físicos, químicos e biológicos que ocorrem nas Estações de Tratamento de Esgotos, o efluente tratado dificilmente está isento da presença de microrganismos patogênicos, podendo acarretar em diversos problemas, principalmente de saúde pública. Os atuais indicadores microbiológicos utilizados, coliformes totais e fecais, não predizem a total desinfecção do efluente, pois, como foi observado, vírus são resistentes e persistentes aos diversos processos de tratamento de esgoto. Assim, apenas o monitoramento de coliformes fecais e totais já não indica com eficácia todos os microrganismos presentes, não assegurando a qualidade microbiológica do efluente.

A vantagem da utilização da análise de colifagos é sua praticidade e rapidez. No entanto, existem divergências na literatura a respeito da utilização do mesmo. Estudos comprovam a associação entre o fago e vírus entéricos, sugerindo que ele poderia ser um bom indicador. Outros trabalhos não encontraram relação significativa, concluindo que colifagos não indicaria com segurança a presença de vírus entéricos. Mesmo com a obtenção dos dados inconclusivos no presente trabalho, ressalta-se a importância de estudos complementares, que possam determinar se uma partícula viral é capaz de indicar a presença das demais, a fim de facilitar o monitoramento virológico em águas e efluentes.

7 CONCLUSÕES

- Não foi possível validar a viabilidade da utilização de colifagos como indicador de poluição fecal nas amostras analisadas pela não significância dos dados obtidos para enterovírus e adenovírus e, conseqüentemente, uma análise estatística mais apurada não pôde ser realizada;
- Foram detectados colifagos e bactérias coliformes em quantidade significativa em todas as amostras analisadas, inclusive no efluente final da ETE;
- Foi verificado um decréscimo na quantidade de microrganismos, ao decorrer de cada tratamento analisado. O tratamento de lodo ativado apresentou maior eficiência na remoção bacteriana e de colifagos, com decaimento de cerca de duas unidades logarítmicas para cada microrganismo analisado;
- Não foi verificada correlação significativa entre coliformes (totais e fecais) e colifagos, bem como a mesma não foi verificada entre os parâmetros físicos e químicos e colifagos, ressaltando-se a importância do monitoramento em conjunto de bactérias e vírus;
- Colifagos apresentaram sazonalidade semelhante à descrita na literatura referente a vírus entéricos, nos efluentes analisados;
- Pelos testes de RT-PCR, a presença de enterovírus foi comprovada em apenas 5,56% das amostras analisadas e, pelos testes de *nested* PCR, a presença de adenovírus foi comprovada em 16,67% das amostras. Acredita-se que a baixa detecção foi devida à degradação do genoma viral durante o processo de estocagem das amostras. Salienta-se a maior resistência de adenovírus a condições adversas de armazenamento;
- Devido à alta contaminação bacteriana presente nas amostras, não se pôde concluir se as partículas virais presentes estariam aptas a causar infecções em seus hospedeiros pelos testes de infectividade realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZADEGAN, M.; LECHEVALLIER, M.; GERBA, C. Occurrences of viruses in US groundwaters. **Journal of the American Water Works Association**, v. 95, n. 9, p. 107-120, USA, 2003.

ABBASZADEGAN, M.; HUBER, M. S.; GERBA, C. P.; PEPPER, I. L. Detection of Enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1318-1324, USA, 1993.

ALBIÑANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; CALGUA, B.; HUGUET, J. M.; COURTOIS, S.; GIRONES, R. Comparasion of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source Waters and drinking water using quantitative PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 158, p. 104-109, Spain, 2009.

ALLARD, A., ALBINSSON, B., WADELL, G. Detection of adenovirus in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, v. 37, p. 149-157, 1992.

ALWOOD, P.B.; MALIK, Y.S.; HEDBERG, C.W.; GOYAL, S.M. Survival of F-specific RNA coliphage, feline calcivirus, and *Escherichia coli* in water: a comparative study. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.9, p. 5707-5710, 2003.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of wastewater**. 20th ed. New York, USA: APHA, 2005. 1220 p.

AMARAL, L.A.; FILHO, N.A.; JUNIOR, O.D.R.; FERREIRA, F.L.A.; BARROS, L.S.S. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista de Saúde Pública**, v.37, n.4, p.510-514, Jaboticabal, SP, 2003.

AMARAL, L.A.; JUNIOR, O.D.R.; SOARES E BARROS, L.S.; LORENZON, C.S.; NUNES, A.P. Tratamento alternativo da água utilizando extrato de semente de *Moringa oleifera* e radiação solar. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.3, p.287-293, jul./set. 2006.

AQUINO, S.F.; CHERNICHARO, C.A.L.; FORESTI, E.; SANTOS, M.L.F.; MONTEGGIA, L.O. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodo ativado. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.12, n.2, p.192-201, abr./jun. 2007.

ARRAJ, A.; BOHATIER, J.; LAVERAN, H.; TRAORE, O. Comparison of bacteriophage and enteric virus removal in pilot scale activated sludge plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 516-524, France, 2005.

BAGGI, F.; DEMARTA, A.; PEDUZZI, R. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. **Research in Microbiology**, Switzerland, n. 152, n. 8, p. 743-751, 2001.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2.ed. Porto Alegre: Bookman, 2001. 622 p.

BALLESTER, N. A.; FONTAINE, J. H.; MARGOLIN, A. B. Occurrence and correlations between coliphages and anthropogenic viruses in the massachusetts Bay using enrichment and ICC-nPCR. **Journal of Water and Health**, v. 3, n. 1, p. 59-68, USA, 2005.

BOLFILL-MAS, S.; PINA, S.; GIRONES, R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 238-245, 2000.

BOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; ALLARD, A.; CALVO, M.; GIRONES, R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.12, p.7894-7896, Barcelona, Spain, dec. 2006.

BOSCH, A. Human enteric viruses in water environment: a minireview. **International Microbiology**, Spain, v.1, p.191-196, jul. 1998.

BRADFORD, S.A.; TADASSA, Y.F.; JIN, Y. Transport of coliphages in the presence and absence of manure suspension. **Journal of Environmental Quality**, v.35, p.1692-1701, Newark, DE, set./oct. 2006.

BRANCO, S.M. **Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária**. 3.ed. São Paulo: Cetesb/Acetesb, 1986. 616 p.

BRASIL, Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso 30/10/2007.

BRASIL, Ministério da Saúde, Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Disponível em <http://www.agrolab.com.br/portaria%20518_04.pdf> Acesso 15/12/2007.

BRASIL. RIO GRANDE DO SUL. Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA), Resolução nº 128 de 24 de novembro de 2006. Dispõe sobre a fixação de Padrões de Emissão de Efluentes Líquidos para fontes de emissão que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.sema.rs.gov.br/sema/jsp/consema_resolucao_lista_ano.jsp?ANO=2006> Acesso em 12/10/2007.

CARDOSO, D.D.P.; MARTINS, R.M.B.; KITAJIMA, RE.W.; BARBOSA, A.J.; CAMAROTA, S.C.T.; AZEVEDO, M.S.P. Rotavírus e adenovírus em crianças de 0-5 anos hospitalizados com ou sem gastroenterite em Goiânia-GO., Brasil. **Revista de Medicina Tropical**, v. 34, n. 5, p. 433-439, Brasil, 1992.

CARDOSO, D. D.; SOARES, C. M. A.; SOUZA, M. B. L.; AZEVEDO, M. S. P.; MARTINS, R. M. B.; QUEIRÓZ, D. A. O.; BRITO, W. M. E. D.; MUNFORD, V.; RÁCZ,

M. L. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 1, p. 25-29, Brasil, 2003.

CASTILHO, J.G.; MUNFORD, V.; RESQUE, H.R.; FAGUNDES-NETO, U.; VINJÉ, J.; RÁCZ, M.L. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo state, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.11, p.3947-3953, 2006.

CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS, Disponível em <<http://www.cptec.inpe.br/>>. Acesso em 10/7/2009.

CERQUEIRA, D.A.; GALINARI, P.C.; BRITO, L.L.A.; AMARAL, G.C.M. Detecção de coliformes fecais pela técnica da membrana filtrante (m – FC – 44,5 ± 0,2°C) e pelo sistema cromogênico (Colilert-Quanti-tray 2000). Nova Lima, MG. In. **Congresso Interamericano de Engenharia Sanitaria y Ambiental**, n.26, Lima, Peru, nov. 1998.

CHERNICHARO, C. A. L. **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios: Coletânea de trabalhos técnicos**. v. 2, Belo Horizonte, MG: FINEP, 2001. Programa de Pesquisas em Saneamento Básico (PROSAB).

CLAASSEN, M.; VAN ZYL, G. U.; PREISER, W. Extraction buffer contaminated bacterially as a cause of invalid HIV-1 viral load results on the NucliSens EasyQ® system. **Journal of Virological Methods**, v. 150, p. 80-81, South Africa, 2008.

COLE, D.; LONG, S.C.; SOBSEY, M.D. Evaluation of F⁺ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.11, p.6507-6514, North Carolina, USA, nov. 2003.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL DE SÃO PAULO (CETESB). Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>> Acesso em 12/01/2007.

COORDENADORIA ESTADUAL DE DEFESA CIVIL DO RIO GRANDE DO SUL, Disponível em: <<http://www.defesacivil.gov.br/links/index.asp>>. Acesso em 7/7/2009.

COSTA, L.L.; CEBALLOS, B.S.O; MEIRA, C.M.B.S.; CAVALCANTI, M.L.F. Eficiência de *wetlands* construídos com dez dias de detenção hidráulica na remoção de colifagos e bacteriófagos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 3, n. 1, Brasil, 2003.

DALLA VECHIA, A.; SPILKI, F. R. Torque teno vírus (TTV) e poluição fecal. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, n. 3, p. 145-154, Brasil, 2009.

DANIEL, L.A. **Desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável**. São Carlos, SP: RiMa, 2001. 149 p. Programa de Pesquisas em Saneamento Básico (PROSAB).

DURÁN, A. E.; MUNIESA, M.; MÉNDEZ, X.; VALERO, F.; LUCENA, F.; JOFRE, J. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 338-347, Spain, 2002.

ECHAVARRIA, M.; FORMAN, M.; TICEHURST, J.; DUMLER, J. S.; CARACHE, P. PCR method for detection of adenovirus in urine of healthy and human immunodeficiency virus-infected individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 11, p. 3323-3326, USA, 1998.

ENRIQUEZ, C. E.; HURST, C. J.; GERBA, C. P. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea and wastewater. **Water Research**, v. 29, n. 11, p. 2548-2553, USA, 1995

FENG, Y. Y.; ONG, S. L.; HU, J. Y.; TAN, X. L.; NG, W. J. Effects of pH and temperature on the survival of coliphages MS2 and Q β . **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 549-552, Singapore, 2003.

FORMIGA-CRUZ, M.; TOFIÑO-QUESADA, G.; BOFILL-MAS, D.; LEES, D. N.; HENSHILWOOD, K.; ALLARD, A. K.; CONDÉN-HANSSON, A. C.; HERNROTH, B. E.; VANTARAKIS, A.; TSIBOUXI, A.; PAPAPETROPOULOU, M.; FURONES, M. D.; GIRONES, R. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 5990-5998, 2002.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL HENRIQUE LUIZ ROESSLER DO RIO GRANDE DO SUL (FEPAM). Disponível em: <<http://www.fepam.rs.gov.br>> Acesso em 12/11/2007.

GANTZER, C.; MAUL, A.; AUDIC, J. M.; SCHWARTZBROD, L. Detection of infectious Enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4307-4312, France, 1998.

GARRAFA, P. **Avaliação da qualidade virológica do efluente doméstico tratado e disponibilizado para reuso na cidade de São Paulo**. 2009. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GONÇALVES, R.F. **Tecnologias de segregação e tratamento de esgotos domésticos na origem, visando à redução do consumo de água e da infra-estrutura de coleta, especialmente nas periferias urbanas**. Vitória, ES: RiMa, 2006. 352 p. Programa de Pesquisas em Saneamento Básico (PROSAB), 2006.

GRABOW, W.O.K.; COUBROUGH, P.; NUPEN, E.M.; BATEMAN, B.W. Evaluation of coliphages as indicators of the virological quality of sewage-polluted water. **Water SA**, v. 10, n. 1, p. 7-14, USA, 1984.

GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A.; SOBSEY, M. **Occurrence and survival of viruses in composted human faeces**. n. 32, Sustainable urban Renewal and Wastewater Treatment, Danish Environmental Protection Agency, Denmark, 2003.

HAVELAAR, A. H.; VAN OLPHEN, M.; DROST, Y. C. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 2956-2962, Netherlands, 1993.

HOT, D.; LEGEAY, O.; JACQUES, J.; GANTZER, C.; CAUDRELIER, Y.; GUYARD, K.; LANGE, M.; ANDRÉOLETTI, L. Detection of somatic phages, infectious Enteroviruses and enterovirus genomes as a indicators of human enteric viral pollution in surface water. **Water Research**, v. 37, p. 4703-4710, France, 2003.

INTERNATIONAL COMITEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). Disponível em <<http://www.ictvonline.org/index.asp?bhcp=1>>, Acesso em 4/05/2010.

JIANG, S.C.; CHU, W.; HE, J. Seasonal detection of human viruses and coliphage in Newport Bay, California. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.20, p.6468-6474, California, USA, oct. 2007.

JIANG, S.; NOBLE, R.; CHU, W. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of southern California. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 179-184, USA, 2001.

JORDÃO, E.P.; PESSÔA, C.A. **Tratamento de esgotos domésticos**. 3.ed. Rio de Janeiro, RJ: ABES, 1995. 720 p.

JOYCE, T.M.; McGUIGAN, K.G.; ELMORE-MEEGAN, M.; CONROY, R.M. Inactivation of fecal bacteria in drinking water by solar heating. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.2, p.399-402, Dublin, Ireland, feb. 1996.

LECHEVALLIER, M. W.; KARIM, M. R.; WEIHE, J.; ROSEN, J. S.; SOBRINHO, J. Coliphage as a potential indicator of distribution system integrity. **Journal of the American Water Works Association**, v. 98, n. 7, p. 87-96, 2006.

LECLERC, H.; EDBERG, V.P.; DELATTRE, J.M. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 5-21, France, 2000.

LE GUYADER, F.; MIOSSEC, L.; HAUGARREAU, L.; DUBOIS, E.; KOPECKA, H.; POMMEPUY, M. RT-PCR evaluation of viral contamination in five shellfish beds over a 21-month period. **Water Science and Technology**, v. 38, n. 12, p. 45-50, France, 1998.

LINHARES, A.C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. **Cadernos de Saúde Pública**, v.16, n.3, p.629-646, 2000.

LOGAN, C; O'LEARY, J.J.; O'SULLIVAN, N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.9, p. 3189-3195, 2006.

LOVE, D.; SOBSEY, M.D. Simple and rapid F⁺ coliphage culture, latex agglutination, and typing assay to detect and source track fecal contamination. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.13, p.4110-4118, North Carolina, USA, jul. 2007.

MANCUSO, P.C.S.; SANTOS, H.F. **Reuso de água**. Barueri: Manole, 2003. 550 p.

MARTINS, M.T.; PELLIZARI, V.H.; PACHECO, A.; MYAKI, D.; ADAMS, C.; BOSSOLAN, N.R.S.; MENDES, J.M.B.; HASSUDA, S. Qualidade bacteriológica de águas subterrâneas em cemitérios. **Rev. Saúde Pública**, v.25, n.1, p.47-52, São Paulo, SP, fev. 1991.

MARTINS, S.S. **Adenovírus e rotavírus como indicadores biológicos em águas residuárias em esgotos sanitários após passagem por tratamento por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. 2006. Dissertação (mestrado em Genética e Biologia Molecular).- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

MEHNERT, D.U.; QUEIROZ, A P.S.; PAULI, V.; MONEZI, T.A.; HÁRSI, C.M. Virus a new parameter for determination of water quality. In: 12th National Meeting of Virology and 4th Mercosul Meeting of Virology, 2001, Caldas Novas. **Virus Reviews & Research**, v. 6, p. 67-67, 2001.

MEHNERT, D. U.; STEWIEN, K. E.; HÁRSI, C. M.; QUEIROZ, A. P. S.; CANDEIAS, J. M. G.; CANDEIAS, J. A. N. Detection of rotavirus in sewage and creek water: efficiency of the concentration method. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 1, p. 97-100, Brasil, 1997.

MEHNERT, D. U.; STEWIEN, K. E. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 140-143, Brazil, 1993.

MELCHIOR, S.C.; CAMARGO, M.L.; CONEGLIAN, C.M.R.; BRITO, N.N.; LOPES, T.A.; MORAES, R., DRAGONI, G. PELEGRINI, R. Tratamento de efluentes por processo de lodo ativado. III Fórum De Estudos Contábeis - ISSN 1679-5865 (Área II - Meio Ambiente), 2003.

MELNICK, J.L. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer Enteroviruses. In: Fields, B.N.; Knipe, D.M., Howley, P.M.; Chanlock, R.M.; Melnick, J.L.; Monath, T.P. **Field's Virology**. 3^o ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, p. 655-712, 1996

METCALF, T. G.; MELNICK, J. L.; ESTES, M. K. Environment Virology: From detection of virus in sewage and water by isolation by molecular biology – A trip of over 50 years. **Annual Reviews of Microbiology**, n. 49, p. 461-487, USA, 1995.

MIRANDA, L.; PADILHA, R.; MONTEGGIA, L.O.; THEWES, M.R. Avaliação da qualidade sanitária de efluentes tratados por diferentes bioprocessos através da análise de correlação entre colifagos, *Escherichia coli* e coliformes totais. Porto Alegre, 2007, In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, n.24, Belo Horizonte, MG, 2007.

MOCÉ-LLIVINA, L.; LUCENA, F.; JOFRE, J. Enteroviruses and bacteriophages in bathing waters. **Applied and Environmental Microbiology**, Barcelona, v.71, n.11, p.6838-6844, nov. 2005.

MOCÉ-LLIVINA, L.; MUNIESA, M.; PIMENTA-VALE, H.; LICENA, F.; JOFRE, J. Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.3, p.1452-1456, mar. 2003.

MUNIESA, M.; JOFRE, J. Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 65-76, Netherlands, 2004.

MUSCILLO, M.; POURSHABAN, M.; IACONELLI, M.; FONTANA, S.; GRAZIA, A. D.; MANZARA, S.; FADDA, G.; SANTANGELO, R.; ROLSA, G. L. Detection and quantification of human adenovirus in surface Waters by nested PCR, TaqMan real-time PCR and cell culture assays. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 191, n. 1, Italy, 2008.

NOBLE, R.T.; FUHRMAN, J.A. Enteroviruses detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction from the coastal waters of Santa Monica Bay, California: low correlation to bacterial indicator levels. **Hydrobiologia**, Netherlands, v. 460, p. 175-184, 2001.

NWACHUKU, N.; GERBA, C. P.; OSWALD, A.; MASHADI, F. D. Comparative inactivation of adenovirus serotypes by UV light disinfection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5633-5636, USA, 2005.

OLIVEIRA, L. H. S. **Virologia Humana**. Rio de Janeiro, Ed. Cultura Médica, Cap. 21: *Adenoviridae*, p. 232-240, 1994.

ORLANDI, P.P.; MAGALHÃES, G.F.; MATOS, N.B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P.A.; SILVA, L.H. P. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.507-517, Porto Velho, RO, 2006.

OLSON, M. R.; AXLER, R. O.; HICKS, R. E. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. **Journal of Virological Methods**, n. 122, p. 147-152, USA, 2004.

PALACIOS, G.; OBERSTE, M.S. Enteroviruses as agent of emerging infectious diseases – a review. **Journal of Neurovirology**, v. 11, p. 424-433, USA, 2005.

PAYMENT, P.; FRANCO, E. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.8, p.2418-2424, Québec, Canada, aug. 1993.

PAZ-Y-MIÑO, M.; BARZOLA, C.; LAZCANO, C.; PONCE, M.; LEÓN, J. Colifagos como indicadores de contaminación fecal y de remoción bacteriana em la potabilización del agua. **Revista Peruana de Biología**, v. 10, n. 2, p. 133-144, Peru, 2003.

PESSÔA, C.A.; JORDÃO, E.P. **Tratamento de esgotos domésticos**. 2.ed. Rio de Janeiro, RJ: ABES, 1982.

PEDROSO, M.Z.; FRANÇA, J.P.; RODRIGUES, P.F.; SANTOS, A.; JÚNIOR, O.C. Uma síntese sobre colifagos como indicadores de poluição fecal. **Revista O Mundo da Saúde**, São Paulo, SP, v.27, n.4, p.559-563, out./dez. 2003.

PILLAI, S.D. Bacteriophages as fecal indicator organisms. Food Microbiology and Food Safety. In: **Viruses in Food**, Springer US, p. 205-222, 2007.

PIÑA S., PUIG, M., LUCENA F., JOFRE, J., GIRONES, R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3376-3382, 1998.

PORTELLA, C.V. **Vigilância ambiental molecular de rotavírus humanos grupo A**. 1999. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Biologia, Universidade de Barcelona, Espanha, 1999.

PUSCH, D.; OH, D.Y.; WOLF, S.; DUMKE, R.; SCHRÖTER-BOBSIN, U.; HÖHNE, M.; RÖSKE, I.; SCHREIER, E. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. **Archives of Virology**, Austria, v. 150, p. 929-947, 2005.

QUEIROZ, A.P.S. **Deteção e genotipagem de rotavírus presentes em amostras de águas de esgoto e de córrego da cidade de São Paulo, através da reação de RT-PCR**. 1999. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

QUEIROZ, A. P. S.; SANTOS, F. M.; SASSAROLI, A.; HÁRSI, C. M.; MONEZI, T. A.; MEHNERT, D. U. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4614-4618, Brasil, 2001.

QUIGNON, F.; THOMAS, F.; GANTZER, C.; HUYARD, A.; SCHWARTZBROD, L. Virus adsorption in a complex system: an experimentally designed study. **Water Research**, France, v.32, n.4, p.1222-1230, aug. 1998.

REYNOLDS, K. A. Coliphage: A better water quality indicator. **Water Conditioning e Purification**, v. 48, n. 9, EUA, set. 2006.

RODRIGUEZ, R. A.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 297-307, USA, 2009.

RUSIN, P.; ENRIQUEZ, C. E.; JOHNSON, D.; GERBA, C. P. Environmentally transmitted pathogens. In: MAIER, R. M.; PEPPER, L. L.; GERBA, C. P. **Environmental Microbiology**. Academic Press: San Diego, 2000.

SCHWARTZBROD, L. Effect of human viruses on public health associated with the use of wastewater and sludge in agriculture and aquaculture. World Health Organization, **Bull WHO/EOS/95**.19, 1995.

SECRETARIA DA SAÚDE DO RIO GRANDE DO SUL. Vigilância Epidemiológica registra surtos de rotavírus no Estado. Porto Alegre, 25 de setembro de 2006, Notícias. Disponível em: <<http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=3978>> Acesso em 01/12/07.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Informes Técnicos Institucionais. Diarréia e rotavírus. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.6, p.844-845, 2004.

SILVA, H. D.; WOSNJUK, L. A. C.; SANTOS, S. F. O.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; PEREIRA, F. C.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; GARCÍAZAPATA, M. T. A.; ANUNCIÇÃO, C. E. Molecular detection of Adenoviruses in lakes and Rivers of Goiânia, Goiás, Brazil. **Food Environmental Virology**. Brazil, 2009.

SILVEIRA, I.C.T. **Cloro e ozônio aplicados à desinfecção de efluente hospitalar tratado em contadores biológicos rotatórios, com avaliação de efeitos tóxicos em *Daphnia similis***. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SOBSEY, M.; LOVE, D.; LOVELACE, G.; STEWART, J.; ROBINSON, B. Methods to detect and genotype coliphages in water and shellfish. **Biennial Meeting of the Interstate Shellfish Sanitation Conference**, 2005. Disponível em: <<http://www.unc.edu/sobseylab/ISSCcoliphagedemo.pdf>> Acesso em 13/11/2007.

TANG, J. W. The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agent. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 6, p. 737-746, Singapore, 2009.

TAVARES, T.M.; CARDOSO, D.D.P.; BRITO, W.M.E.D. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.34, n.2, p. 85-104, maio/ago. 2005.

TOZE, S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. **Water Research**, Australia, v.33, n.17, p.3545-3556, jan.1999.

TREE, J. A.; ADAMS, M. R.; LEES, D. N. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2038-2043, England, 2003.

UHNOO, I.; WADELL, G.; SVENSSON, L.; JOHANSSON, M. E. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 365-371, Sweden, 1984.

VANTARAKIS, A.; TSIBOUXI, A.; PAPAPETROPOULOU, M.; FURONES, M. D.; GIRONES, R. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 5990-5998, Greece, 2002.

VERMA, H.; CHITAMBAR, S. D.; VARANASI, G. Identification and characterization of enteric adenoviruses in infants and children hospitalized for acute gastroenteritis. **Journal of medical Virology**, v. 81, p. 60-64, India, 2009.

VIVANTIS. Reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR). Technical Bulletin, dec 14.06. Disponível em <<http://www.vivantis.com/doc/121200793929.pdf>> Acesso em 3/05/2010.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3.ed. Belo Horizonte, MG: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - Universidade Federal de Minas Gerais, 2005. 452 p.

VON SYDOW, A.C.M.D.G.; COOGAN, J.A.; MORENO, A.M.; MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R. Ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães errantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.4, p.401-407, São Paulo, out./dez. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for drinking-water quality**. 3.ed. Geneva: WHO Recommendations, v.1., 2004. 515 p.

YOUNG, N. A. Polioviruses, coxsackieviruses, and echoviruses: comparison of the genomes by RNA hybridization. **Journal of Virology**, USA, V.11, p.832-839, 1973.