

Camila Daminelli Schissi

**AVALIAÇÃO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS  
DURANTE A MINERALIZAÇÃO DE LODO DE ESGOTO EM  
WETLAND CONSTRUÍDO OPERANDO EM ESCALA REAL**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e  
Biociências da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do Grau  
de Mestre em Biotecnologia e  
Biociências

Orientador 1: Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Elisa  
Magri

Orientador 2: Prof. Dr<sup>a</sup>. Célia Regina  
Monte Barardi

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Schissi, Camila Daminelli

Avaliação de microrganismos patogênicos durante a mineralização de lodo de esgoto em Wetland construído operando em escala real / Camila Daminelli Schissi ; orientadora, Maria Elisa Magri, orientador, Célia Barardi, 2018.

101 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Biomarcadores. 3. Fertilizantes. 4. Lodo de esgoto. 5. Wetland construído. I. Magri, Maria Elisa. II. Barardi, Célia III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

**“Avaliação de microrganismos patogênicos durante a mineralização de lodo de esgoto em wetland construído operando em escala real”**

Por

**Camila Daminelli Schissi**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (10/PPGBTC/2018) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



---

Prof.(a) Dr.(a) Mario Steindel

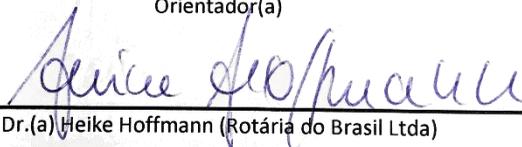
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



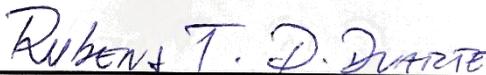
---

Dr.(a) Maria Elisa Magri (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



---

Dr.(a) Heike Hoffmann (Rotária do Brasil Ltda)



---

Dr.(a) Rubens Tadeu Delgado Duarte (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 25 de abril de 2018.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por me guiar e iluminar em todas as fases da minha vida;  
À minha família, meus pais: Telmo e Alda; ao meu irmão e minha cunhada (e irmã de coração): Mauro e Gabriela. Obrigada por ser o meu porto seguro, por sempre incentivarem a seguir meus sonhos e me apoiarem incondicionalmente nas minhas decisões;

Ao meu namorado e companheiro: Tiago, por ser o meu 5'-3', obrigada pelo apoio, incentivo, puxões de orelha, amor e carinho diário;

Às minhas queridas orientadoras, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria Elisa Magri e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Célia Regina Monte Barardi, que me acompanham desde o início da minha jornada científica, pela confiança, ensinamentos e amizade;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Gislaïne Fongaro, não somente por auxiliar e participar integralmente para que este projeto fosse realizado, mas pela amizade e vínculo construído ao longo dos anos em que foi minha orientadora durante a minha graduação;

Ao Laboratório de Virologia Aplicada, por me acolher desde 2012, mostrando o valor de se trabalhar em grupo e mostrar o amor a esse incrível e insaciável mundo da pesquisa. A todos os meus colegas do LVA, obrigada pelas conversas, confraternizações, auxílios na pesquisa, almoços no RU, vocês foram fundamentais ao longo deste período;

Ao Prof. Dr. Diogo Röbl, pela experiência incrível durante meu Estágio de Docência, troca de ideias e por estar sempre disponível e aberto para conversar independente do assunto;

À MsC. Sthefany, por todos os nossos almoços, descontrações, conversas, risadas e a melhor amizade que o Programa de Pós-Graduação me deu;

Aos meus queridos amigos que me acompanham desde a Graduação, Francisco e Marcello, obrigada pelas nossas conversas, jogos, piadas ruins e incrível amizade;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências pela oportunidade de realizar o Mestrado;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Biociências por toda a contribuição para minha formação em Mestre.

Ao GESAD, pelo suporte e auxílio nas diversas dúvidas sobre os wetlands construídos;

Aos membros da banca examinadora;

Ao CNPq pelo financiamento do projeto;

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado, contribuindo no aprimoramento, desenvolvimento e realização deste trabalho;

À Universidade Federal de Santa Catarina, por me acolher desde 2011, quando iniciei o curso de graduação em Ciências Biológicas;

A todos que de certa forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.



## RESUMO

O acesso à água tratada e tratamento dos esgotos sanitários não estão disponíveis a grande parte da população mundial, acarretando em problemas ambientais e de saúde pública. Isso se deve ao fato de os dejetos humanos possuírem uma alta concentração de microrganismos patogênicos, favorecendo dessa forma sua propagação. Todavia, a biomassa derivada dos lodos de esgoto possui potencial para ser utilizada como fertilizante na agricultura, devido à riqueza de matéria orgânica e nutrientes presentes em tais resíduos. Desta forma, a aplicação deve seguir as recomendações da legislação evitando a disseminação de patógenos. Neste estudo, foi avaliada a eficiência de dois sistemas de wetland construído para o tratamento de lodo (WCL), operando em etapa de repouso e alimentação, na remoção de biomarcadores de contaminação. O lodo era proveniente de Reator em Batelada Sequencial (RBS) e lodo de caminhão hidro vácuo (popularmente conhecido como caminhão limpa fossa) (LLF). Avaliou-se a redução de patógenos no sistema e também de bioindicadores, sendo estes últimos testados como opção de menor custo financeiro e menor complexidade metodológica. Foram então avaliados: bactérias (*Salmonella* spp. e *Escherichia coli*), bacteriófagos (colifagos somáticos e fagos RNA macho-específicos), vírus entérico (Adenovírus humano [HAdV]) e ovos de helmintos (*Ascaris lumbricoides*). O lodo acumulado não atingiu os parâmetros mínimos necessários para que fosse classificado como lodo Classe A, tendo como referência a resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente 375. Os bacteriófagos mostraram um comportamento similar aos HAdV, com reduções próximas a  $1,0\log_{10}$  no lodo, mostrando seu potencial de ser utilizados como biomarcadores virais de contaminação fecal em substituição aos vírus humanos. O líquido percolado gerado no desaguamento do lodo apresentou uma baixa concentração de sólidos, quando comparado ao lodo que lhe deu origem, com reduções de 97% de ST.

**Palavras-chave:** Biomarcadores. Fertilizantes. Lodo de esgoto. Wetland construído para lodo.

## ABSTRACT

Access to treated water and sanitary treatment is not available to all world's population, as well as adequate disposal and ineffective treatments, leading to environmental and public health problems. This is due to the fact that human waste has a high concentration of pathogenic microorganisms, favoring its propagation. However, biomass derived from sewage has the potential to be used as a fertilizer in agriculture due to the richness of organic matter and nutrients present in this waste. In this way, the application must follow the recommendations of the legislation avoiding the dissemination of pathogens. In this study, the efficiency of two sludge constructed wetland systems (SWC) in the resting and feeding stage was evaluated for the removal of biomarkers of contamination. The sludge was from Sequential Batch Reactor (SBR) and Faecal Sludge Vacuum Truck. It was evaluated the reduction of pathogens in the system and also of bioindicators, the latter being tested as an option of lower financial cost and less methodological complexity. Bacteria (*Salmonella* spp. and *Escherichia coli*), bacteriophages (somatic coliphages and male-specific RNA phages), enteric viruses (human adenovirus [HAdV]) and helminth eggs (*Ascaris lumbricoides*) were evaluated. The accumulated sludge did not reach the minimum parameters necessary to be classified as Class A sludge, with reference to the resolution 375 of the National Environmental Council. Bacteriophages obtained similar behavior to HAdV, with reductions approximate to  $1.0\log_{10}$ , confirming that they have the potential to be used as surrogates for human enteric viruses as biomarkers of fecal contamination. The leachate generated in the sludge dewatering presented a low concentration of solids when compared to the sludge that gave rise, with reductions of 97% of TS.

**Keywords:** Biomarkers. Sludge treatment wetland. Fertilizer. Sewage sludge

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática de um WCL, mostrando a zona de acúmulo de lodo e as camadas de material filtrante.....	20
<b>Figura 2.</b> Microscopia eletrônica mostrando a morfologia da <i>Salmonella</i> . .....	22
<b>Figura 3.</b> Microscopia eletrônica de transmissão mostrando O-antígeno na superfície da <i>Salmonella</i> . .....	22
<b>Figura 4. (a)</b> Microscopia eletrônica mostrando a morfologia da <i>Escherichia coli</i> e <b>(b)</b> Lesão de aderência e apagamento mostrando o apagamento da microvilosidade (mv) e o pedestal (★) com <i>Escherichia coli</i> aderente (►).....	24
<b>Figura 5.</b> Microscopia de transmissão eletrônica. A a B Família Myoviridae; C e D Família Siphoviridae; E e F Família Podoviridae. ....	25
<b>Figura 6.</b> Microscopia eletrônica de transmissão em a) vírions de Adenovírus; b) Agregação viral. ....	27
<b>Figura 7. (a)</b> Eletromicrografia de Adenovírus Humano <b>(b)</b> Corte através do centro da partícula do adenovírus mostrando a seção transversal das densidades das proteínas principais do capsídeo e proteínas menores associadas <b>(c)</b> Estrutura do adenovírus e suas principais proteínas mediadoras da internalização viral, adaptado de Nemerow et al., 2009. 28	
<b>Figura 8. (a)</b> Ovo fértil de <i>Ascaris lumbricoides</i> em microscópio (objetiva com aumento 40x), mostrando a estrutura da cápsula de proteção; <b>(b)</b> ovo fértil no estágio de mórula. 30	
<b>Figura 9.</b> Estágios da embriogênese de <i>Ascaris</i> . <b>(a)</b> , <b>(b)</b> e <b>(c)</b> estágio iniciais da divisão celular; <b>(d)</b> mórula inicial; <b>(e)</b> mórula tardia; <b>(f)</b> blástula; <b>(g)</b> gástrula; <b>(h)</b> larva L1; <b>(i)</b> larva L2. ....	30
<b>Figura 10.</b> Macrófita <i>Cyperus papyrus</i> . ....	35
<b>Figura 11.</b> Desenho experimental para a realização das coletas nos WC. ....	37
<b>Figura 12.</b> Colônias típicas de <i>Salmonella</i> (coloração preta) em ágar XLD. ....	39
<b>Figura 13.</b> Colônias típicas de <i>E. coli</i> em ágar MacConkey. ....	39
<b>Figura 14. (a)</b> Focos de colifagos somáticos em meio MSA <b>(b)</b> Focos de Fagos RNA macho-específico em meio TYGA. ....	41
<b>Figura 15. (a)</b> Células A549 (controle negativo) <b>(b)</b> Células A549 infectadas com HAdV-2, mostrando o efeito citopático (Aumento da objetiva em 400x).....	43
<b>Figura 16.</b> Focos causados pela lise das células A549 devido à infecção de HAdV infecciosos.....	45
<b>Figura 17.</b> Médias mensais de temperatura e radiação média durante o período de monitoramento do sistema.....	47
<b>Figura 18.</b> Dados da precipitação pluviométrica acumulada, temperatura máxima, mínima e média durante o período de monitoramento dos sistemas.....	48
<b>Figura 19.</b> Registro do volume mensal (●) e volume médio diário (■) de lodo descarregado por caminhões limpa-fossa no sistema WCL entre abril/16 a jun/17..	49
<b>Figura 20.</b> Quantificação de <i>Salmonella</i> spp. no lodo RBS e LLF. ....	51
<b>Figura 21.</b> Quantificação de <i>E. coli</i> no lodo RBS e LLF. ....	53
<b>Figura 22.</b> Quantificação de colifagos somáticos no lodo RBS e LLF. ....	54
<b>Figura 23.</b> Quantificação de fagos RNA macho-específico no lodo RBS e LLF. ....	56
<b>Figura 24.</b> Quantificação de HAdV no lodo RBS e LLF durante o período de monitoramento dos sistemas. ....	58

<b>Figura 25.</b> Quantificação de ovos de <i>Ascaris lumbricoides</i> no lodo RBS e LLF durante o período de monitoramento dos sistemas. ....	59
<b>Figura 26.</b> Dados da precipitação pluviométrica acumulada mensalmente durante o período de monitoramento dos sistemas. ....	61
<b>Figura 27.</b> Quantificação de <i>Salmonella</i> spp. no LP e lodo de alimentação durante o período de monitoramento do sistema. ....	63
<b>Figura 28.</b> Quantificação de <i>E. coli</i> no LP e lodo de alimentação durante o período de monitoramento do sistema. ....	64
<b>Figura 29</b> Quantificação de colifagos somáticos no LP e lodo de alimentação durante o período de monitoramento do sistema. ....	65
<b>Figura 30.</b> Quantificação de fagos RNA macho-específico no LP e lodo de alimentação durante o período de monitoramento do sistema. ....	66
<b>Figura 31.</b> Quantificação de HAdV infecciosos no LP e lodo de alimentação durante o período de monitoramento do sistema. ....	67
<b>Figura 32.</b> Quantificação de ovos de <i>Ascaris lumbricoides</i> no LP e lodo de alimentação durante o período de monitoramento do sistema. ....	69
<b>Figura 33.</b> Quantificação de <i>Salmonella</i> spp. no lodo acumulado do filtro WCL durante o período de monitoramento do sistema. ....	71
<b>Figura 34.</b> Quantificação de <i>E. coli</i> no lodo acumulado do filtro WCL durante o período de monitoramento. ....	72
<b>Figura 35.</b> Quantificação de colifagos somáticos no lodo acumulado do filtro WCL durante o período de monitoramento. ....	73
<b>Figura 36.</b> Quantificação de fagos RNA macho-específico no lodo acumulado do filtro WCL. ....	74
<b>Figura 37.</b> <i>Quantificação de HAdV no lodo acumulado do filtro WCL durante o período de monitoramento dos sistemas.</i> ....	75
<b>Figura 38.</b> Quantificação de ovos de <i>Ascaris lumbricoides</i> no lodo acumulado do filtro WCL e lodo de alimentação. ....	76
<b>Figura 39.</b> Quantificação de <i>Salmonella</i> spp. no lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e durante o período de monitoramento do sistema. ....	81
<b>Figura 40.</b> <i>Quantificação de E. coli no lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.</i> ....	83
<b>Figura 41.</b> Quantificação de colifagos somáticos. no lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo durante o período de monitoramento do sistema. ....	84
<b>Figura 42.</b> Quantificação de fagos RNA macho-específico no lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo, durante o período de monitoramento do sistema. ....	85
<b>Figura 43.</b> Quantificação de HAdV no lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo durante o monitoramento do sistema. ....	86
<b>Figura 44.</b> Comparação entre as concentrações de HAdV infecciosos e os bacteriófagos para (a) perfil superficial e (b) profundo. ....	88
<b>Figura 45.</b> Quantificação de ovos viáveis de <i>Ascaris lumbricoides</i> no lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo durante o período de monitoramento do sistema. ....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros avaliados no lodo acumulado nos WCL, lodo RBS, lodo dos tanques sépticos anaeróbios e LP. ....	37
<b>Tabela 2.</b> Caracterização físico-química dos lodos de alimentação dos sistemas WCL. ....	48
<b>Tabela 3.</b> Cálculo da taxa de aplicação anual do lodo de alimentação. ....	51
<b>Tabela 4.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de <i>Salmonella</i> spp. e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo RBS e LLF. ....	52
<b>Tabela 5.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de <i>E. coli</i> e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo RBS e LLF. ....	53
<b>Tabela 6.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de colifagos somáticos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo RBS e LLF. ....	55
<b>Tabela 7.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de fagos RNA macho-específico e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo RBS e LLF. ....	57
<b>Tabela 8.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de HAdV infecciosos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo RBS e LLF. ....	58
<b>Tabela 9.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de ovos viáveis de <i>Ascaris lumbricoides</i> e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo RBS e LLF. ....	60
<b>Tabela 10.</b> Dimensões do tanque de armazenamento do LP e média diária do volume de líquido percolado produzido. ....	61
<b>Tabela 11.</b> Caracterização físico-química do LP e o lodo de alimentação. ....	62
<b>Tabela 12.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de <i>Salmonella</i> spp. e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo RBS. ....	63
<b>Tabela 13.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de <i>E.coli</i> e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo LP. ....	64
<b>Tabela 14.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de colifagos somáticos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do LP. ....	66
<b>Tabela 15.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de fagos RNA macho-específico e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do LP. ....	67
<b>Tabela 16.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de HAdV infecciosos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do LP. ....	68
<b>Tabela 17.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de ovos de <i>Ascaris lumbricoides</i> e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do LP. ....	70
<b>Tabela 18.</b> Caracterização físico-química do lodo acumulado do filtro WCL. ....	70
<b>Tabela 19.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre os teores de ST e SV, bem como para os parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do filtro WCL 2. ....	71
<b>Tabela 20.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de <i>Salmonella</i> spp. e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado no filtro WCL. ....	72

<b>Tabela 21</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de <i>E. coli</i> e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL.	73
<b>Tabela 22.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de colifagos somáticos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL.	74
<b>Tabela 23.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de fagos RNA macho-específico e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL.	75
<b>Tabela 24.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de HAdV infecciosos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL.	76
<b>Tabela 25.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de ovos viáveis de <i>Ascaris lumbricoides</i> e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL.	77
<b>Tabela 26.</b> Caracterização físico-química do lodo acumulado do filtro WCL 1.	78
<b>Tabela 27.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre os teores de ST e STV, bem como para os parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.	80
<b>Tabela 28.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de <i>Salmonella</i> spp. e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.	82
<b>Tabela 29.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de <i>E. coli</i> e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.	83
<b>Tabela 30.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de colifagos somáticos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.	84
<b>Tabela 31.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de fagos RNA macho-específico e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.	86
<b>Tabela 32.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de HAdV infecciosos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.	87
<b>Tabela 33.</b> Correlação de <i>Pearson</i> entre as concentrações de ovos viáveis de <i>Ascaris lumbricoides</i> e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.	89
<b>Tabela 34.</b> Concentrações de microrganismos no WCL e permitidas pela Resolução nº 375 de 2006 do CONAMA.	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg - Microgramas  
APHA – American Public Health Association  
CAR – Coxsackie-Adenovirus  
CIRAM – Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina  
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DNA – Ácido desoxiribonucleico  
EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina  
ETE – Estação de tratamento de esgoto  
g - Gramas  
HAdV – Adenovírus humano  
ISO – International Organization for Standardization  
LLF – Lodo anaeróbio dos tanques sépticos  
LP – Líquido percolado  
MEM – Minimum Essential Medium Eagle  
mL - Mililitros  
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro  
MSA – Modified Sholten's Agar  
MSA – Modified Sholten's Agar Semi-Solid  
MSB – Modified Sholten's Broth  
MSRV – Rappaport-Vassiliadis Medium Semisolid Modified  
NMP – Número mais provável  
PBS – Solução fosfato-salina  
PEG - Polietilenoglicol  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PS - Estreptomicina  
RBS – Reator em batelada sequencial  
RNA – Ácido ribonucleico  
SF – Sólidos fixos  
SFB – Soro fetal bovino  
ST – Sólidos totais  
SV – Sólidos voláteis  
TSB – Tryptic Soy Broth  
TYGA - Tryptone-yeast extract-glucose agar  
TYGAss - Tryptone-yeast extract-glucose agar semi-solid  
TYGB - Tryptone-yeast extract-glucose broth  
UFC – Unidades formadoras de colônias  
UFP – Unidades formado de placa  
UNICEF – United Nations Children's Fund  
US EPA – United States Environmental Protection Agency  
WC – Wetland construído  
WCL – Wetland construído para tratamento de lodo  
WHO – World Health Organization  
WWDR – World Water Development Report  
XLD – Xylose lysine deoxycholate agar



## SUMÁRIO

<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 Acesso a água e saneamento básico .....	17
1.2 Legislação .....	18
1.3 Novas tecnologias para tratamentos de lodo .....	18
1.3.1 Wetlands construídos para tratamento de lodo .....	18
1.3.1.1 Macrófitas .....	20
1.4 Biomarcadores de qualidade sanitária no tratamento de esgoto sanitário ..	21
1.4.1 Bactérias entéricas .....	21
1.4.1.1 <i>Salmonella</i> .....	21
1.4.1.2 <i>Escherichia coli</i> .....	23
1.4.2 Bacteriófagos: colifagos somáticos e fagos RNA macho-específicos.....	24
1.4.3 Vírus entéricos .....	26
1.4.3.1 Adenovírus.....	27
1.4.4 Ovos de <i>Ascaris lumbricoides</i> .....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
2.1 Objetivo Geral .....	33
2.2 Objetivos Específicos .....	33
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
3.1 Wetland construído para lodo .....	35
3.2 Procedimentos de campo e amostragem .....	36
3.3 Parâmetros físico-químicos.....	37
3.4 Avaliação dos patógenos e indicadores modelos .....	38
3.4.1 Quantificação de <i>Salmonella</i> spp.....	38
3.4.2 Enumeração de <i>Escherichia coli</i> .....	39
3.4.3 Enumeração de Colifagos somáticos e Fagos RNA macho-específico....	40
3.4.4 Concentração das amostras para análise viral .....	41
3.4.5 Cultivo de células animais .....	42
3.4.6 Produção de estoque viral .....	42
3.4.7 Ensaio de citotoxicidade amostral.....	43
3.4.8 Enumeração de Adenovírus infecciosos .....	41
3.4.8.1 Ensaio de Placas de lise.....	41
3.4.9 Enumeração de ovos de helmintos.....	<b>45</b>
3.5 Análise estatística .....	46
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
4.1 Dados meteorológicos.....	47
4.2 Lodo de alimentação (RBS e LLF) .....	48
4.2.1 Caracterização físico-química do lodo de alimentação (RBS e LLF) .....	48
4.2.2 Taxa de aplicação superficial do lodo de alimentação .....	49
4.2.3 Caracterização microbiológica do lodo de alimentação (RBS e LLF).....	51
4.2.4 Desaguamento de lodo e remoção de patógenos no WCL em operação..	60
4.2.4.1 Eficiência do WCL em operação no desaguamento do lodo.....	60
4.2.4.2 Eficiência do WCL em operação na redução de microrganismos patogênicos .....	62

4.2.5	Caracterização do lodo acumulado do wetland em operação .....	70
4.2.5.1	Caracterização físico-química.....	70
4.2.5.2	Caracterização microbiológica .....	71
4.3	Filtro WCL 1 em etapa de repouso.....	78
4.3.1	Caracterização físico-química do lodo acumulado .....	78
4.3.2	Caracterização microbiológica do lodo acumulado no WCL 1 .....	81
4.4	Uso agrícola do lodo acumulado segundo parâmetros microbiológicos da Resolução 375 de 2006 do CONAMA .....	90
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>93</b>
	REFERÊNCIAS .....	94

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

### 1.1 Acesso a água e saneamento básico

O acesso à água de consumo e tratamento sanitário de esgotos domésticos não está disponível para grande parte da população. Segundo WHO & UNICEF, em 2014, cerca de 50% da população mundial não possuía acesso à água tratada e saneamento melhorado, situação esta que permanece praticamente a mesma no momento atual – ano de 2018. No Brasil, apenas 40% da população possui esgoto tratado e mais de 18% não possuem acesso ao abastecimento de água tratada, sendo esta situação diretamente relacionada à propagação de doenças humanas (BRASIL, 2016).

A disponibilidade de recursos hídricos vem sendo reduzida ao longo dos anos, uma vez que o aumento das descargas de águas residuais não tratadas afeta de forma significativa a qualidade da água. Assim, muitos países estão investindo em tratamentos avançados de águas residuais, a fim de manter a qualidade ambiental, fornecendo fontes alternativas para combater a escassez da água (WWDR, 2017). Todavia, uma grande proporção de águas residuais ainda é lançada no ambiente sem tratamento prévio, agravando problemas ambientais e também de saúde pública, uma vez que podem conter uma grande diversidade de patógenos entéricos (bactérias, protozoários, vírus entéricos e ovos de helmintos), propiciando a disseminação de patógenos e doenças à população. Dessa forma, as águas residuais são coletadas e submetidas à tratamentos em estações de tratamento de esgotos sanitários (ETE), promovendo a remoção de matéria orgânica, com separação em fase líquida e fase sólida (lodo).

O lodo gerado em ETE contém altas concentrações de nutrientes (fósforo e nitrogênio) e matéria orgânica, todavia, pode conter metais pesados, compostos orgânicos sintéticos, além de microorganismos patogênicos. Assim, após receber tratamento adequado para a remoção de metais pesados e outras substâncias, e promover a inativação de patógenos entéricos, poderá ser utilizado como biofertilizante na agricultura (DO THUY et al., 2007; OPEL, 2012; BAUM et al., 2013). Deste modo, a aplicação do lodo requer um monitoramento intensivo do solo, água e fauna, a fim de se identificar os impactos positivos e negativos sobre a produtividade das culturas, bem como da saúde humana (BOURIOUG et al., 2015).

## 1.2 Legislação

A *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) em 1994, classificou o lodo de esgoto em duas classes: A e B, utilizando determinadas concentrações de microrganismos selecionados como biomarcadores de desinfecção. Para que um lodo seja classificado como Classe A, são utilizadas na classe das bactérias: *Salmonella* sp. em uma concentração inferior a 3,0 Número Mais Provável (NMP) por 4 gramas (g) de ST (ST); Vírus entéricos numa concentração inferior a 1,0 Unidade Formadora de Placa (UFP) por 4 g de ST; e ovos viáveis de helmintos em uma concentração inferior a 1,0 ovo viável de helminto por 4 g de ST.

No Brasil, a Resolução nº 375, de 29 de agosto de 2006 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), regulamenta o uso de lodo de esgoto sanitário provenientes de estação de tratamento) em áreas agrícolas, devendo seguir requisitos quanto à concentração de substâncias orgânicas e inorgânicas presentes, bem como a presença de agentes patogênicos, podendo o lodo ser classificado como Classe A. Para que um lodo seja enquadrado como Classe A, a resolução destaca o limite dos seguintes agentes patogênicos/indicadores: coliformes termotolerantes ( $<10^3$  NMP/g de ST), presença de ovos viáveis de helmintos ( $<0,25$  ovo/g de ST), *Salmonella* sp. (ausência em 10 g de ST) e vírus entéricos ( $<0,25$  UFP/g de ST).

## 1.3 Novas tecnologias para tratamentos de lodo

Nos últimos 20-30 anos novas tecnologias consideradas sustentáveis vêm sendo adotadas por diversos países para o tratamento de dejetos humanos e animais. Neste sentido os *Wetlands* construídos vêm ganhando destaque. A Alemanha foi pioneira quanto ao uso desse sistema, projetando o primeiro em escala real no ano de 1977 para o tratamento de águas residuais urbanas, sendo posteriormente adotado por outros países como Áustria, Suíça, Inglaterra e Estados Unidos (MASI,2004).

### 1.3.1 Wetlands construídos para tratamento de lodo

Os sistemas *Wetlands* Construídos para tratamento de lodo (WCL) são projetados para utilizar processos naturais, que envolvem tanto a vegetação de wetlands naturais, como também do solo e microrganismos associados para o tratamento de esgotos sanitários (VYMAZAL, 2014).

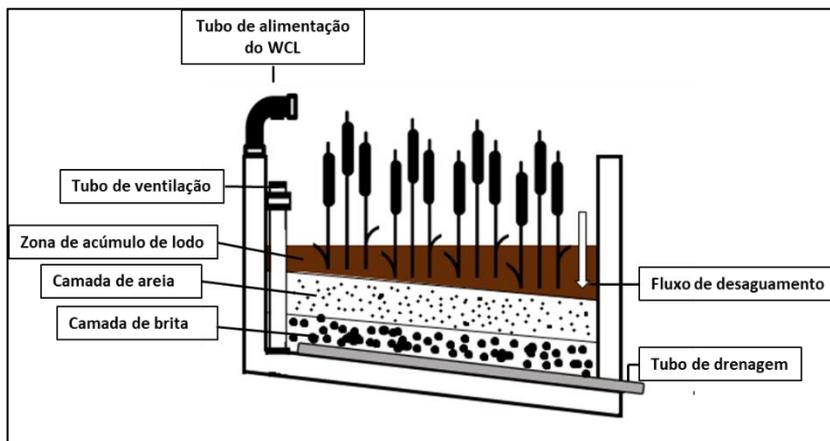
Os WC consistem em tanques rasos, com macrófitas na superfície e sucessivas camadas de material filtrante (como areia, brita e cascalho). São utilizados para o tratamento de águas residuais, bem como para o lodo de esgoto para posteriormente utilizar na agricultura como biofertilizante (NIELSEN, 2003; UGETTI et al., 2012; VYMAZAL; BřEZINOVÁ, 2015).

Em se tratando de WCL, **Figura 1**, o processo baseia-se na aplicação do lodo de esgoto sanitário na superfície, e por ação da gravidade, ocorre a separação em fase sólida (lodo acumulado) e fase líquida (líquido percolado) (KADLEC; WALLACE, 2008). O funcionamento dos WCL ocorre em duas etapas principais. A primeira, quando é realizada a deposição de lodo em batelada no sistema, respeitando um período de repouso do WCL para que ocorra o desaguamento do lodo, o qual pode durar entre dois a sete dias, dependendo da capacidade de tratamento, condições meteorológicas, idade do sistema e espessura do lodo. Esta etapa dura geralmente entre 5 e 10 anos (NIELSEN, 2003, UGETTI, 2011).

A etapa seguinte ocorre quando cessa a deposição de lodo, e o WCL é submetido à um período de repouso para que ocorra o desaguamento e estabilização do lodo, bem como os processos de mineralização (amonificação, nitrificação, desnitrificação e redução da fração orgânica volátil) e remoção de metais pesados e outras substâncias. Na superfície do sistema, o lodo forma um filme seco, onde fissuras são formadas naturalmente (reduzidas pelas plantas), permitindo desta maneira, a evaporação da água, bem como a transferência de oxigênio ao longo do leito, criando condições aeróbias em diferentes zonas de acúmulo de lodo, promovendo o crescimento de microrganismos e conseqüentemente, permitindo uma melhor mineralização do lodo (NIELSEN, 2003; NIELSEN, 2005; UGETTI, 2011). A taxa de acúmulo de lodo varia de acordo com o tipo de lodo e a operação do sistema, mas os valores típicos encontram-se na faixa entre 0,20-0,40 m<sup>3</sup>/ano (UGETTI et al., 2009).

Já existem muitos dados em literatura acerca do monitoramento de sistemas durante a primeira fase, no entanto, pouco se sabe sobre os processos que ocorrem na segunda, e qual deve ser o período de repouso antes que o lodo possa ser removido do sistema. Além disso, existem poucos estudos quanto aos potenciais de redução de patógenos entéricos nos WCL, sendo possivelmente necessária a utilização de um pós-tratamento para que este lodo possa ser aproveitado como biofertilizante ou condicionador de solos.

**Figura 1.** Representação esquemática de um WCL, mostrando a zona de acúmulo de lodo e as camadas de material filtrante.



Fonte: A autora.

### 1.3.1.1 Macrófitas

As plantas são fundamentais para que ocorra o tratamento de lodo nos WC, uma vez que auxiliam no desagüamento via evapotranspiração e nos processos de mineralização. Estudos mostram a eficiência de remoção de contaminantes em filtros plantados quando comparados aos filtros com ausência das plantas na superfície (EDWARDS et al., 2001).

As macrófitas utilizadas nos WC são adaptadas a regiões alagadas, devendo tolerar oscilações no nível da água, salinidade e variações do pH. Assim, poderão contribuir nos processos de mineralização do lodo, transportando oxigênio da superfície para as camadas mais profundas, criando microsistemas aeróbios, condicionando um ambiente propício aos processos de degradação e mineralização do lodo (VYMAZAL, 2005).

As plantas têm um papel crítico na determinação da dinâmica da perda de água, através da evapotranspiração. O crescimento das raízes afeta a hidráulica do solo, influenciando na filtração, redução da velocidade do fluxo, melhorando a sedimentação, reduzindo a ressuspensão e melhorando a distribuição de água, além da formação de poros, fator este que impede o entupimento do sistema (STOTTMEISTER et al., 2003; VYMAZAL., 2011). A rizosfera acaba

criando um ambiente propício ao crescimento de microrganismos, os quais participam ativamente dos processos de tratamento nos filtros, além das raízes removerem microrganismos patogênicos, insetos e odores (SHELEF; GROSS; RACHMILEVITCH, 2013).

Os sistemas plantados também são eficientes na remoção de nitrogênio e fósforo, via assimilação destes nutrientes pelas plantas, além de acumular em sua estrutura metais pesados e outros elementos traços nos compartimentos granulares ou vacúolos (SHELEF; GROSS; RACHMILEVITCH, 2013).

#### **1.4 Biomarcadores de qualidade sanitária no tratamento de esgoto sanitário**

A investigação e monitoramento de todos os patógenos entéricos possivelmente presentes em fezes humanas é considerada uma prática laboriosa e tecnicamente inviável de ser praticada, tendo em vista a vasta diversidade de patógenos entéricos. Assim, são utilizados biomarcadores para realizar inferências sobre o comportamento de demais patógenos e sua inativação (BOUDAUD et al., 2012).

Os vírus entéricos (como os adenovírus (AdV), bem como os bacteriófagos como modelos virais), *Salmonella* sp. e ovos de *Ascaris lumbricoides* são utilizados como biomarcadores de desinfecção fecal, considerando a diversidade de suas fisiologias e resistências aos processos de inativação (FIDJELAND et al., 2013; MAGRI et al., 2015).

##### **1.4.1 Bactérias entéricas**

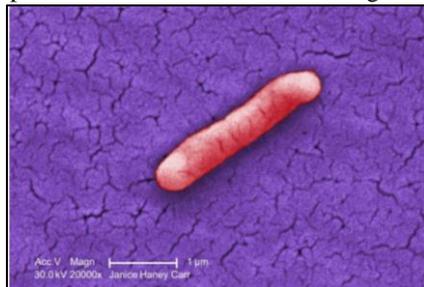
Este grupo de microrganismos inclui bactérias que causam infecções primárias no trato gastrointestinal humano, como *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Shigella*, por exemplo. As enterobactérias são bactérias gram-negativas, anaeróbias facultativas, apresentam ausência de citocromo oxidase, sendo referidos como oxidase-negativos (MURRAY, 2017).

###### **1.4.1.1 *Salmonella***

O gênero *Salmonella*, **Figura 2**, pertence à família Enterobacteriaceae, sendo composto por duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, subdivididos em sorotipos baseados na presença de moléculas de superfície específicas, chamadas O-antígeno (presente em

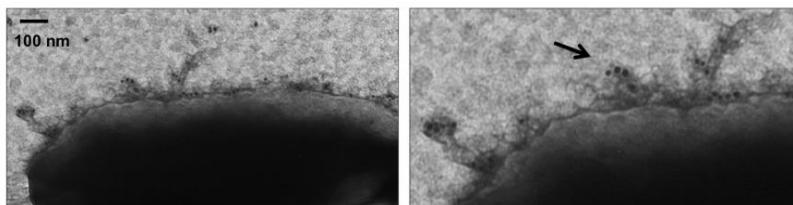
lipopolissacarídeos) e H-antígeno (proteína do complexo flagelar) (MCQUISTON et al., 2008), **Figura 3**.

**Figura 2.** Microscopia eletrônica mostrando a morfologia da *Salmonella*.



**Fonte:** CDC (Aumento 2000×).

**Figura 3.** Microscopia eletrônica de transmissão mostrando O-antígeno na superfície da *Salmonella*.



**Fonte:** Adaptado de Marshall; Gunn (2015).

São bactérias pertencentes ao grupo das Gram-negativas, devido a presença de lipopolissacarídeos em sua membrana, predominantemente móveis, anaeróbias facultativas, sendo um patógeno intracelular facultativo e considerada um patógeno zoonótico, podendo ocorrer a transmissão entre humanos e outros animais (SCALLAN et al., 2011; MOLINA-QUIROZ et al., 2015). A transmissão ocorre via ingestão de alimentos e água contaminada e as doenças causadas levam a diferentes resultados dependendo do sorotipo encontrado. Deste modo, os serovares Typhimurium e Enteritidis ocasionam gastroenterites em humanos, enquanto os serovares Typhi e Paratyphi ocasionam uma doença sistêmica grave, a febre tifóide (WAGNER; HENSEL, 2011; BELL et al., 2016).

Estudos anteriores realizados de dose infecciosa de *Salmonella* em humanos, indicam uma variação de  $10^5$  a  $10^{10}$  células para se causar doença, entretanto, quando disposta em alimentos indicam uma

necessidade de apenas 10 células para que ocorra o desenvolvimento da doença (BLASER e NEWMAN, 1982). Somente nos Estados Unidos, estima-se que mais de 1 milhão de infecções por *Salmonella* ocorrem anualmente, resultando em aproximadamente 20 mil hospitalizações e 400 mortes, sendo muitas vezes ocasionados devido as suas concentrações em águas residuais lançadas sem tratamentos ou tratadas ineficazmente em corpos d'água (SCALLAN et al., 2012).

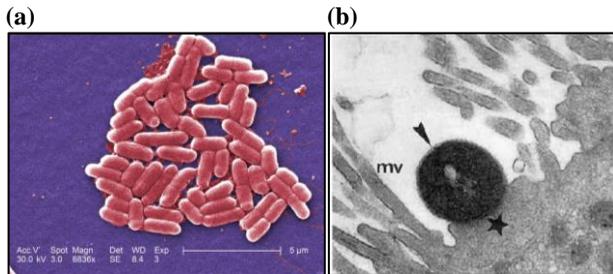
#### 1.4.1.2 *Escherichia coli*

Os coliformes são bactérias presentes no trato intestinal de humanos e animais, sendo subdivididos em coliformes totais e coliformes fecais/termotolerantes, sendo estes últimos indicadores fecais usados mundialmente para acessar a potabilidade de água de consumo humano. Possuem morfologia de bastonetes, são gram-negativos anaeróbios facultativos (BETTEGA, 2006).

A *Escherichia coli* (**Figura 4a**) forma o maior representante do grupo dos coliformes fecais, pertencendo à família Enterobacteriaceae, podendo ser classificados em enteropatogênicas típicas e atípicas (SOUSA, 2006). Naturalmente está presente na microbiota intestinal, não causando doenças, sendo consideradas não-patogênicas; As *E. coli* classificadas como sorotipos típicos não são encontradas em animais, indicando que os humanos são os únicos reservatórios desses microrganismos, os quais pertencem a microbiota intestinal humana impedindo a colonização por outros patógenos (NATARO; KAPER, 1998). Todavia, podem comportar-se como microrganismos oportunistas, tornando-se especializados, sendo capazes de ocasionar doenças em humanos sadios (SOUSA, 2006). Ainda, há os tipos patogênicos, como as *E. coli* enterohemorrágicas e enteroenvasivas.

O mecanismo central da patogênese é uma lesão chamada de aderência e apagamento, a qual caracteriza-se pela destruição das microvilosidades e aderência das bactérias ao epitélio intestinal, com a formação de pedestal e agregação de actina polarizada e outros elementos do citoesqueleto (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002), **Figura 4b**.

**Figura 4.** (a) Microscopia eletrônica mostrando a morfologia da *Escherichia coli* e (b) Lesão de aderência e apagamento mostrando o apagamento da microvilosidade (mv) e o pedestal (★) com *Escherichia coli* aderente (▶).



Fonte: CDC

Fonte: Adaptado de Pedroso et al. (1993).

A transmissão de *E. coli* ocorre via ingestão de água e alimentos contaminados, ocasionando gastroenterites, estando intimamente associados à contaminação do ambiente por águas residuais devido ao lançamento *in natura* e a um tratamento sanitário ineficaz (BETTELHEIM, 2003; SCHEUTZ et al., 2005; CABRAL, 2010).

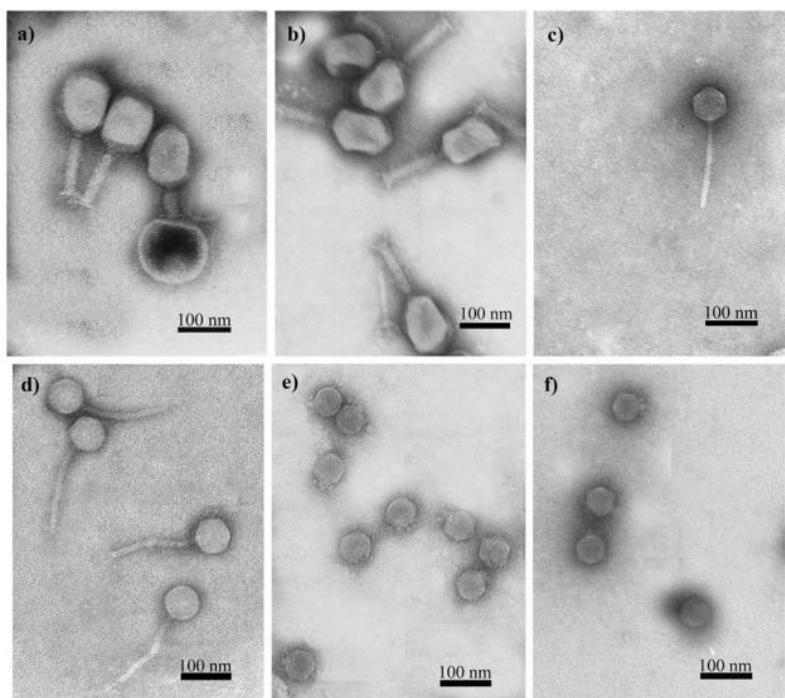
#### 1.4.2 Bacteriófagos: colifagos somáticos e fagos RNA macho-específicos

Os bacteriófagos utilizam bactérias como célula hospedeira para sua replicação, possuem estrutura icosaédrica, providos de cápsula proteica e podem possuir genoma RNA ou DNA (PELTOMAA et al., 2015). De maneira geral, alguns bacteriófagos têm sido utilizados como biomarcadores de contaminação fecal sendo fortes candidatos a substitutos aos vírus entéricos, posto que são encontrados em diversas matrizes ambientais contaminadas com águas residuais, bem como a metodologia de detecção seja simplificada, rápida e econômica quando comparada aos métodos tradicionais utilizados para detecção dos vírus entéricos (JOFRE et al., 2016). Além disso, têm se mostrado mais resistentes à fatores de inativação quando comparados às bactérias e também aos vírus entéricos, sobrepondo-se até mesmo ao AdV (MATTLE; VIONE; KOHN, 2014; MAGRI et al., 2015), sendo que os mais comumente utilizados são os colifagos somáticos e os fagos RNA macho-específico.

Os colifagos somáticos são classificados em quatro famílias: Myoviridae (RNA dupla-fita linear), Siphoviridae (dupla fita de DNA

linear), Podoviridae (DNA dupla-fita linear) e Microviridae (DNA dupla-fita circular) (LUTE et al., 2004). Este bacteriófago utiliza como hospedeira a bactéria *Escherichia coli* ligando-se a receptores proteicos específicos na membrana celular externa da bactéria. São os bacteriófagos mais comumente estudados e vem sendo utilizados como bioindicadores de contaminação fecal em ambientes (US EPA 2015, 2016). Na **Figura 5**, é possível observar as diferentes estruturas dos colifagos somáticos nas diferentes famílias.

**Figura 5.** Microscopia de transmissão eletrônica. A a B Família Myoviridae; C e D Família Siphoviridae; E e F Família Podoviridae.



**Fonte:** Kęsik-szeloch et al. (2013).

Os fagos RNA macho-específico são classificados em três famílias: Leviviridae (RNA simples fita), Inoviridae (DNA simples-fita) e Tectiviridae (DNA dupla-fita) (LECLERC et al., 2000). Os fagos RNA macho-específico (Leviviridae) são morfologicamente mais similares que os vírus entéricos, podendo ainda ser subdivididos em dois gêneros:

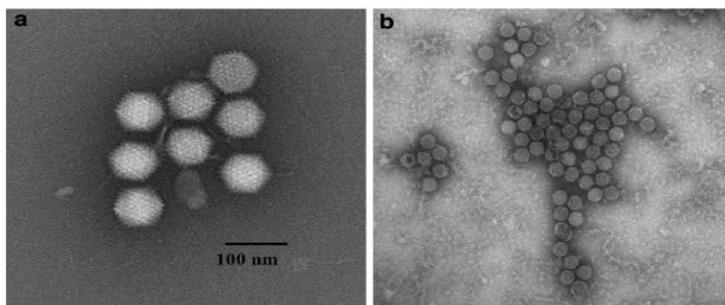
*Levivirus* (genogrupos I e II) e *Allolevivirus* (genogrupos III e IV), sendo os genogrupos II e III encontrados em grandes proporções em excretas de humanos (VINJE et al., 2004; FRIEDMAN et al., 2009; KING et al., 2011). Este bacteriófago utiliza como hospedeira a bactéria *Salmonella*, ligando-se a fímbria (F-pili) produzidos por células bacterianas “macho” em certo estágio do ciclo de crescimento. Estes fagos são considerados como bioindicadores ambientais e substitutos para estudar o comportamento de vírus entéricos, estando presentes geralmente em concentrações superiores aos colifagos somáticos (HAVELAAR, 1986; HAVELAAR; VAN OLPHEN; DROST, 1993; WHO, 2004).

### 1.4.3 Vírus entéricos

Os vírus entéricos constituem um problema sério de saúde pública, ocasionando doenças gastrointestinais, respiratórias, oculares e as hepatites A e E (EPI, 2011). Replicam-se no trato gastrointestinal de humanos, sendo excretados em altas concentrações, variando entre  $10^5$  a  $10^{11}$  partículas virais por gramas de fezes (BOSCH et al., 2008). A transmissão ocorre por contato direto (via fecal-oral) ou indireto (ingestão de água e alimentos contaminados), sendo a principal rota de transmissão devido ao descarte de esgoto contaminado em corpos d’água, além da aplicação de biossólidos municipais, águas subterrâneas impactadas por águas de superfície contaminadas ou por proximidade a tanques sépticos, bem como descarte de águas residuais com ausência de tratamento ou tratamento ineficaz (FONG et al., 2007; LOCAS et al., 2007; CHENG et al., 2012; KOTWAL; CANNON, 2014).

São vírus com ausência de envelope lipoproteico, sendo resistentes às condições adversas do ambiente (alterações de pH, temperatura e incidência de radiação solar), além de possuírem capacidade de agregação em íons, bem como entre si, favorecendo a proteção contra os fatores de inativação, fazendo destes vírus bons marcadores de contaminação fecal no ambiente (HERNROTH et al., 2002; WONG et al., 2012), de acordo com o apresentado na **Figura 6**.

**Figura 6.** Microscopia eletrônica de transmissão em a) vírions de Adenovírus; b) Agregação viral.



**Fonte:** Adaptado de Kahler et al. (2016).

As doenças causadas por estes vírus estão relacionadas principalmente às gastroenterites, hepatites e doenças respiratórias, sendo vírus com uma dose infecciosa muito baixa, onde 1-100 unidades já são capazes de promover o desenvolvimento das doenças (WHO, 2008).

### 1.4.3.1 Adenovírus

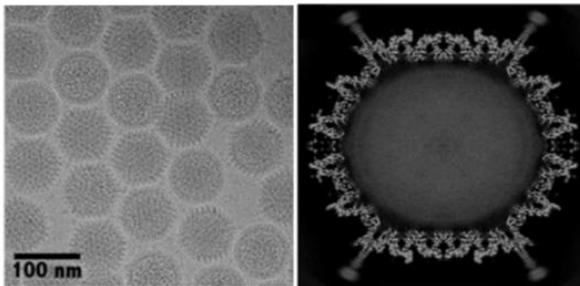
Os Adenovírus pertencem à Família Adenoviridae, dividida em cinco gêneros: *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus*, *Mastadenovirus* e *Siadenovirus*, totalizando 62 tipos. Os adenovírus responsáveis por infecções em humanos e outros mamíferos estão inclusos no gênero *Mastadenovirus*, sendo atualmente conhecidos 36 tipos divididos em oito espécies (A-H) de acordo com características imunológicas e bioquímicas da biologia do vírus (SANTOS et al., 2008; ICTV, 2016).

O genoma destes vírus é composto por DNA de dupla fita linear, não segmentado e de aproximadamente 35kb. Os vírions são icosaédricos, ausentes de envelope lipoprotéico e constituídos por 240 proteínas hexons, onde está situado o antígeno grupo-específico comum a todos os tipos. Em cada vértice, está contida uma base penton (molécula pentamérica não-covalente), associada à fimbrias, as quais são responsáveis pela adsorção e internalização por endocitose dos vírus à célula hospedeira, via receptor Coxsackie-Adenovirus (CAR) (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008; NEMEROW et al., 2009). Quando internalizado, o vírus é parcialmente desnudado, ocorrendo a lise do endossomo devido a proteína VI, injetando o genoma e proteína VII no

núcleo celular, iniciando por sua vez a síntese da proteína E1A após 2h de infecção, tendo a duplicação do genoma e tradução do mRNA em proteínas estruturais tardias, as quais fazem parte da estrutura do capsídeo viral (GALL; SHISLER; MARINAS, 2015; LARSON et al., 2015). A **Figura 7** apresenta a estrutura do adenovírus e suas principais proteínas.

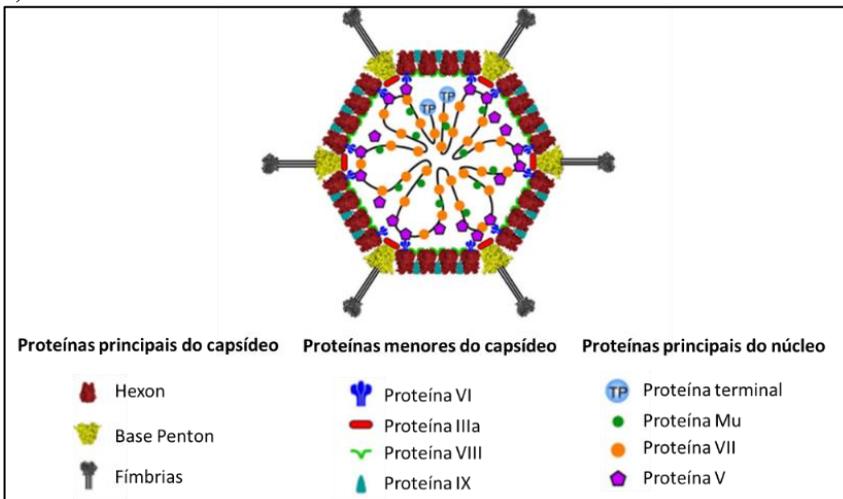
**Figura 7.** (a) Eletromicrografia de Adenovírus Humano (b) Corte através do centro da partícula do adenovírus mostrando a seção transversal das densidades das proteínas principais do capsídeo e proteínas menores associadas c) Estrutura do adenovírus e suas principais proteínas mediadoras da internalização viral, adaptado de Nemerow et al., 2009.

(a)



Fonte: Adaptado de Yu et al. (2017).

(b)



Fonte: Adaptado de Nemerow et al (2009).

A transmissão ocorre via contato direto ou indireto, através de secreções oculares e respiratórias, bem como por via fecal-oral através do consumo de água e alimentos contaminados, ocasionando diversas doenças, como infecções respiratórias, gastroenterites, conjuntivites e meningoencefalites, sendo específicas a cada tipo viral (JIANG, 2006; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008; MENA; GERBA, 2009).

Devido as suas características estruturais, as quais conferem resistência à fatores de inativação, estes vírus são considerados mais resistentes quando comparados aos vírus de genoma RNA, além de serem resistentes aos fatores de inativação, como as alterações ambientais (GERBA; GRAMOS; NWACHUKU, 2002; FONG; LIPP, 2005; CARRATALÀ et al., 2013). Deste modo, vem sendo reportados como biomarcadores de contaminação ambiental e estudos de desinfecção, estando inseridos desde a primeira publicação da lista de candidatos a contaminantes da EPA em 1998 até a mais recente, 2016.

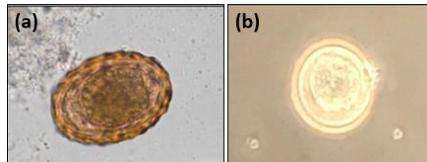
#### **1.4.4 Ovos de *Ascaris lumbricoides***

Os *Ascaris lumbricoides* pertencem a família Ascarididae e são um importante patógeno humano causador da doença ascaridíase. São encontrados em grande parte dos países do mundo, estando relacionados aos fatores ambientais e quanto ao grau de desenvolvimento socioeconômico da população, sendo estritamente relacionado com a ausência de saneamento básico (NEVES, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde, Ascaridiasis é a doença infecciosa causada por parasitas em humanos com maior prevalência, a qual cerca de 10% da população mundial em desenvolvimento está infectada por parasitas intestinais, onde as infecções por muitas vezes são assintomáticas, todavia, infecções severas causam aproximadamente 60 mil mortes por ano, principalmente em crianças (WHO; WSH; WWD; DFS, 2001). Indivíduos infectados com *Ascaris lumbricoides* excretam cerca de 200 mil ovos por dia, os quais podem permanecer viáveis no ambiente por longos períodos de tempo, disseminando a doença pela população, uma vez que a dose infecciosa é pequena, onde a ingestão de um ovo proveniente da água ou alimento contaminado é capaz de promover o desenvolvimento da doença (GEENEN et al., 1999; KARKASHAN et al., 2015).

Os ovos possuem 50 µm de diâmetro, são ovais e possuem uma cápsula espessa formado por três membranas: uma interna delgada e impermeável a água constituída de 25% de proteínas e 75% de lipídios; uma média de composição quitinosa e; uma externa composta por

mucopolissacarídeos, os quais são secretados pela parede uterina, **Figura 8**. Esta estrutura confere proteção contra os fatores de inativação, fazendo deles bons indicadores de qualidade microbiológica da água (CAPIZZI; SCHWARTZBROD, 2001; USEPA 2003; ORTA DE VELASQUEZ et al., 2004; PECSON et al., 2007; DE SOUZA et al., 2011; NEVES, 2016).

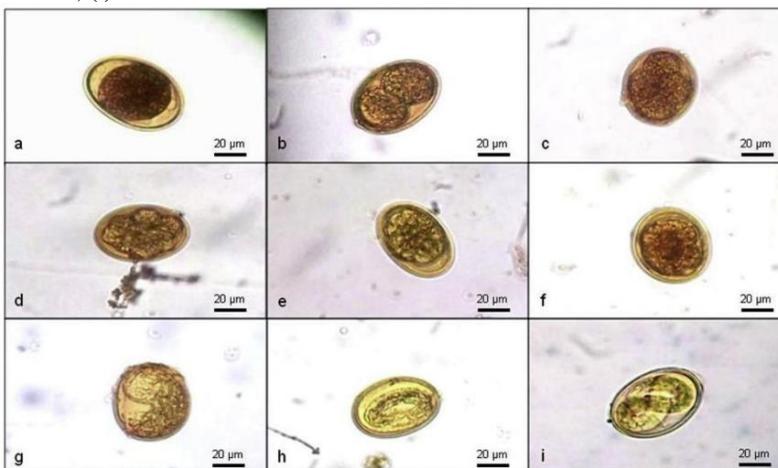
**Figura 8.** (a) Ovo fértil de *Ascaris lumbricoides* em microscópio (objetiva com aumento 40x), mostrando a estrutura da cápsula de proteção; (b) ovo fértil no estágio de mórula.



**Fonte:** Lenilza Mattos Lima

O ciclo biológico é do tipo monoxênico (um único hospedeiro), cada fêmea fecundada é capaz de colocar por dia, cerca de 200 mil ovos não-embrioados, os quais chegam ao ambiente juntamente com as fezes. Os ovos férteis em presença de temperatura entre 25-30°C, umidade mínima de 70% e oxigênio em abundância, tornam-se embrioados em 15 dias, como mostrado na **Figura 9**.

**Figura 9.** Estágios da embriogênese de *Ascaris*. (a), (b) e (c) estágio iniciais da divisão celular; (d) mórula inicial; (e) mórula tardia; (f) blástula; (g) gástrula; (h) larva L1; (i) larva L2.



**Fonte:** Adaptado de Rocha, Barés e Braga (2016)

A transmissão ocorre via ingestão de água e alimentos contaminados que contenham os ovos contendo a larva L3. Estes por sua vez, possuem grande capacidade de aderência em superfícies, sendo um fator importante na transmissão, uma vez que presentes no ambiente ou em alimento, não são removidos com facilidade (NEVES, 2016).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a inativação de microrganismos patogênicos e indicadores em lodos de esgotos tratados em um sistema de *wetlands* construídos, implantado e operado em escala real, visando a caracterização do lodo para o reciclo seguro no solo e agricultura.

### 2.2 Objetivos Específicos

I - Avaliar a eficiência de um sistema *wetland* construído para lodo, em etapa operacional de alimentação, na inativação de patógenos entéricos, utilizando como modelos - bactérias (*Escherichia coli* e *Salmonella* spp.), bacteriófagos (colifagos somáticos e fagos RNA macho-específico) vírus (Adenovírus humano) e ovos de helmintos (*Ascaris lumbricoides*);

II – Caracterizar em termos de microrganismos patogênicos, utilizando como modelos - bactérias, bacteriófagos, vírus e ovos de helmintos, o lodo acumulado em um sistema de *wetland* construído para lodo, em etapa de repouso;

III – Avaliar o uso de bacteriófagos como modelos do comportamento de vírus entéricos no sistema em estudo.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Wetland construído para lodo

O sistema de wetland construído para lodo, utilizado como objeto de estudo desta pesquisa, foi projetado e implantado em 2003 pela empresa Rotária do Brasil, parceira nesta pesquisa. A Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) atende um parque residencial de 7800 habitantes e é de responsabilidade atualmente do Sistema Autônomo Municipal de Água e Esgoto do município na qual está instalada.

O sistema está implantado em escala real, sendo composto por quatro unidades de wetlands construídos para lodo, também chamados de Canteiros de Mineralização, os quais utilizam a macrófita *Cyperus papyrus*, pertencentes à Família Cyperaceae, **Figura 10**. Cada unidade possui área de 400 m<sup>2</sup>, sendo 40 m de comprimento e 10 m de largura. Observa-se que três das quatro unidades foram avaliadas nesta pesquisa.

**Figura 10.** Macrófita *Cyperus papyrus*.



**Fonte:** Sheldon Navie (Weeds of Australia)

O sistema de wetland construído para lodo (WCL) estudado é composto por três unidades que estão em etapas de processamentos diferentes. O filtro WCL1, encontra-se em etapa de repouso (desde fev/16), enquanto os outros dois (WCL2 e WCL3) permanecem em alimentação.

O filtro WCL1 operou durante 10 anos consecutivos, com algumas interrupções, recebendo lodo de esgoto anaeróbio retirado principalmente de tanques sépticos unidomiciliares por meio de caminhões hidro vácuo, popularmente conhecidos como Limpa Fossa (LLF), e lodo de esgoto produzido em ETE, com dois Reatores em Batelada Sequencial (RBS), anexa ao sistema. Dessa forma, o sistema recebeu uma carga de

aproximadamente 80 m<sup>3</sup> de lodo de esgoto por semana, totalizando 38.400 m<sup>3</sup> de lodo lançados na superfície do wetland, resultando em uma camada de lodo acumulado de 1,30 m. Durante a operação do WCL1, o mais usual era o recebimento de carga de lodo de esgoto durante cinco dias consecutivos, permanecendo em repouso durante dois dias. Ressalta-se que esta rotina operacional variava de acordo com a quantidade de lodo gerada ou coletada pelos caminhões.

Os filtros WCL2 e WCL3, iniciaram as atividades após o WCL1 entrar em etapa de repouso, e atualmente permanecem em operação, recebendo lodo de esgoto da ETE anexa ao sistema e também lodo de esgoto anaeróbio retirado dos tanques sépticos. A alimentação dos sistemas ocorre de forma semelhante ao filtro WCL1, tendo alimentações consecutivas de lodo de esgoto durante cinco dias, seguidos de dois dias de repouso. Uma vez que o lodo é disposto na superfície dos WCL se inicia o processo de desaguamento e geração do líquido percolado. Para caracterização dos wetlands em operação foram avaliados o lodo de entrada (LLF e RBS), o lodo acumulado na superfície e o líquido percolado gerado.

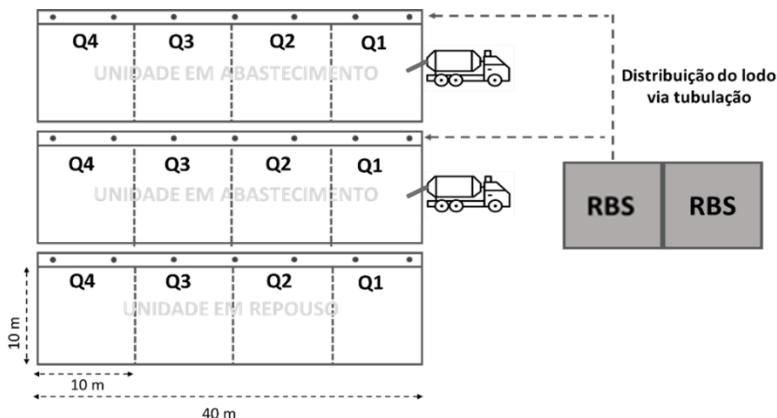
### 3.2 Procedimentos de campo e amostragem

O monitoramento dos sistemas WCL foi realizado no período compreendido entre maio de 2016 a junho de 2017 (doze meses), com coletas mensais.

A fim de caracterizar de forma mais precisa o sistema WCL, este foi dividido em quadrantes, **Figura 11**. Para o filtro WCL 1, as amostragens foram realizadas de forma aleatória, coletando em ao menos três quadrantes o perfil vertical superficial (25 cm) e o perfil vertical profundo (>30 cm). As amostras foram coletadas utilizando um trado do tipo holandês, o qual coletava cerca de 400g de lodo por vez, sendo contabilizadas ao final 6 amostras por coleta.

Para os filtros WCL 2 e WCL 3, as amostragens seguiram o mesmo padrão do filtro WCL1, entretanto, foi coletado apenas um perfil vertical, contabilizando 3 amostras por filtro, uma vez que as camadas de lodo acumulado eram menores em termos de profundidade. Foram realizadas ainda coletas do lodo proveniente da ETE RBS, e LLF, bem como do líquido percolado (LP) gerado.

**Figura 11.** Desenho experimental para a realização das coletas nos WC.



### 3.3 Parâmetros físico-químicos

Foram realizadas análises físico-químicas de acompanhamento dos seguintes parâmetros: potencial hidrogeniônico (pH), fósforo ortofosfato ( $P-PO_4$ ), nitrogênio amoniacal ( $N-NH_4^+$ ), Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Fixos (SF) e Sólidos Totais Voláteis (SV). As análises seguiram as recomendações do *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). Na **Tabela 1** estão apresentados os parâmetros avaliados e seguidos pelos métodos adotados.

**Tabela 1.** Parâmetros avaliados no lodo acumulado nos WCL, lodo RBS, lodo dos tanques sépticos anaeróbios e LP.

Parâmetros	Método
Fósforo-ortofosfato ( $mg.kg^{-1}$ ou $mg.L^{-1}$ )	Colorimétrico do ácido vanadomolibdofosfórico (APHA, 2005)
Potencial Hidrogeniônico (pH)	Potenciométrico - utilizando o equipamento Alphakit AT-150
Nitrogênio amoniacal ( $mg.kg^{-1}$ ou $mg.L^{-1}$ )	Colorimétrico de Nessler (VOGEL, 1981). Leitura em espectrofotômetro
Sólidos Totais ( $mg.kg^{-1}$ ou $mg.L^{-1}$ )	Método gravimétrico - secagem a 105°C
Sólidos Totais Fixos e Voláteis ( $mg.kg^{-1}$ ou $mg.L^{-1}$ )	Método gravimétrico - calcinado a 550°C

Foram avaliados também dados meteorológicos, e estes foram fornecidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), juntamente com o Centro de Informações de Recursos Ambientais e Hidrometeorologia de Santa Catarina (CIRAM). Os dados foram: temperatura, radiação média (U.V. AB) e precipitação.

### 3.4 Avaliação dos patógenos e indicadores modelos

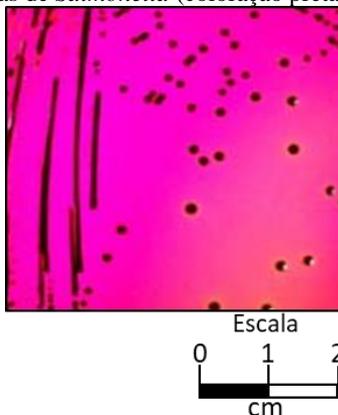
#### 3.4.1 Quantificação de *Salmonella* spp.

Para a quantificação de *Salmonella* spp. as amostras foram submetidas ao protocolo recomendado pela US EPA (2006) – *Method 1682: Salmonella in sewage sludge by modified semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) medium*. Para isso, foram utilizadas alíquotas de 2,0 g (ou mL no caso das amostras líquidas), 1,0 g e 0,1g de lodo acumulado nos *wetlands* construídos, lodo RBS, lodo anaeróbio provenientes dos tanques sépticos e LP. As alíquotas de 2,0 g e 1,0 g foram acrescidas ao meio TSB 3× (Tryptic soy broth) (KASVI®) em volume de 10 e 5 mL, respectivamente, enquanto as alíquotas de 0,1g foram acrescidas em 10 mL de TSB 1×.

Todos os tubos foram incubados a 37°C por 18 a 24h. Após, alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em placas de Petri contendo caldo Rappaport-Vassiliadis (MSRV) e incubadas a 42°C. Após 24h, alíquotas de cada placa foram semeadas em ágar XLD (Xylose-Lysine-Desoxycholate) (KASVI®). Colônias típicas de *Salmonella* spp., **Figura 12**, foram confirmadas por perfil bioquímico. O número de placas positivas para *Salmonella* spp. em ágar XLD foram utilizadas para o cálculo do número mais provável (NMP) por 4 gramas de peso seco, como descrito abaixo:

$$\text{NMP.4g}^{-1} (\text{peso seco}) = \frac{[\text{NMP mL de peso seco}] \times 4}{\text{Porcentagem de sólidos totais expressos em decimal}}$$

**Figura 12.** Colônias típicas de *Salmonella* (coloração preta) em ágar XLD.

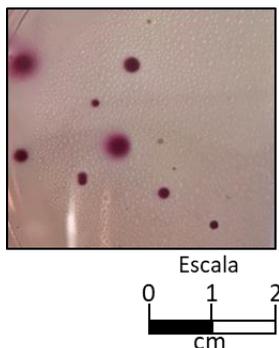


**Fonte:** adaptado de Online Microbiology .

### 3.4.2 Quantificação de *Escherichia coli*

Para a quantificação de *Escherichia coli*, as amostras foram acrescidas de solução fosfato-salina ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  [0,1M]) e diluídas em série até o esgotamento. Alíquotas de 0,1 mL de cada tudo, utilizando ao menos duas diluições, foram semeadas em ágar MacConkey e incubadas por 24h à 37°C. O número de placas positivas para *Escherichia coli*, **Figura 13**, foram contabilizadas e a quantificação foi realizada em Unidades Formadoras de Colônia por grama de ST ( $\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ ) ou por mL ( $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

**Figura 13.** Colônias típicas de *E. coli* em ágar MacConkey.



**Fonte:** a Autora.

### 3.4.3 Quantificação de Colifagos somáticos e Fagos RNA macho-específico

As quantificações dos bacteriófagos foram realizadas de acordo com a metodologia de dupla camada de ágar com o cultivo de bactérias hospedeiras e amostras diluídas seriadamente na base 10, seguindo os protocolos da *International Organization Standardization* (ISO). Para os colifagos somáticos utilizou-se a ISO 10705-2:2000(E) e para os Fagos RNA macho-específico a ISO 10705-1:199(E).

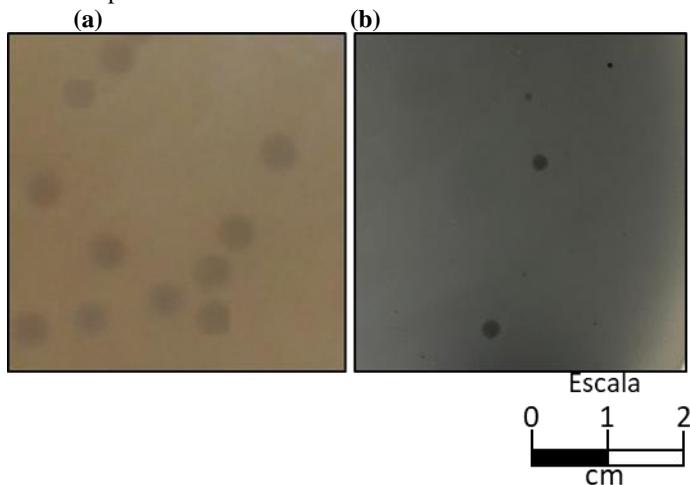
Para os fagos RNA macho-específico foi utilizada como hospedeira a bactéria *Salmonella* Typhimurium WG49 NCTC12484. Inicialmente as bactérias foram inoculadas em meio Tryptone-yeast extract-glucose broth (TYGB) e incubadas a 37°C por 3-5h para crescimento e propagação. As amostras foram diluídas seriadamente, na base 10 utilizando-se ao menos duas diluições. Um volume de 1 mL de amostra foi inoculado em tubos de ensaio contendo 2,5 mL de meio Tryptone-yeast extract-glucose agar semi-solid (TYGAss), juntamente com 1 mL da bactéria hospedeira *Salmonella* spp.. Por fim, 1 mL desta solução foi inoculada em placas de Petri contendo meio Tryptone-yeast extract-glucose agar (TYGA), **Figura 14a**.

Para os Colifagos somáticos foi utilizada como hospedeira a bactéria *Escherichia coli* (ATCC 13706). Inicialmente as bactérias foram inoculadas em meio Modified Scholtens' Broth (MSB) e incubadas a 37°C por 3-5h para crescimento e propagação. As amostras foram diluídas seriadamente, utilizando-se ao menos duas diluições. Um volume de 1 mL de amostra foi inoculado em tubos de ensaio contendo 2,5 mL de meio Modified Scholtens' Agar semi-solid (MSAss), juntamente com 1 mL da hospedeira *Escherichia coli*. Por fim, 1 mL desta solução foi inoculada em placas de Petri contendo meio Modified Scholtens' Agar (MSA), **Figura 14b**.

Após a solidificação dos meios nas placas de Petri, estas foram incubadas a 37°C por um período de até 18h. As quantificações foram realizadas em unidades formadoras de placa por grama ou ml (UFP.g<sup>-1</sup> ou UFP.mL<sup>-1</sup>), conforme a equação abaixo:

$$\text{UFP.g}^{-1} \text{ ou UFP.mL}^{-1} = \frac{\text{Número de placas} \times \text{Recíproca da diluição}}{\text{Volume inoculado (mL)}}$$

**Figura 14.** (a) Focos de colifagos somáticos em meio MSA (b) Focos de Fagos RNA macho-específico em meio TYGA.



**Fonte:** a Autora.

### 3.4.4 Quantificação de Adenovírus infecciosos

#### 3.4.4.1 Concentração das amostras para análise viral

Para realizar a quantificação dos vírus entéricos, utilizou-se a técnica de ensaio de placas de lise, a qual utiliza cultura celular, descrita no **Item 4.4.8.1**. Deste modo, a fim de remover as impurezas e concentrar os vírus das amostras, utilizou-se a metodologia de concentração viral, bem como a produção do vírus para controle positivo nas análises.

As partículas virais foram concentradas pelo método de Polietilenoglicol (PEG), seguindo o protocolo descrito por Schilindwein et al. (2009). Para este procedimento foram utilizados 20g de amostras de lodo de esgoto dos sistemas wetland construído, lodo bruto SBR e lodo anaeróbio proveniente de tanques sépticos, acrescidas de 20 mL de solução fosfato-salina (PBS 1×). Em tubos de centrifuga, foram adicionados 20 mL de cada amostra e inoculados 200 µL de Cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$  [0,05M]), o pH foi ajustado para 3,5 e as amostras permaneceram em agitação durante 30 min. Após, as amostras foram centrifugadas a 2500 g por 30 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi ressuspenso em 10 mL de tampão glicina

[0,25M – pH 9,5]. As amostras permaneceram sob agitação durante 1h e posteriormente o pH foi ajustado para 7,0. As amostras foram novamente centrifugadas, a uma velocidade de 10.000 g durante 30 min a 4°C e posteriormente o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de centrifuga. Adicionou-se 8% de Polietilenoglicol (PEG) 6000 ao sobrenadante coletado, e então permaneceu sob agitação por 2h a 4°C. Após, as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 90 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi ressuspensionado em 20 mL de PBS 1× [0,1 M – pH 7,2]. Por fim, as amostras foram alíquotadas em tubos *Eppendorf* de 2 mL e armazenadas a -80°C.

#### 3.4.4.2 Cultivo de células animais

Foi utilizada a linhagem celular A549, derivada de carcinoma de pulmão humano, permissivas à infecção *in vitro* pela maioria dos Adenovírus humanos, obtida através da American Type Culture Collection (ATCC), **Figura 15a**.

As células foram cultivadas em garrafas com filtros acoplados às tampas e área de crescimento de 125 cm<sup>2</sup>, utilizando Meio Mínimo Essencial Dulbecco com sais de Eagle's e alta concentração de glicose (DMEM high glucose 1x) (Gibco), suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco) e 1% de Piruvato de Sódio [100 mM] (Gibco).

#### 3.4.4.3 Produção de estoque viral

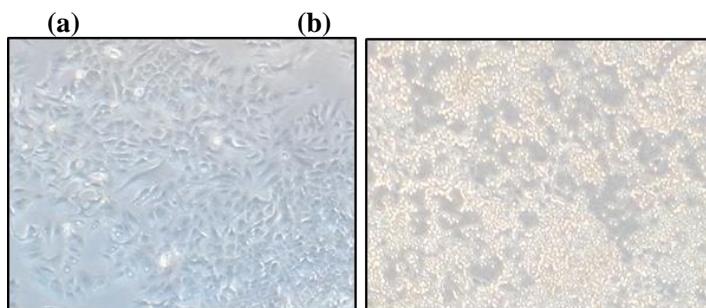
As células A549 foram cultivadas em meio de crescimento/manutenção (DMEM alta glicose 1×, suplementado com 5% de SFB e 1% de piruvato de sódio [100 mM]) por 24h até que a monocamada celular atingisse a confluência, após, foram lavadas duas vezes com solução tampão fosfato-salina (PBS 1×) e após, receberam 2 mL do inóculo de Adenovírus humano tipo 2 (HAdV-2). Após 1h de incubação para adsorção viral sob as condições padrão (37°C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>) e com homogeneização em intervalos de 15 min, foi adicionado o meio de manutenção, previamente descrito.

As células foram observadas diariamente até apresentarem 80-100% de efeito citopático, caracterizado por células arredondada e desprendimento da monocamada celular, **Figura 15b**. Em seguida, as células foram congeladas a -80°C e descongeladas a 25°C por três vezes, para que ocorresse o rompimento celular e os vírus que haviam permanecido intracelularmente fossem liberados. As suspensões virais foram transferidas para tubos de centrifuga e realizada centrifugação a

350 G por 5 min a 4°C para remoção das células rompidas. O sobrenadante foi utilizado para realizar novas infecções, com objetivo de elevar o título viral. Após algumas passagens, com a redução do período para o aparecimento do efeito citopático, caracterizado um aumento do título viral, o fluido viral foi titulado, aliquotado e estocado a -80°C.

Na determinação do título infeccioso viral do HAdV-2, foi utilizado o ensaio de placas da lise, segundo o **Item 4.4.8**, para titulação e viabilidade viral.

**Figura 15.** (a) Células A549 (controle negativo) (b) Células A549 infectadas com HAdV-2, mostrando o efeito citopático (Aumento da objetiva em 400×)



Fonte: a Autora.

#### 3.4.4.4 Ensaio de citotoxicidade amostral

Para determinação do grau de citotoxicidade das amostras, as células A549 foram cultivadas na densidade  $3,0 \times 10^5$  células/mL em placas de 24 poços, durante 24h até atingirem a confluência. Inicialmente, foram realizadas diluições das amostras em Minimum Essential Medium Eagle (MEM 1×) nas proporções: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64. Em seguida, a monocamada celular foi lavada uma vez com PBS 1×. Foram inoculados 150 µL das amostras nas respectivas diluições, em duplicada, nas cavidades contendo células cultivadas, permanecendo durante 60 min a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com intervalos de 15 min para homogeneização das amostras. Posteriormente, o inóculo foi aspirado e o meio de manutenção (DMEM high glucose suplementado com 4% de SFB, 2% de antibióticos PS [(Penicilina G [100 U/mL] e Sulfato de estreptomicina [100 µg/mL]), 2% de Anfotericina B [0,025 µg/mL], 2% de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub> [25 mM] e 1% de Piruvato de sódio [100 mM]), foi adicionado.

Durante o período de 7 dias, foram realizadas observações diárias em microscópio invertido, a fim de verificar possíveis alterações morfológicas nas células. Após o período de incubação, o meio foi aspirado e a monocamada celular fixada e corada com 150 µL do corante Cristal Violeta. Deste modo, foi possível determinar a diluição ideal para o dano celular visualizado fosse decorrente da replicação viral e não devido a citotoxicidade amostral.

#### 3.4.4.5 Ensaios de Placas de lise

Com objetivo de quantificar os HAdV, a partir da produção do estoque viral, bem como HAdV contidos nas amostras provenientes do sistema *Wetland* construído, utilizou-se o ensaio de formação de Placas de Lise, adaptado de Cromeans et al. (2008).

As células A549 foram cultivadas na densidade de  $3,0 \times 10^5$  células/mL em placas de 6 cavidades. Após 24h, quando a monocamada celular atingiu a confluência, as células foram infectadas com o fluido viral de HAdV-2 (controle positivo), meio de crescimento (controle negativo) e com amostras concentradas de lodo do *Wetland* construído para verificar e quantificar a presença de HAdV infecciosos.

Para o fluido viral, foram realizadas diluições seriadas na base 10, sendo utilizado como controle positivo a diluição  $10^{-9}$  unidades formadoras de placa por mL (UFP/mL).

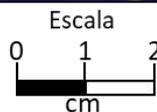
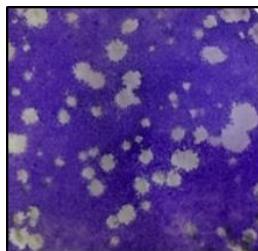
As amostras foram utilizadas na sua diluição não citotóxica: amostras concentradas de lodo do WC, lodo RBS e lodo anaeróbio dos tanques sépticos na diluição 1:2; amostra de líquido percolado inoculado diretamente 1:16; adicionou-se 2% de antibiótico PS e 2% de anfotericina em DMEM alta glicose  $1 \times$ .

As monocamadas celulares foram inoculadas com 300 µL de cada diluição amostral, em triplicata, incubadas por 60 min a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, realizando homogeneização em intervalos de 15 min. Por fim, adicionou-se o meio de manutenção composto por DMEM high glucose  $2 \times$  suplementado com 2% de piruvato de sódio [100 mM], 2% de PS, 2% de Anfotericina B [0,025µg/mL], 2% de MgCl<sub>2</sub> e de 4% SFB, sendo diluídos em volume igual de Bacto-ágar (BD Biosciences) a 0,6% aquecido até a liquefação. Em cada cavidade da placa, adicionou-se 2,5 mL desse meio, aguardando a solidificação do meio espessante. Após o período de incubação de 7 dias, sob condições padrão, o meio foi aspirado e a monocamada celular fixada e corada com 1 mL da solução de Cristal Violeta, como mostrado na **Figura 16**.

O número de Unidades Formadoras de Placas (UFP) foi calculado a partir do número de placas de lise, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{UFP.g}^{-1} \text{ ou UFP.mL}^{-1} = \frac{\text{Número de placas} \times \text{Recíproca da diluição}}{\text{Volume inoculado (mL)}}$$

**Figura 16.** Focos causados pela lise das células A549 devido à infecção de HAAdV infecciosos.



Fonte: a Autora.

### 3.4.5 Enumeração de ovos de helmintos

A quantificação de ovos de helmintos foi realizada segundo as recomendações da *Environmental Protection Agency* – Appendix I (US EPA, 2003).

O método se baseia na separação física dos ovos de *Ascaris lumbricoides* levando em consideração seu tamanho e peso. Para isso, 500g de amostras de lodo de esgoto do WC, lodo RBS, lodo anaeróbio dos tanques sépticos e LP, passaram por peneira de abertura de 50 *mesh* com a peneira de 400 *mesh* embaixo. Os sedimentos retidos na peneira de 400 *mesh* foram lavados com solução fosfato-salina ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  [0,1M]) suplementada com 1% de Tween-80 e coletados em um Becker para decantação *overnight* a 4°C. Após, o sedimento foi separado em tubos de centrifuga adicionando a solução de Sulfato de Magnésio ( $\text{MgSO}_4$  [0,1M]) na proporção: 1 mL de sedimento + 45 mL de  $\text{MgSO}_4$  [0,1M]. A seguir, as amostras foram centrifugadas quatro vezes a 800 g por 10 min e ao final de cada centrifugação o sobrenadante era coletado e passado novamente na peneira de 400 *mesh* para a retenção dos ovos. O retido na peneira foi coletado e lavado com solução fosfato-salina de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  [0,1M] e ressuspendido em 4 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) [0,1N]. Por

fim, as amostras foram incubadas a 26°C durante 30 dias, a fim de se observar o desenvolvimento embrionário, o que não foi possível em função de uma concentração de sólidos ainda muito alta nas amostras processadas. Após os 30 dias, os ovos foram contabilizados somente quanto à presença e não quanto à viabilidade.

### **3.5 Análise estatística**

Para as análises dos dados obtidos durante as coletas do lodo acumulado dos filtros WCL1 e WCL, lodo aeróbio do RBS, lodo de caminhões limpa fossa (LLF) e LP - foram realizadas análises descritivas (média e desvio padrão).

Os dados foram normalizados e submetidos quando necessário aos: Teste de correlação de *Pearson*, ANOVA e *Student's t-test*, utilizando os *softwares* GraphPad Prism 6.0 e Excel 2016.

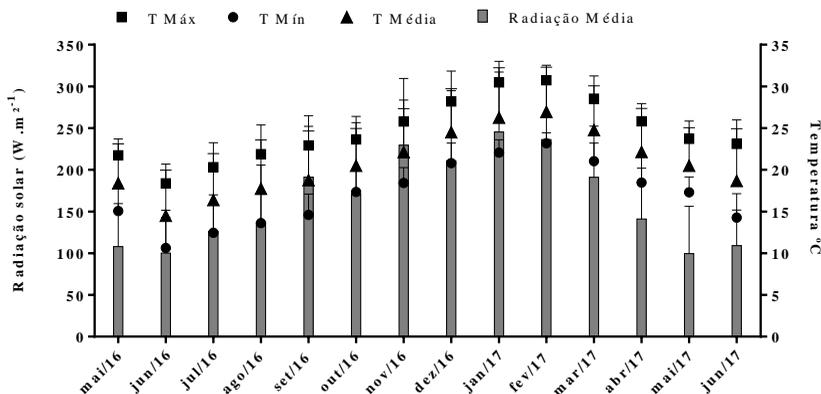
As análises foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Dados meteorológicos

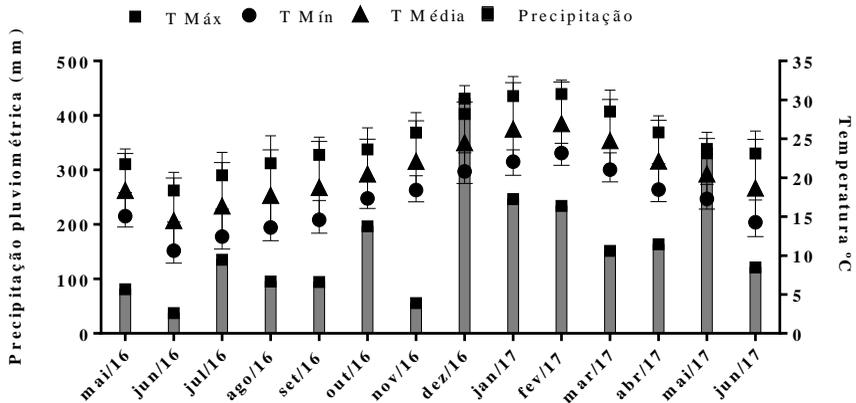
Na **Figura 17** estão apresentados os dados meteorológicos referentes à radiação média, temperatura máxima, temperatura mínima e temperatura média, registradas ao longo do monitoramento dos sistemas. Pode-se observar que no início do monitoramento (maio de 2016) as temperaturas eram amenas, com média de 20°C, todavia, no período compreendido entre novembro de 2016 a fevereiro de 2017, pode-se observar um aumento crescente da temperatura, atingindo um pico médio de 30°C registrado para o mês de fevereiro, resultado que condiz com a estação de verão em países tropicais. Nos meses seguintes, observou-se uma queda linear da temperatura. Quanto à radiação média observada, os maiores valores foram registrados nos meses em que a temperatura também foi mais elevada, conforme o esperado.

**Figura 17.** Médias mensais de temperatura e radiação média durante o período de monitoramento do sistema.



Na **Figura 18** estão apresentados os dados meteorológicos referentes às temperaturas máxima, mínima e média, bem como os dados da precipitação pluviométrica acumulada, durante o período de monitoramento dos sistemas. Deste modo, foi possível observar que os meses com a maior precipitação pluviométrica acumulada foram entre dezembro de 2016 a fevereiro de 2017.

**Figura 18.** Dados da precipitação pluviométrica acumulada, temperatura máxima, mínima e média durante o período de monitoramento dos sistemas.



Nos Itens subsequentes, serão apresentadas as correlações encontradas entre os dados meteorológicos e o funcionamento do sistema.

## 4.2 Lodo de alimentação (RBS E LLF)

### 4.2.1 Caracterização físico-química do lodo de alimentação

Na **Tabela 2** estão dispostos os resultados obtidos referentes aos parâmetros físico-químicos mensurados para o lodo de alimentação, composto pelo lodo RBS e LLF.

**Tabela 2.** Caracterização físico-química dos lodos de alimentação dos sistemas WCL.

Amostras (n=9)	Dados	Parâmetros físico-químicos			
		pH	ST (%)	ST (mg.L <sup>-1</sup> )	STV (%)
Lodo RBS	Média	6,84	2	1248	31
	DP	0,28	0	182	7
LLF	Média	6,99	2	17749	36
	DP	0,22	0	4279	13

Podemos observar a partir dos resultados obtidos, o lodo RBS é levemente mais básico quando comparado ao LLF, sendo esta faixa de pH geralmente encontrada nos lodos desse tipo de reator, ideais para que

ocorram os processos de nitrificação e desnitrificação, posto que a neutralidade contribui para uma maior diversidade biológica (LEE et al., 2008). O pH levemente mais ácido encontrado no LLF, se deve ao fato de ações acidogênicas ocorrerem nos tanques sépticos.

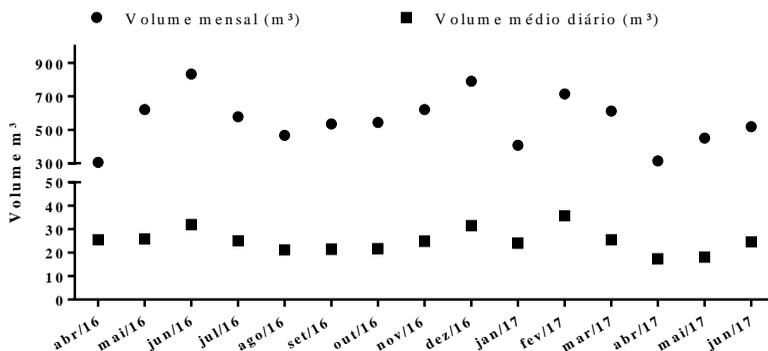
Quanto à concentração de ST, o lodo RBS apresentou em média  $1248 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $\pm 182 \text{ mg.L}^{-1}$ ), sendo inferior ao registrado no LLF, em média  $17749 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $\pm 4279 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Com relação aos STV, os quais representam a porção orgânica dos ST, o valor detectado no lodo RBS mostrou-se inferior ao encontrado no LLF, correspondendo a 31% ( $\pm 7\%$ ) dos ST, o que demonstra sua maior estabilização. Existem variações grandes quanto aos percentuais de STV de lodos de caminhões limpa fossa, evidenciados em diversos estudos, como Gagnon et al. (2012) relataram um percentual de 74% de STV, assim como Magri et al. (2016) obtiveram um percentual de 60% de STV.

#### 4.2.2 Taxa de aplicação superficial do lodo de alimentação

Conforme a **Figura 19**, diariamente no sistema WCL chegavam em média quatro caminhões limpa-fossa, os quais descarregavam um volume médio total de  $12 \text{ m}^3$  em cada WCL em funcionamento, sendo assim, para as análises de eficiência do sistema, considerou-se que a mesma taxa de aplicação de lodo ocorre em ambos WCL.

De cada reator RBS é retirado um volume médio de  $10 \text{ m}^3$  por dia, totalizando semanalmente  $50 \text{ m}^3$  de lodo.

**Figura 19.** Registro do volume mensal (●) e volume médio diário (■) de lodo descarregado por caminhões limpa-fossa no sistema WCL entre abril/16 a jun/17.



Atualmente, não há valores padrão de parâmetros de projeto e configurações dos WC para o tratamento de lodo. O principal parâmetro utilizado é a taxa de aplicação superficial (TAS) expressa em  $\text{kg.ST.m}^{-2}.\text{ano}^{-1}$ , a qual irá determinar a área de superfície necessária, permitindo o dimensionamento dos sistemas (UGGETTI et al., 2010).

Equação 1: Taxa de Aplicação Superficial Anual ( $\text{kgST/m}^2.\text{ano}$ )

$$TA = \left( \frac{C_{ST} \times V_{ano}}{A_t} \right)$$

Nesta equação, a variável  $C_{ST}$  corresponde à Concentração de ST no Lodo de Alimentação ( $\text{kg/m}^3$ ), a  $V_{ano}$  ao Volume médio total por ano de Lodo de Alimentação ( $\text{m}^3$ ) e a  $A_t$  à Área total dos dois WCL em funcionamento ( $\text{m}^2$ ).

Os WCL apresentados neste trabalho eram operados continuamente a partir das demandas de volumes de lodos a serem tratados, e não de acordo com uma taxa de aplicação específica. No entanto, para fins de entendimento do sistema, e comparação com outros trabalhos, as taxas de aplicação de lodo foram calculadas.

Na **Tabela 3** observam-se os valores respectivos de cada variável e o resultado da TAS. Deste modo, podemos observar uma TAS de  $177 \text{ kg.ST.m}^2.\text{ano}^{-1}$ , sendo esta considerada como uma taxa alta em relação à área do sistema. Diversos estudos estabelecem diferentes TAS, Gagnon et al. (2012) consideram baixa uma TAS média de  $16 \text{ kg.ST.m}^2.\text{ano}^{-1}$  e alta de  $122 \text{ kg.ST.m}^2.\text{ano}^{-1}$ , já Nielsen (2005), adotou como critério o valor de 50 a  $60 \text{ kg.ST.m}^2.\text{ano}^{-1}$  para um sistema de  $500 \text{ m}^2$ , entretanto, Ugetti et al. (2009) utilizou para um sistema de  $25 \text{ m}^2$  uma TAS de  $125 \text{ kg.ST.m}^2.\text{ano}^{-1}$ . Assim, a TAS pode variar conforme a necessidade do sistema, como por exemplo, no início da construção do projeto (após a plantação das macrófitas), a TAS pode ser inferior à do projeto, visto que promove o crescimento e desenvolvimento das plantas, protegendo-as do estresse (NIELSEN, 2003; BURGOON et al., 1997).

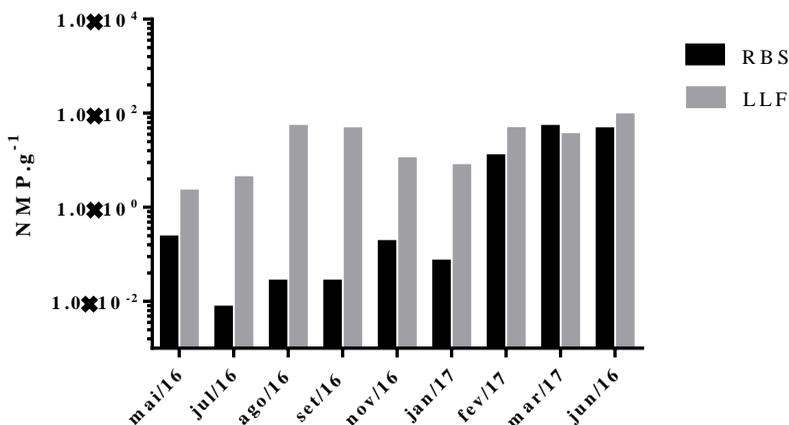
**Tabela 3.** Cálculo da taxa de aplicação anual do lodo de alimentação.

Amostras	ST (kg/m <sup>3</sup> )	Volume de lodo aplicado/ano m <sup>3</sup>	Área total (m <sup>2</sup> )	TAS (Kg.ST/m <sup>2</sup> .ano)
RBS	1,25	2760		
LLF	17,75	7803		
Lodo de alimentação	13,45	10554	800	177

#### 4.2.3 Caracterização microbiológica do lodo de alimentação

Para *Salmonella* spp., no lodo RBS, obteve-se uma detecção média de  $1,19 \times 10 \pm 2,05 \times 10$  NMP.g<sup>-1</sup>, variando entre  $7,20 \times 10^{-3}$  e  $5,03 \times 10$  NMP.g<sup>-1</sup>. No LLF, obteve-se uma detecção média de  $3,16 \times 10 \pm 2,85 \times 10$  NMP.g<sup>-1</sup> e concentrações variando entre 2,09 e  $8,74 \times 10$  NMP.g<sup>-1</sup>, **Figura 20**.

No lodo RBS e LLF, as maiores concentrações de *Salmonella* spp. foram registradas na fase final do monitoramento no período compreendido entre fevereiro a junho de 2017. Ainda assim, foi possível observar variações ao longo do monitoramento, acentuadas principalmente no lodo RBS.

**Figura 20.** Quantificação de *Salmonella* spp. no lodo RBS e LLF.

Após as quantificações de *Salmonella* spp., foram realizadas análises e comparações entre as concentrações do patógeno encontrado e

dos parâmetros físico-químicos e dados meteorológicos durante o monitoramento dos sistemas, apresentados na **Tabela 4**.

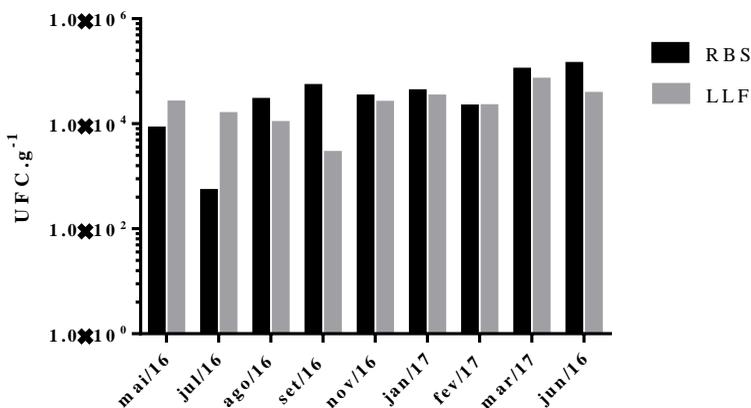
Observou-se uma correlação positiva significativa ( $R^2=0,43$ ) entre a concentração da *Salmonella* spp. e o pH no LLF ( $p>0,05$ ), indicando que o aumento do pH próximo a faixa neutra induz ao aumento da concentração da bactéria, uma vez que o pH ótimo para a taxa de crescimento bacteriano permanece entre as faixas de 6,5-7,5 (MENDONÇA, 2016).

**Tabela 4.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de *Salmonella* spp. e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo RBS e LLF.

	Parâmetros	Diferença estatística	Valor de $R^2$
<b>Lodo RBS</b>	Teor de ST (%)	não ( $p>0,05$ )	0,15
	Teor de STV (%)	não ( $p>0,05$ )	0,00
	Temperatura (°C)	não ( $p>0,05$ )	-0,39
	Precipitação pluviométrica (mm)	não ( $p>0,05$ )	-0,37
	pH	não ( $p>0,05$ )	0,00
	Parâmetros	Diferença estatística	Valor de $R^2$
<b>LLF</b>	Teor de ST (%)	não ( $p>0,05$ )	-0,27
	Teor de STV (%)	não ( $p>0,05$ )	0,19
	Temperatura (°C)	não ( $p>0,05$ )	0,04
	pH	não ( $p>0,05$ )	0,43

Quanto a *E.coli*, obteve-se uma detecção média de *E.coli* de  $4,70 \times 10^4$  ( $\pm 4,51 \times 10^4$ ) UFC.g<sup>-1</sup>, variando entre  $5,15 \times 10^2$  e  $5,13 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> no lodo RBS. No LLF, obteve-se uma detecção média de  $2,62 \times 10^4$  ( $\pm 1,89 \times 10^4$ ) UFC.g<sup>-1</sup>, em concentrações que variaram entre  $2,75 \times 10^3$  e  $1,89 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>, como mostrado na **Figura 21**. As concentrações detectadas estão dentro das faixas esperadas.

**Figura 21.** Quantificação de *E. coli* no lodo RBS e LLF.



Não foram encontradas correlações significativas entre as concentrações de *E. coli* e os parâmetros físico-químicos avaliados, como mostra a **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de *E. coli* e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo RBS e LLF.

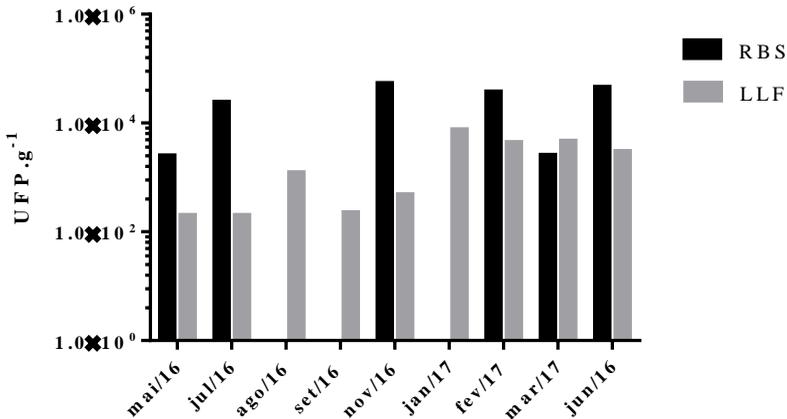
	Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
<b>Lodo RBS</b>	Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,02
	Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,10
	Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,20
	Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	0,38
	pH	não (p>0,05)	0,00
<b>LLF</b>	Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
	Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,08
	Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,33
	Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,21
	pH	não (p>0,05)	-0,01

Para os colifagos somáticos, no lodo RBS, obteve-se uma detecção média de  $2,76 \times 10^4$  ( $\pm 2,17 \times 10^4$ ) UFP.g<sup>-1</sup> e concentrações que variaram entre  $2,50 \times 10^3$  e  $5,33 \times 10^4$  UFP.g<sup>-1</sup>. Nos meses de ago/16, set/16 e jan/17, as detecções permaneceram abaixo do limite de detecção da técnica (10 UFP), como mostrado na **Figura 22**. As concentrações médias obtidas neste estudo vão ao encontro do relatado por Gino, Starosvetsky

e Armon (2007), os quais detectaram concentrações de colifagos somáticos variando entre  $10^3$  e  $10^5$  UFP.g.ST<sup>-1</sup> em lodo aeróbio.

No LLF, obteve-se uma detecção média de  $3,23 \times 10^3$  ( $\pm 2,63 \times 10^3$ ) UFP.g<sup>-1</sup>. e concentrações que variaram entre  $2,00 \times 10^2$  e  $7,55 \times 10^3$  UFP.g<sup>-1</sup>, **Figura 22**. Mandilara et al. (2006) também registraram concentrações de colifagos somáticos no lodo de esgoto variando entre  $10^3$  e  $10^5$  UFP.g<sup>-1</sup>.

**Figura 22.** Quantificação de colifagos somáticos no lodo RBS e LLF.



Para o lodo RBS, não foram observadas correlações significativas entre os parâmetros analisados e as concentrações de colifagos somáticos (**Tabela 6**).

No LLF, foi possível observar uma correlação positiva significativa ( $R^2=0,63$ ) com as temperaturas ( $p>0,05$ ), indicando que o aumento desta influenciou no aumento da concentração do bacteriófago, uma vez que em temperaturas superiores a  $30^\circ\text{C}$ , encontra-se uma maior diversidade microbiana no LLF, propiciando deste modo, uma maior replicação devido ao aumento da concentração da bactéria hospedeira (PUSSAYANAVIN et al., 2014).

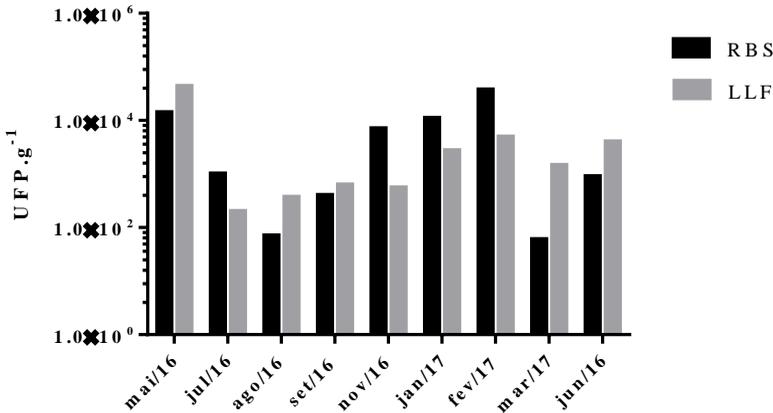
**Tabela 6.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de colifagos somáticos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo RBS e LLF.

	Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
<b>Lodo RBS</b>	Teor de ST (%)	não (p>0,05)	-0,03
	Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,21
	Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,00
	Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	-0,20
	pH	não (p>0,05)	0,13
	Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
<b>LLF</b>	Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,21
	Teor de STV (%)	não (p>0,05)	-0,35
	Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,63
	pH	não (p>0,05)	0,39

Com relação fagos RNA macho-específico, no lodo RBS, obteve-se uma detecção média de  $8,00 \times 10^3$  ( $\pm 1,22 \times 10^4$ ) UFP.g<sup>-1</sup> e concentrações que variaram entre  $6,00 \times 10$  e  $3,74 \times 10^4$  UFP.g<sup>-1</sup> na **Figura 23**. McMinn, Ashbolt e Korajkic (2017), também detectaram concentrações variando entre  $10^3$  e  $10^5$  UFP.g<sup>-1</sup> em lodos de esgoto não tratados.

Para o LLF, a quantificação de fagos RNA macho-específico resultou em uma detecção média de  $6,49 \times 10^3$  ( $\pm 1,40 \times 10^4$ ) UFP.g<sup>-1</sup> e concentrações que variaram entre  $2,00 \times 10^2$  e  $4,36 \times 10^4$  UFP.g<sup>-1</sup>, **Figura 23**. Esta concentração registrada ficou abaixo do registrado por Mandilara et al. (2006), os quais visualizaram concentrações de  $10^5$  UFP.g<sup>-1</sup> em lodos de esgoto.

**Figura 23.** Quantificação de fagos RNA macho-específico no lodo RBS e LLF.



Assim como observado com os colifagos somáticos, os fagos RNA macho-específico não apresentaram correlações significativas com os parâmetros avaliados, **Tabela 7**, confirmando o fato de serem resistentes as condições adversas ocorridas no ambiente, sendo considerado desta forma um bom bioindicador (MATTLE; VIONE; KOHN, 2014).

A partir da **Figura 23** foi possível observar variações da concentração do bacteriófago ao longo do monitoramento, podendo estar intimamente relacionada à concentração e também variação ocorridas na bactéria hospedeira (*Salmonella* spp.), indicando que os fagos RNA macho-específico podem reduzir a concentração da hospedeira, uma vez que estudos recentes vêm utilizando este mecanismo para redução de *Salmonella* em diversas matrizes, assim como o crescimento da bactéria influencia no aumento da replicação produzindo novos vírions (PEREIRA et al., 2016; GRANT et al., 2017).

Observa-se ainda a partir da **Figura 23** que as variações das concentrações dos fagos RNA tiveram o mesmo padrão nos dois lodos, evidenciando o padrão de excreção dos mesmos e das bactérias hospedeiras pelas pessoas ao longo do ano. Este fato corrobora para o uso de bacteriófagos como indicadores virais de contaminação fecal.

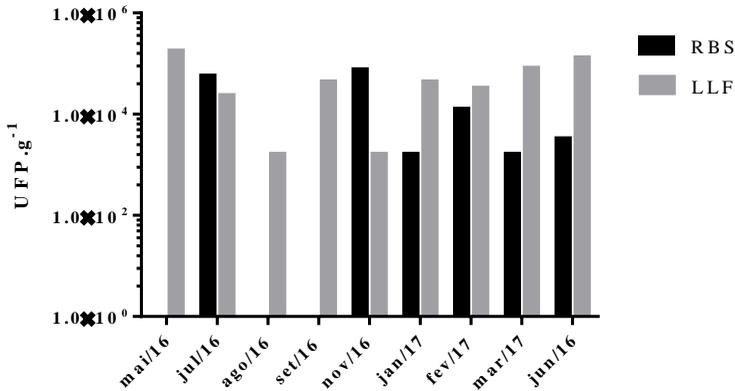
**Tabela 7.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de fagos RNA macho-específico e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo RBS e LLF.

	Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
<b>Lodo RBS</b>	Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,30
	Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,00
	Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,13
	Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	-0,29
	pH	não (p>0,05)	-0,02
	Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
<b>LLF</b>	Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,06
	Teor de STV (%)	não (p>0,05)	-0,01
	Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,05
	pH	não (p>0,05)	-0,04

Com relação aos HAdV, no lodo RBS, obteve-se uma detecção média de  $2,55 \times 10^4$  ( $\pm 6,00 \times 10^4$ ) UFP.g<sup>-1</sup> e concentrações que variaram entre  $1,64 \times 10^3$  e  $7,65 \times 10^4$  UFP.g<sup>-1</sup>. Nos meses de mai/16, jun/16, set/16 e nov/16, não foram detectados HAdV infecciosos, uma vez que a concentração ficou abaixo do limite de detecção da técnica ( $10^2$  UFP), como mostrado na **Figura 24**.

Para o LLF, registrou-se uma detecção média de  $5,98 \times 10^4$  ( $\pm 6,01 \times 10^4$ ) UFP.g<sup>-1</sup> e concentrações variando entre  $1,64 \times 10^3$  e  $1,78 \times 10^5$  UFP.g<sup>-1</sup>, **Figura 24**. Dong, Kim e Lewis (2010) encontraram concentrações similares de HAdV, as quais variavam entre  $10^3$  e  $10^5$  UFP.g<sup>-1</sup>.

**Figura 24.** Quantificação de HAdV no lodo RBS e LLF durante o período de monitoramento dos sistemas.



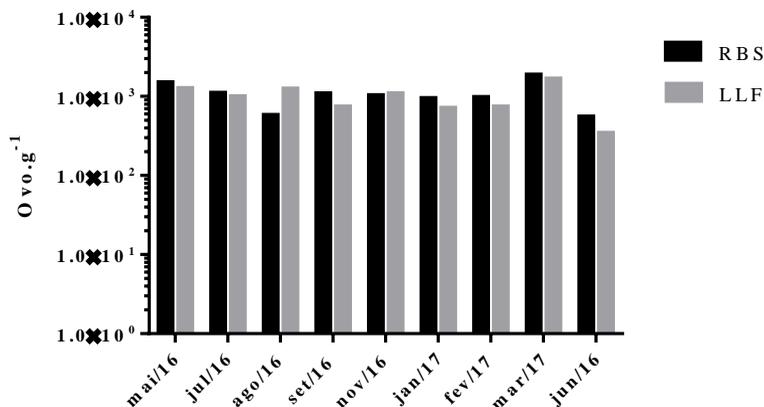
Diante disso, a partir dos resultados obtidos, não foram encontradas correlações significativas entre as concentrações de HAdV infecciosos e os parâmetros avaliados, **Tabela 8**. Os adenovírus são um vírus não envelopado e possuem genoma DNA dupla-fita, utilizando a maquinaria da célula hospedeira para o seu reparo, e ele também possui a capacidade de agregação a partículas em suspensão e também entre si, o que acarreta em proteção contra os fatores externos (GERBA; GRAMOS; NWACHUKU, 2002; FONG; LIPP, 2005; CARRATALÀ et al., 2013).

**Tabela 8.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de HAdV infecciosos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo RBS e LLF.

	Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Lodo RBS	Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,39
	Teor de STV (%)	não (p>0,05)	-0,38
	Temperatura (°C)	não (p>0,05)	-0,25
	Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	-0,32
	pH	não (p>0,05)	0,02
LLF	Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,03
	Teor de STV (%)	não (p>0,05)	-0,09
	Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,01
	pH	não (p>0,05)	-0,14

Quanto aos ovos de *Ascaris lumbricoides*, no lodo RBS, obteve-se uma detecção média de  $1,07 \times 10^3$  ( $\pm 4,12 \times 10^2$ ) Ovo.g<sup>-1</sup>, variando entre  $5,52 \times 10^2$  e  $1,87 \times 10^3$  Ovo.g<sup>-1</sup>. Para o LLF, obteve-se uma detecção média de  $1,07 \times 10^3$  ( $\pm 4,12 \times 10^2$ ) Ovo.g<sup>-1</sup>, variando entre  $5,52 \times 10^2$  e  $1,87 \times 10^3$  Ovo/g **Figura 25**. Estes resultados vão ao encontro do registrado por Tonani et al. (2010), os quais registraram em Ribeirão Preto-SP (Brasil), uma concentração de  $4,50 \times 10^3$  Ovo.g<sup>-1</sup> em um lodo tratado em reator biológico. No mesmo estudo, ainda se relata para o esgoto não tratado, uma concentração de  $6,17 \times 10^3$  Ovo.g<sup>-1</sup>.

**Figura 25.** Quantificação de ovos de *Ascaris lumbricoides* no lodo RBS e LLF durante o período de monitoramento dos sistemas.



Após as quantificações de ovos de *Ascaris lumbricoides* no lodo RBS e LLF, foram realizadas análises e comparações entre as concentrações do patógeno encontrado e os parâmetros físico-químicos, não sendo encontradas correlações significativas, como apresentado na **Tabela 9**.

**Tabela 9.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de ovos de *Ascaris lumbricoides* e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo RBS e LLF.

	Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
<b>Lodo RBS</b>	Teor de ST (%)	não (p>0,05)	-0,13
	Teor de STV (%)	não (p>0,05)	-0,30
	Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,34
	Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	0,00
	pH	não (p>0,05)	-0,04
	Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
<b>LLF</b>	Teor de ST (%)	não (p>0,05)	-0,27
	Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,19
	Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,00
	pH	não (p>0,05)	-0,13

#### 4.2.4 Desaguamento de lodo e remoção de patógenos no WCL em operação

##### 4.2.4.1 Desaguamento do lodo

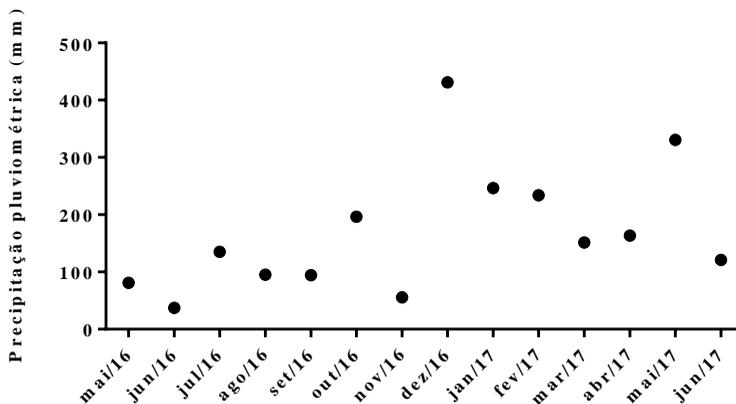
O LP é um dos subprodutos gerados nos WCL, após a alimentação do sistema com o lodo. Após a alimentação ocorre o desaguamento devido à percolação da fração líquida no material filtrante presente no WCL, sendo esta coletada por uma tubulação assentada na base do sistema e armazenada em reservatório, **Tabela 10**. O LP permanece neste reservatório até alcançar o nível do acionamento da bomba de recirculação, sendo então recalcado para a ETE.

O volume de LP gerado diariamente no WCL foi de aproximadamente 13,32 m<sup>3</sup>, **Tabela 10**. Por meio do balanço hídrico foi possível determinar o volume médio de LP perdido pelo processo de evapotranspiração e retido no leito do filtro, sendo este de 60% em média.

A precipitação pluviométrica também afeta a dinâmica de desaguamento do lodo, sendo observado um volume de chuva de 2,38 m<sup>3</sup> durante o período de monitoramento. Pôde-se observar um volume que variou entre 37,20 mm (jun/16) e 431,20 mm (dez/16) (**Figura 26**).

Cabe ressaltar que os valores aqui apresentados são uma estimativa, tendo em vista que a dinâmica de desaguamento de lodo varia bastante em função da temperatura e do nível de colmatção do filtro.

**Figura 26.** Dados da precipitação pluviométrica acumulada mensalmente durante o período de monitoramento dos sistemas.



**Tabela 10.** Dimensões do tanque de armazenamento do LP e média diária do volume de líquido percolado produzido.

Diâmetro do poço (m)	1,00
Altura do poço (m)	2,00
Volume de recalque (m <sup>3</sup> )	1,57
Tempo de funcionamento da bomba (min)	45
nº de acionamentos por dia	10
Vazão da bomba (m <sup>3</sup> /h)	2,00
Volume médio circulado por dia (m <sup>3</sup> )	13,32

**Tabela 11.** Caracterização dos sólidos do LP e o lodo de alimentação.

Amostras (n=9)	Dados	Parâmetros físico-químicos				
		pH	ST (mg.L <sup>-1</sup> )	ST (%)	STV (%)	STF (%)
Lodo de alimentação	Média	6,81	9498	1	33	67
	DP	0,26	8984	1	10	10
LP	Média	7,12	279	-	85	15
	DP	0,58	252	-	13	13

Na **Tabela 11** estão dispostos os resultados obtidos referentes aos parâmetros físico-químicos realizados para o LP (saída), bem como para o lodo de alimentação (entrada – média ponderada entre o lodo RBS e LLF).

Quanto ao pH encontrado no LP, pode-se observar que ele se manteve na faixa da neutralidade ( $7,12 \pm 0,58$ ) assim como o lodo de alimentação ( $6,81 \pm 0,26$ ).

O LP apresentou em média  $279 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $\pm 252 \text{ mg.L}^{-1}$ ), com valores variando entre  $53 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $610 \text{ mg.L}^{-1}$  de ST, sendo inferior ao registrado no lodo de alimentação,  $9498 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $\pm 8984 \text{ mg.L}^{-1}$ ), tendo se observado uma remoção de ST de até 97%.

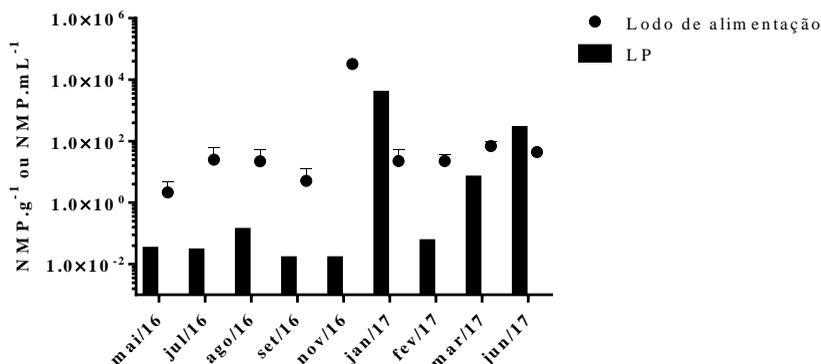
#### 4.2.4.2 Redução de microrganismos patogênicos

A fim de se avaliar a eficiência da remoção dos biomarcadores utilizados neste estudo e tratados no WCL, realizou-se uma comparação entre o lodo de alimentação e o LP.

#### Redução de *Salmonella* spp.

No LP, obteve-se uma detecção média de  $4,45 \times 10^2$  ( $\pm 1,24 \times 10^3$ ) NMP.mL<sup>-1</sup>, variando entre  $3,12 \times 10^{-2}$  e  $3,73 \times 10^3$  NMP.mL<sup>-1</sup>. Para o lodo de alimentação, registrou-se uma quantificação média de  $3,62 \times 10^3$  NMP.g<sup>-1</sup>, com variações entre 2,09 e  $3,24 \times 10^3$  NMP.g<sup>-1</sup>, como mostrado na **Figura 27**. Deste modo, ocorreu a redução de  $0,74 \log_{10}$  de *Salmonella* spp. no LP.

**Figura 27.** Quantificação de *Salmonella* spp. no LP e lodo de alimentação durante o período de monitoramento do sistema.



A partir dos resultados obtidos, não foram encontradas correlações significativas entre as concentrações de *Salmonella* spp. e os parâmetros físico-químicos, como mostra a **Tabela 12**.

**Tabela 12.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de *Salmonella* spp. e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo RBS.

Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	-0,20
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,19
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,07
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	0,00
pH	não (p>0,05)	0,08

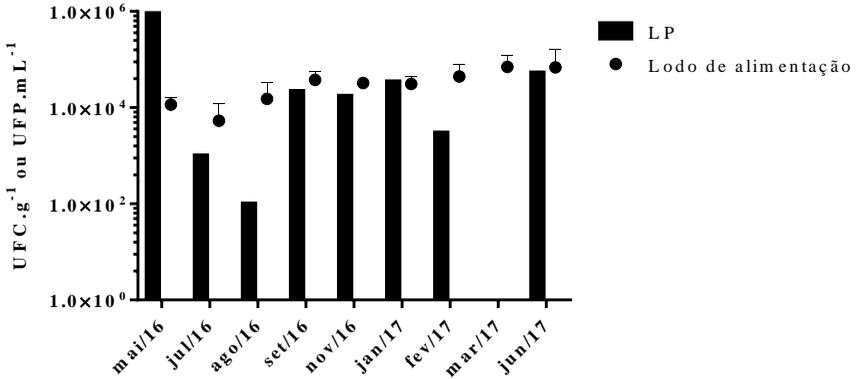
### Redução de *E. coli*

No LP, foi detectado em média de  $1,31 \times 10^5 (\pm 3,19 \times 10^5)$  UFC.mL<sup>-1</sup>, variando entre  $1,00 \times 10^2$  e  $9,20 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Para o lodo de alimentação, registrou-se uma concentração média de  $3,53 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup>, variando entre  $5,33 \times 10^3$  e  $7,07 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>, como mostrado na **Figura 28**, sendo registrada uma redução de  $1,13 \log_{10}$  de *E. coli*. Uggetti et al. (2012), sob condições experimentais de tratamento de

lodo em WC, obteve a redução de  $0,66\log_{10}$  de *E. coli* em três meses de tratamento.

**Figura 28.** Quantificação de *E. coli* no LP e lodo de alimentação durante o período de monitoramento do sistema.



Não foram encontradas correlações significativas entre as concentrações da bactéria no LP e os parâmetros físico-químicos analisados, como apresentado na **Tabela 13**.

**Tabela 13.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de *E.coli* e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo LP.

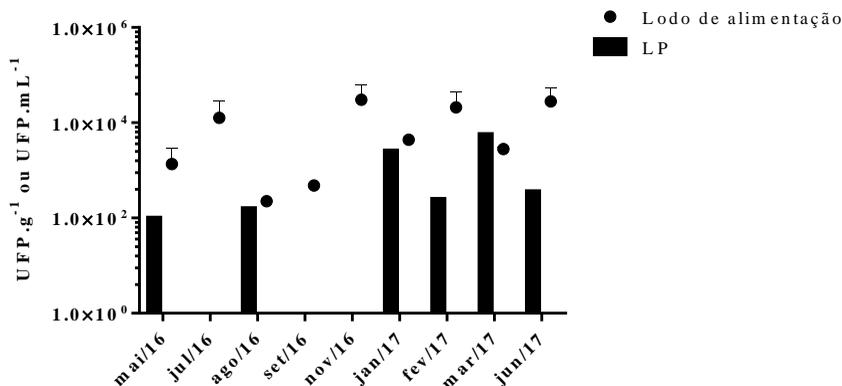
Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,27
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,31
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,01
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	0,05
pH	não (p>0,05)	-0,04

### Redução de colifagos somáticos e fagos RNA macho-específicos

No LP, foi detectado em média de  $1,55 \times 10^3 (\pm 2,26 \times 10^3)$  UFP.mL<sup>-1</sup>, variando entre  $1,00 \times 10^2$  e  $5,70 \times 10^3$  UFP.mL<sup>-1</sup>. Nos meses de ago/16, set/16 e jan/17, as detecções não puderam ser realizadas, uma vez que a concentração de colifagos somáticos ficou abaixo do limite de detecção da técnica (10 UFP.mL<sup>-1</sup>).

Para o lodo de alimentação, registrou-se uma concentração média de  $1,13 \times 10^4$  ( $\pm 1,22 \times 10^4$ ) UFP.g<sup>-1</sup>, variando entre  $2,00 \times 10^2$  e  $3,04 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>, como mostrado na **Figura 29**, sendo registrado deste modo, a redução de  $0,79 \log_{10}$  de colifagos somáticos

**Figura 29** Quantificação de colifagos somáticos no LP e lodo de alimentação durante o período de monitoramento do sistema.



Registrou-se uma correlação positiva significativa ( $R^2=0,43$ ) entre os colifagos somáticos e a temperatura ( $p>0,05$ ), **Tabela 14**, indicando que o aumento das temperaturas influenciou no aumento da concentração do bacteriófago, isto pode estar relacionado ao fato de temperaturas superiores a  $30^\circ\text{C}$  influenciarem no crescimento da comunidade microbiana, promovendo deste modo o crescimento de bactérias hospedeiras aumentando a taxa de replicação do bacteriófago (PUSSAYANAVIN et al., 2014).

Outra correlação positiva significativa ( $R^2=0,67$ ) foi encontrada entre as concentrações de colifagos somáticos e a precipitação pluviométrica acumulada, onde o aumento do volume de precipitação influenciou no aumento da concentração de colifagos somáticos no LP, mesmo promovendo a diluição do efluente. Isto pode se dar ao fato de a precipitação auxiliar no processo de lixiviação, carregando o bacteriófago pelo material filtrante do sistema.

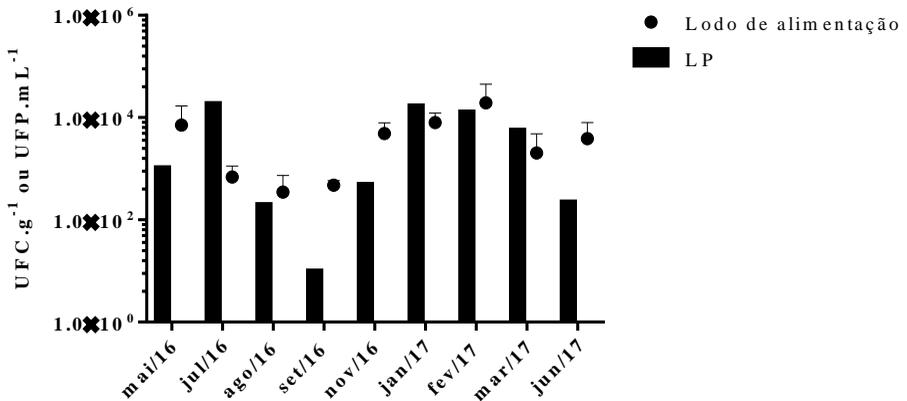
**Tabela 14.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de colifagos somáticos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do LP.

Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,19
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,11
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,43
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	0,67
pH	não (p>0,05)	0,09

Quanto aos fagos RNA f-específicos, no LP, obteve-se uma detecção média de  $6,30 \times 10^3 (\pm 7,87 \times 10^3)$  UFP.mL<sup>-1</sup> e concentrações que variaram entre  $1,00 \times 10$  e  $1,90 \times 10^4$  UFP.mL<sup>-1</sup>. Para o lodo de alimentação, registrou-se uma concentração média de  $3,62 \times 10^3 (\pm 6,04 \times 10^3)$  UFP.mL<sup>-1</sup>, variando entre  $3,48 \times 10^2$  e  $1,94 \times 10^4$  UFP.mL<sup>-1</sup>, como mostrado na **Figura 30**. Diante destes resultados, obteve-se uma redução de  $1,02 \log_{10}$  de fagos RNA macho-específico.

Observa-se que o comportamento dos dois bacteriófagos foi semelhante no sistema, com reduções próximas (0,79 e 1,02 unidades logarítmicas).

**Figura 30.** Quantificação de fagos RNA macho-específico no LP e lodo de alimentação durante o período de monitoramento do sistema.



Não foram observadas correlações significativas entre os parâmetros analisados e as concentrações de fagos RNA macho-específico no LP, **Tabela 15**.

**Tabela 15.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de fagos RNA macho-específico e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do LP.

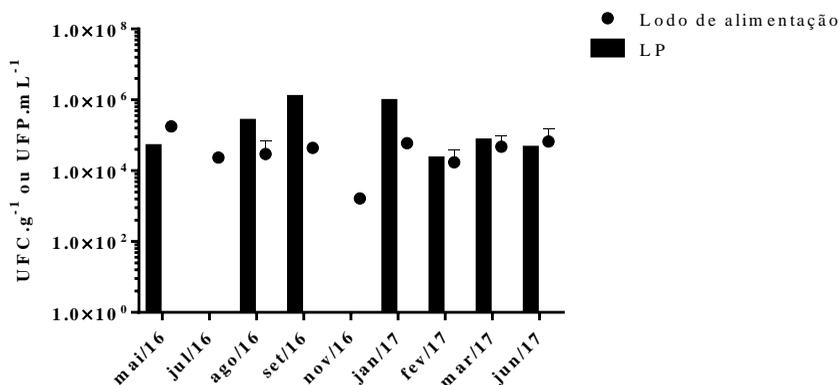
Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,11
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,33
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,23
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	0,01
pH	não (p>0,05)	-0,03

### Redução de HAdV infecciosos

No LP, obteve-se uma detecção média de  $3,66 \times 10^5 (\pm 4,87 \times 10^5)$  UFP.mL<sup>-1</sup> e concentrações que variaram entre  $2,19 \times 10^4$  e  $1,20 \times 10^6$  UFP.mL<sup>-1</sup>. Nos meses de jul/16 e nov/16, não foram detectados HAdV infecciosos, uma vez que a concentração permaneceu abaixo do limite de detecção da técnica ( $10^2$  UFP.mL<sup>-1</sup>).

Para o lodo de alimentação, registrou-se uma concentração média de  $5,26 \times 10^4 (\pm 4,86 \times 10^4)$  UFP.mL<sup>-1</sup>, variando entre  $1,64 \times 10^3$  e  $1,78 \times 10^5$  UFP.mL<sup>-1</sup>, como mostrado na **Figura 31**. Diante destes resultados, obteve-se uma redução de  $1,18 \log_{10}$  de HAdV infecciosos.

**Figura 31.** Quantificação de HAdV infecciosos no LP e lodo de alimentação durante o período de monitoramento do sistema.



A partir dos resultados obtidos, não foram encontradas correlações significativas entre os parâmetros analisados e as concentrações de HAdV infecciosos no LP, **Tabela 16**, indo ao encontro ao já relatado na literatura quanto à pouca influência de fatores ambientais, como alterações de temperatura e pH, na estabilidade dos HAdV, devido à ausência de envelope lipoproteico (GERBA; GRAMOS; NWACHUKU, 2002; FONG; LIPP, 2005; CARRATALÀ et al., 2013).

**Tabela 16.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de HAdV infecciosos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do LP.

Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,37
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,23
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	-0,05
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	-0,01
pH	não (p>0,05)	0,00

Os HAdV são amplamente utilizados como modelos de vírus entéricos como biomarcadores de contaminação fecal em diferentes matrizes ambientais, isto devido as suas características de resistência frente as condições adversas e alterações de parâmetros físico-químicos, evidenciados também por este estudo (FONGARO et al., 2016; ZHU et al., 2018). Todavia, os bacteriófagos têm se mostrado bons substitutos destes vírus, uma vez que também são considerados bons biomarcadores por terem características similares aos vírus entéricos, incluindo os HAdV (MATTLE; VIONE; KOHN, 2014; MAGRI et al., 2015). Ainda neste sentido, as técnicas de quantificação de HAdV são mais dispendiosas e laboriosas quando comparadas às quantificações dos bacteriófagos.

Neste estudo, foi possível observar a semelhança no comportamento entre os HAdV e os bacteriófagos (p>0,05), embora as concentrações de HAdV fossem sempre superiores aos colifagos somáticos e fagos RNA macho-específico, o comportamento apresentado entre eles foi semelhante durante todo o monitoramento do sistema. Com relação à remoção, HAdV e fagos RNA macho-específico foram semelhantes, com cerca de 1,02log<sub>10</sub>, enquanto os colifagos somáticos apresentaram uma menor redução (0,79log<sub>10</sub>). Diante destes resultados, podemos aqui sugerir que os bacteriófagos têm potencial para ser

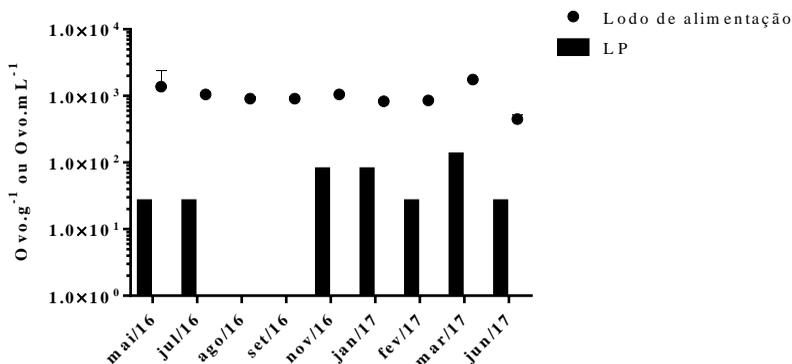
indicados como substitutos dos HAdV em avaliações de sistemas de tratamento, sendo que os fagos RNA macho-específico apresentaram a maior semelhança em termos de comportamento e remoção.

### Redução de ovos de *Ascaris lumbricoides*

Obteve-se uma detecção média no LP de  $7,89 \times 10$  ( $\pm 6,40 \times 10$ ) ovo.mL<sup>-1</sup>, variando entre  $2,63 \times 10$  e  $2,10 \times 10^2$  ovos.mL<sup>-1</sup>. Para o lodo de alimentação, registrou-se uma concentração média de  $1,02 \times 10^3$  ( $\pm 3,92 \times 10^2$ ) ovos.g<sup>-1</sup>, com variações entre  $4,47 \times 10^2$  e  $1,76 \times 10^3$  ovos.g<sup>-1</sup>, como mostrado na **Figura 32**.

Diante destes resultados, obteve-se uma redução de  $0,58 \log_{10}$  de ovos de *Ascaris lumbricoides*, referente a contagem total, uma vez que não foi possível classifica-los em ovos viáveis, férteis e inférteis.

**Figura 32.** Quantificação de ovos de *Ascaris lumbricoides* no LP e lodo de alimentação durante o período de monitoramento do sistema.



A partir dos resultados obtidos, não foram encontradas correlações significativas entre os parâmetros analisados e a concentração de ovos de *Ascaris lumbricoides* no LP, dispostos na **Tabela 17**. Estes resultados confirmam o relatado na literatura, onde os ovos do gênero *Ascaris* são considerados bons marcadores de contaminação fecal devido a sua resistência contra fatores de inativação, uma vez que sua estrutura é composta por três membranas (lipídica, quitinosa e proteica), formando deste modo uma barreira contra os agentes de inativação (CAPIZZI; SCHWARTZBROD, 2001; USEPA 2003).

**Tabela 17.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de ovos de *Ascaris lumbricoides* e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do LP.

Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	-0,22
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,09
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,02
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	0,13
pH	não (p>0,05)	0,00

## 5.2.5 Caracterização do lodo acumulado do WCL em operação

### 5.2.5.1 Caracterização físico-química

Na **Tabela 18** estão dispostos os resultados obtidos referentes aos parâmetros físico-químicos realizados para o lodo acumulado, presente no filtro WCL.

**Tabela 18.** Caracterização físico-química do lodo acumulado do filtro WCL.

Dados	Parâmetros físico-químicos					
	pH	ST (%)	ST (g.kg <sup>-1</sup> )	STV (g.kg <sup>-1</sup> )	P-PO <sub>4</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>4</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> )
<b>Média</b>	6,99	26	258	54	62	680
<b>DP</b>	0,22	2	131	26	69	252

Quanto ao pH encontrado no filtro WCL pode-se observar um pH médio de 6,99 ( $\pm 0,22$ ), variando entre 6,14 e 7,62.

A concentração de ST no lodo acumulado apresentou em média 258 g.kg<sup>-1</sup> ( $\pm 131$  g.kg<sup>-1</sup>). Para os STV, registrou-se uma concentração média de 54 g.kg<sup>-1</sup> ( $\pm 26$  g.kg<sup>-1</sup>).

A fim de se determinar o grau de mineralização dos sólidos presentes no lodo acumulado, realizou-se a relação STV:ST, obtendo como resultado 0,20, o que o caracteriza como lodo com baixa estabilidade em termos das frações orgânicas. Esta condição é condizente com a fase operacional do WCL, o qual recebe lodo fresco quase diariamente.

Não foram encontradas correlações significativas entre as variáveis de precipitação e temperatura, e a concentração de sólidos no lodo (**Tabela 19**).

**Tabela 19.** Correlação de *Pearson* entre os teores de ST e SV, bem como para os parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do filtro WCL 2.

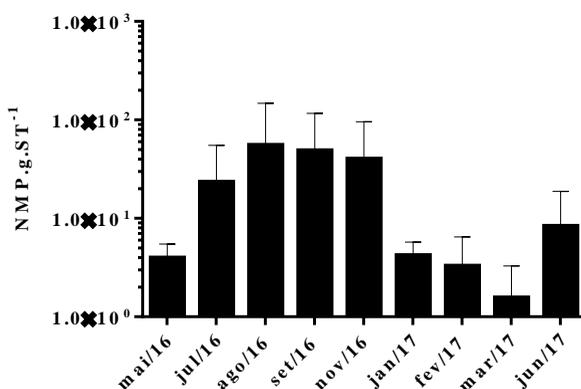
Parâmetros	Teor de ST (%)		Teor de STV (%)	
	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	0,01	não (p>0,05)	0,29
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,07	não (p>0,05)	0,07

Para o material nitrogenado, verificou-se uma concentração de 680 mg.kg<sup>-1</sup> (±252) presente no lodo acumulado, variando entre 175 e 331 mg.kg<sup>-1</sup>. Quanto ao fósforo-ortofosfato, registrou-se uma concentração média de 62 (±69) mg.kg<sup>-1</sup>.

#### 4.2.5.2 Caracterização microbiológica

No lodo acumulado, obteve-se uma detecção média de *Salmonella* de 2,10×10 (±2,17×10) NMP.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre 1,56 e 5,55×10 NMP.g<sup>-1</sup> (**Figura 33**).

**Figura 33.** Quantificação de *Salmonella* spp. no lodo acumulado do filtro WCL durante o período de monitoramento do sistema.



Pode-se observar na **Figura 33** a ocorrência de crescimento da *Salmonella* spp. nos primeiros cinco meses de monitoramento, seguindo

por um decaimento linear (janeiro, fevereiro e março de 2017). O decaimento observado pode ter sido uma variação de amostragem, tendo em vista o tamanho do sistema, ou ainda um decaimento verdadeiro ocorrido pelo aumento da competição por nutrientes no sistema, bem como predação por outros microrganismos (MANDI et al., 1993; (KARIM; GLENN; GERBA, 2008), ou ainda fatores físico-químicos que não puderam ser identificados.

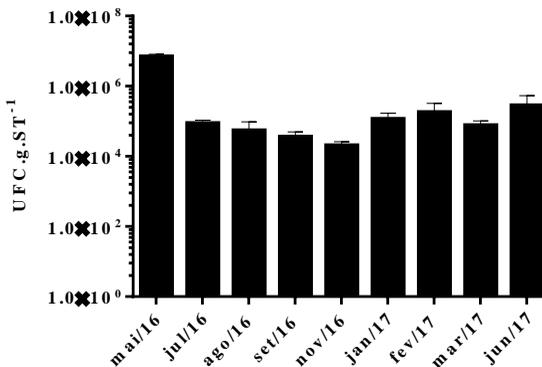
Entre as concentrações de *Salmonella* spp. e os parâmetros físico-químicos monitorados, não foram encontradas correlações significativas, como apresentado na **Tabela 20**.

**Tabela 20.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de *Salmonella* spp. e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado no filtro WCL.

Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	-0,22
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,10
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	-0,26
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	-0,02
pH	não (p>0,05)	0,01

Com relação à *E.coli*, obteve-se uma detecção média de  $8,72 \times 10^5$  ( $\pm 2,30 \times 10^6$ ) UFC.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre  $2,05 \times 10^4$  e  $7,00 \times 10^6$  UFC.g.ST<sup>-1</sup> no lodo acumulado do filtro WCL **Figura 34**.

**Figura 34.** Quantificação de *E. coli* no lodo acumulado do filtro WCL durante o período de monitoramento.



Da mesma forma como detectado para a bactéria *Salmonella* spp., não foram encontradas correlações significativas entre *E.coli* e os parâmetros físico-químicos avaliados, como apresentado na **Tabela 21**.

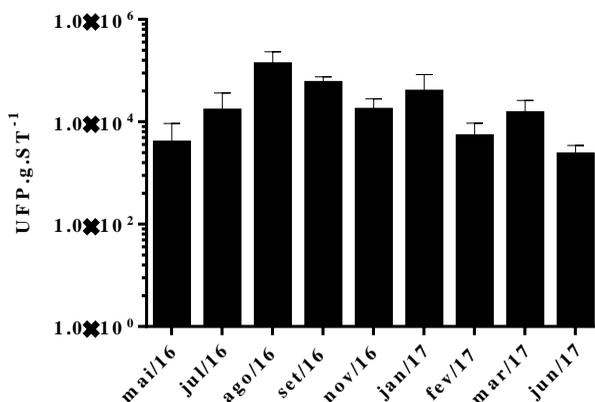
**Tabela 21** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de *E. coli* e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL.

Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,04
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,09
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	-0,17
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	-0,01
pH	não (p>0,05)	0,00

Com relação à colifagos somáticos, obteve-se uma detecção média de  $3,16 \times 10^4$  ( $\pm 4,12 \times 10^4$ ) UFP.g.ST<sup>-1</sup> variando entre  $2,29 \times 10^3$  e  $1,31 \times 10^5$  UFP.g.ST<sup>-1</sup> no lodo acumulado do sistema **Figura 35**.

Os resultados das quantificações foram superiores ao relatado por Ulrich et al. (2005), os quais registraram uma concentração média de colifagos somáticos de  $2,60 \times 10^4$  UFP.g<sup>-1</sup>.

**Figura 35.** Quantificação de colifagos somáticos no lodo acumulado do filtro WCL durante o período de monitoramento.



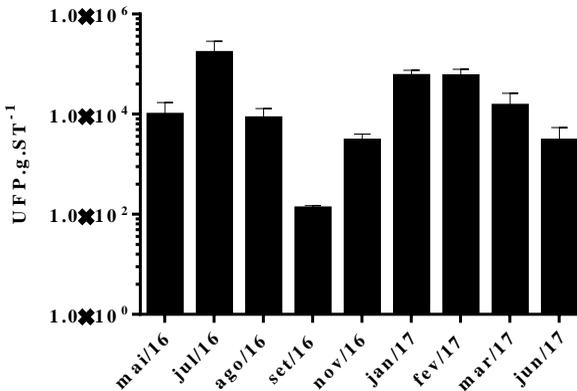
A partir dos resultados obtidos, não foram encontradas correlações significativas entre os parâmetros físico-químicos, como mostra a **Tabela 22**.

**Tabela 22.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de colifagos somáticos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL.

Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não ( $p > 0,05$ )	-0,19
Teor de STV (%)	não ( $p > 0,05$ )	-0,10
Temperatura (°C)	não ( $p > 0,05$ )	-0,08
Precipitação pluviométrica (mm)	não ( $p > 0,05$ )	0,00
pH	não ( $p > 0,05$ )	-0,02

Com concentrações um pouco inferiores aos colifagos somáticos, obteve-se uma média de  $3,53 \times 10^4$  ( $\pm 5,36 \times 10^4$ ) UFP.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre  $1,30 \times 10^2$  e  $1,65 \times 10^5$  UFP.g.ST<sup>-1</sup> para os fagos RNA macho-específico no lodo acumulado. **Figura 36.**

**Figura 36.** Quantificação de fagos RNA macho-específico no lodo acumulado do filtro WCL.



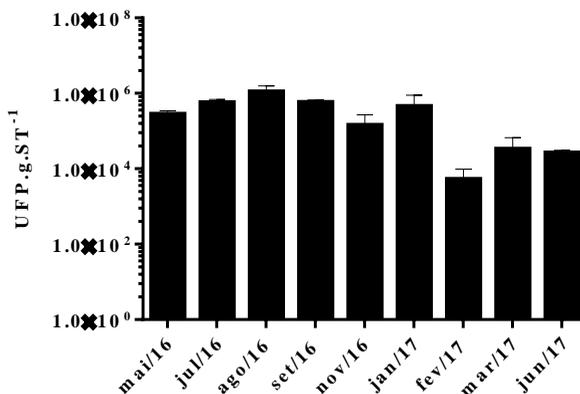
Entre os fagos RNA macho-específico e os parâmetros físico-químicos também não foram encontradas correlações significativas entre as variáveis físico-químicas monitoradas, como disposto na **Tabela 23.**

**Tabela 23.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de fagos RNA macho-específico e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL.

Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,01
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,00
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,08
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	0,05
pH	não (p>0,05)	-0,32

Com relação ao monitoramento de vírus entéricos realizado, obteve-se uma detecção média de  $3,56 \times 10^5$  ( $\pm 3,64 \times 10^5$ ) UFP.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre  $5,31 \times 10^3$  e  $1,11 \times 10^6$  UFP.g.ST<sup>-1</sup> no lodo acumulado **Figura 37**.

**Figura 37.** Quantificação de HAdV no lodo acumulado do filtro WCL durante o período de monitoramento dos sistemas.



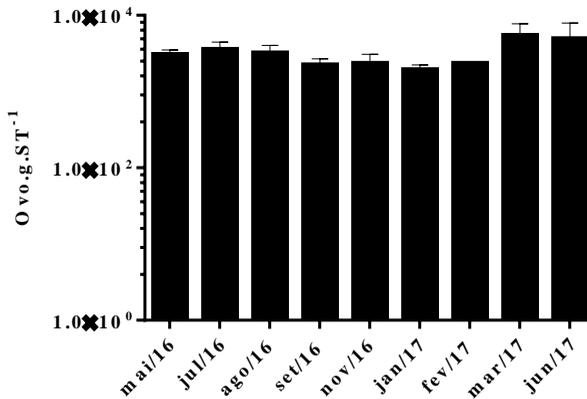
Semelhante ao detectado para os outros vírus (bacteriófagos), não foram encontradas correlações significativas entre as concentrações de HAdV e os parâmetros físico-químicos monitorados, como apresentado na **Tabela 24**.

**Tabela 24.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de HAdV infecciosos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL.

Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	-0,33
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	-0,23
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	-0,09
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	-0,08
pH	não (p>0,05)	0,00

Com relação ao monitoramento de ovos de *Ascaris lumbricoides*, obteve-se uma detecção média de  $3,25 \times 10^3$  ( $\pm 1,24 \times 10^3$ ) ovo.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre  $1,15 \times 10^5$  e  $6,90 \times 10^5$  ovo.g.ST<sup>-1</sup> no lodo acumulado **Figura 38**.

**Figura 38.** Quantificação de ovos de *Ascaris lumbricoides* no lodo acumulado do filtro WCL e lodo de alimentação.



A partir dos resultados obtidos, não foram observadas correlações significativas entre os ovos de *Ascaris lumbricoides* e parâmetros físico-químicos, **Tabela 25**.

**Tabela 25.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de ovos viáveis de *Ascaris lumbricoides* e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL.

Parâmetros	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,21
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,11
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	-0,09
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	0,39
pH	não (p>0,05)	-0,38

Pôde-se observar por meio do monitoramento microbiológico, que o comportamento dos patógenos e bioindicadores foram semelhantes em termos de estabilidade ao longo do período, o que era esperado, tendo em vista o constante recebimento de lodo fresco no sistema, que se encontra em operação. As condições de baixa estabilidade e baixa secagem do lodo, como descrito no **Item 4.2.5.1**, não são propícias para inativação de microorganismos patogênicos.

Observa-se também, além do comportamento semelhante, as concentrações semelhantes entre os bacteriófagos e os vírus entéricos avaliados, adenovírus, o que reitera o uso dos primeiros como bons indicadores da presença e persistência dos vírus entéricos no sistema.

### 4.3 Filtro WCL 1 em etapa de repouso

O filtro WCL1 foi alimentado durante 10 anos, com algumas interrupções, entrando na etapa de repouso em fevereiro de 2016.

Para o perfil superficial, as coletas em mar/17 e jun/17 não foram realizadas devido ao alto índice de precipitação pluviométrica.

#### 4.3.1 Caracterização físico-química do lodo acumulado

Na **Tabela 26** estão dispostos os resultados obtidos referentes aos parâmetros físico-químicos realizados para o lodo acumulado, presente no filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.

**Tabela 26.** Caracterização físico-química do lodo acumulado do filtro WCL 1.

Amostras (n=9)	Dados	Parâmetros físico-químicos					
		pH	ST (%)	ST (g.kg <sup>-1</sup> )	STV (%)	P-PO <sub>4</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>4</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> )
WCL 1 Superficial	Média	7,08	17	168	33	63	419
	DP	0,57	6	55	9	25	227
WCL 1 Profundo	Média	6,95	17	167	32	77	740
	DP	0,56	6	55	12	48	219

A partir dos resultados obtidos, o lodo acumulado do perfil superficial é levemente mais básico ( $7,08 \pm 0,57$ ) quando comparado ao lodo do perfil profundo ( $6,95 \pm 0,56$ ). Deste modo, entre os perfis foi possível observar uma correlação positiva significativa ( $R^2=0,98$ ), indicando que o aumento do pH do perfil superficial, influencia no aumento do pH do perfil profundo, o que reitera a mudança gradual que ocorre verticalmente de acordo com a idade do lodo.

No perfil superficial ( $p < 0,05$ ), detectou-se um teor médio de ST de  $168 \text{ g.kg}^{-1}$  ( $\pm 55 \text{ g.kg}^{-1}$ ), variando entre 65 e  $286 \text{ g.kg}^{-1}$ . Para o perfil profundo ( $p < 0,05$ ), pôde-se observar também uma concentração média de  $167 \text{ g.kg}^{-1}$  ( $\pm 55 \text{ g.kg}^{-1}$ ), com variações entre 84 e  $284 \text{ g.kg}^{-1}$ . Os perfis apresentaram também semelhança quanto aos percentuais de ST de 17% ( $p < 0,05$ ). Este percentual de ST pode ser considerado baixo se considerarmos o elevado percentual de secagem dos WCL. Outros trabalhos com períodos de repouso semelhantes atingiram percentuais em torno de 60% de ST, como descrito em Kafer (2015) e Magri et al. (2016), observando-se que nos trabalhos citados as condições climáticas eram muito semelhantes, no entanto as taxas de aplicação de sólidos eram mais elevadas e os sistemas de menor escala. Supõe-se que as condições dos

trabalhos citados eram mais desfavoráveis ao desaguamento, no entanto, a secagem de lodo alcançada foi bem superior. Uma diferença importante que deve ser apontada, e que pode ter sido um importante fator, foram as taxas hidráulicas e o regime de alimentação dos sistemas. No sistema em estudo as rotinas de alimentação ocorriam no mínimo durante 5 dias por semana consecutivos, em média 3 vezes ao dia, enquanto nos sistemas descritos por Kafer e Magri, a alimentação ocorria 1 dia por semana 1 vez ao dia, com seis dias de repouso. Reitera-se que a rotina operacional realizada pelos autores é recomendada na bibliografia especializada (KOOTTATEP, 2005; NIELSEN et al., 2005; UGETI et al., 2009).

Com relação ao teor de STV, para o perfil superficial ( $p < 0,05$ ) registrou-se um teor médio de 33% ( $\pm 9\%$ ), o qual variou entre 21 e 47%. No perfil profundo, registrou-se um teor médio de 32% ( $\pm 12\%$ ), variando entre 16 e 52%, sendo o maior teor registrado nos meses de mai/16 e jul/16.

A fim de se determinar a estabilização dos sólidos presentes no lodo acumulado do filtro WCL 1 para o perfil superficial e perfil profundo, realizou-se a relação STV:ST obtendo como resultado uma relação média de 0,31 e 0,32, respectivamente, estando em conformidade com a resolução nº 375/2006 do CONAMA, sendo apto para o reuso em termos de estabilidade.

Não foram encontradas correlações significativas entre os percentuais de ST e STV e os parâmetros ambientais monitorados, indicando que as variações observadas não ocorreram em decorrência da influência dos mesmos, como mostrado na **Tabela 27**.

Comparando-se o lodo acumulado do WCL 1 (em repouso) e do WCL em operação (**Item 4.2.5.1**), pode-se observar a importância da fase de repouso no processo de estabilização das frações orgânicas do lodo, as quais sofreram redução. No entanto, como já mencionado, a secagem do lodo com a redução de ST não apresentou melhoras quando comparado ao sistema em operação.

**Tabela 27.** Correlação de *Pearson* entre os teores de ST e STV, bem como para os parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.

	Parâmetros	Teor de ST (%)		Teor de STV (%)	
		Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Superficial	Teor de ST (%)	não (p>0,05)	-0,21	não (p>0,05)	-0,29
	Teor de STV (%)	não (p>0,05)	-0,19	não (p>0,05)	-0,11
	Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	-0,18	não (p>0,05)	-0,04
	pH	não (p>0,05)	0,00	não (p>0,05)	0,01
Profundo	Teor de ST (%)	não (p>0,05)	-0,12	não (p>0,05)	-0,25
	Teor de STV (%)	não (p>0,05)	-0,05	não (p>0,05)	-0,19
	Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	-0,39	não (p>0,05)	0,29
	pH	não (p>0,05)	0,01	não (p>0,05)	0,00

Com relação a matéria nitrogenada, registrou-se uma concentração média de 419 ( $\pm 227$ ) mg.kg<sup>-1</sup> para o perfil superficial, variando entre 208 e 680 mg.kg<sup>-1</sup>. No perfil profundo, registrou-se uma concentração média de 740 ( $\pm 219$ ) mg.kg<sup>-1</sup>, com variação entre 383 e 946 mg.kg<sup>-1</sup>. Observa-se que as transformações do nitrogênio amoniacal elevam as frações, principalmente de nitratos, em função da nitrificação. Observa-se também que as plantas assimilam este nitrogênio para seu crescimento e desenvolvimento, regulando a concentração deste nutriente em WC (KUMAR et al., 2014; DU; SHI; MA, 2015).

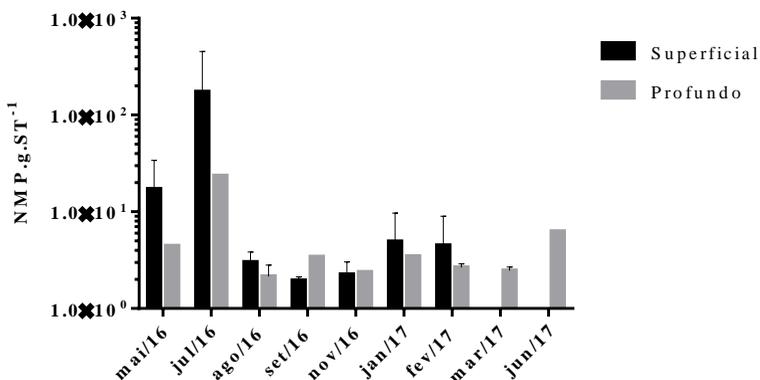
Para o fósforo-ortofosfato obteve-se uma concentração média de 63 mg.kg<sup>-1</sup> ( $\pm 25$ ) para o perfil superficial, variando entre 38 e 96 mg.kg<sup>-1</sup>. No perfil profundo, observou-se uma concentração média de 77 mg.kg<sup>-1</sup> ( $\pm 48$ ), a qual variou entre 19 e 140 mg.kg<sup>-1</sup>. Diversos autores relatam a absorção do fósforo pelos tecidos das macrófitas, nutriente importante para o crescimento e maturação das plantas por participar dos processos de fotossíntese, assim como parte dele permanece retida na camada saturada do WC, aumentando o valor nutricional do lodo acumulado para ser utilizado como fertilizante (GAGNON et al., 2013; KANG et al., 2017; LIMA et al., 2018).

### 4.3.2 Caracterização microbiológica do lodo acumulado no WCL 1

Registrou-se uma concentração média de *Salmonella* de  $2,95 \times 10$  ( $\pm 6,33 \times 10$ ) NMP.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre 1,94 e  $1,73 \times 10^2$  NMP.g.ST<sup>-1</sup> no perfil superficial. Para o perfil profundo se obteve uma média de  $5,63 \times 10$  ( $\pm 6,82 \times 10$ ) NMP.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre 2,15 e  $2,35 \times 10$  NMP.g.ST<sup>-1</sup>, como mostrado na **Figura 39**. As concentrações médias entre os perfis foram similares entre si ( $p < 0,05$ ).

Não existem dados de caracterização do lodo que foi utilizado na alimentação deste sistema ao longo dos anos, no entanto, tendo como referência as características do lodo de alimentação gerado atualmente na estação, e monitorado neste trabalho (**Item 4.2.3**), pode-se especular, para o perfil superficial e profundo, a redução de  $1,59 \log_{10}$  e  $0,58 \log_{10}$ , respectivamente. Hench et al. (2003) e Wu et al. (2016) relataram em seus estudos reduções variando entre 1,6 a  $2,3 \log_{10}$  em lodo acumulado de sistemas WC em um período de até dois anos.

**Figura 39.** Quantificação de *Salmonella* spp. no lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e durante o período de monitoramento do sistema.



A partir dos resultados obtidos, não foram observadas correlações significativas entre as concentrações de *Salmonella* spp. e os parâmetros físico-químicos, **Tabela 28**,

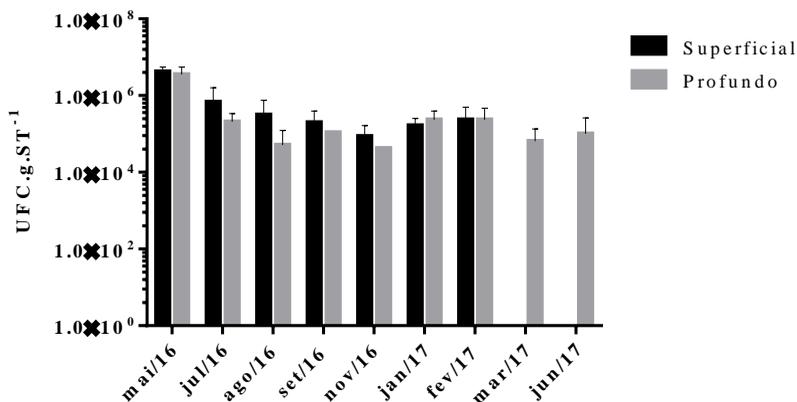
**Tabela 28.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de *Salmonella* spp. e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.

Parâmetros	Superficial		Profundo	
	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,21	não (p>0,05)	-0,21
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,39	não (p>0,05)	-0,14
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	-0,27	não (p>0,05)	-0,22
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	-0,35	não (p>0,05)	-0,09
pH	não (p>0,05)	0,00	não (p>0,05)	0,01

Com relação à bactéria *E.coli*, no perfil superficial, obteve-se uma detecção média de  $8,44 \times 10^5$  ( $\pm 1,51 \times 10^6$ ) UFC.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre  $8,60 \times 10^4$  e  $4,23 \times 10^6$  UFC.g.ST<sup>-1</sup>. Para o perfil profundo, registrou-se uma média de  $5,12 \times 10^5$  ( $\pm 1,15 \times 10^6$ ) UFC.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre  $4,21 \times 10^4$  e  $3,57 \times 10^6$  UFC.g.ST<sup>-1</sup>, como mostrado na **Figura 40**. As concentrações médias entre os perfis (p<0,05) foram similares entre si, apresentando um decaimento linear a partir do início do monitoramento (maio a agosto de 2016), seguido por um aumento e estabilidade da concentração até o final do monitoramento.

Tendo como referência novamente o lodo de alimentação monitorado neste trabalho, observou-se para o perfil superficial e profundo, a redução aproximada de 1,25 log<sub>10</sub> e 1,55 log<sub>10</sub>, respectivamente. Hench et al. (2003) e Nielsen (2007) registraram em seus estudos uma redução de *E. coli* variando entre 5,00 a 6,00 log<sub>10</sub> em WCL em escala reduzida, por um período de três meses a dois anos de tratamento.

**Figura 40.** Quantificação de *E. coli* no lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.



A partir dos resultados obtidos, não foram encontradas correlações significativas entre as concentrações de *E. coli* e parâmetros físico-químicos, dispostas na **Tabela 29**.

**Tabela 29.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de *E. coli* e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.

Parâmetros	Superficial		Profundo	
	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	-0,38	não (p>0,05)	-0,20
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	-0,21	não (p>0,05)	-0,09
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	-0,90	não (p>0,05)	-0,20
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	-0,11	não (p>0,05)	-0,21
pH	não (p>0,05)	-0,08	não (p>0,05)	-0,14

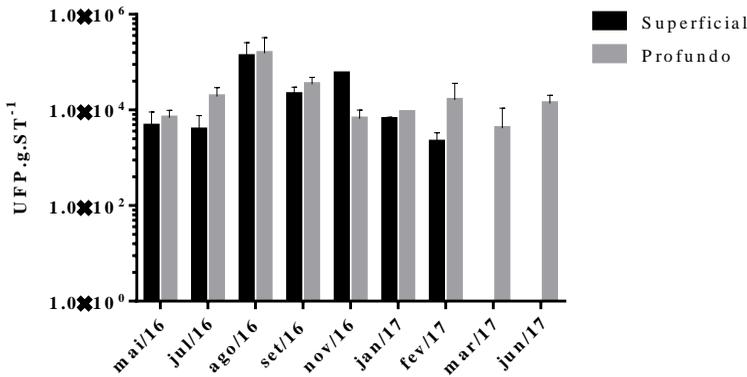
Com relação aos colifagos somáticos, para o perfil superficial, obteve-se uma detecção média de  $3,28 \times 10^4$  ( $\pm 4,86 \times 10^4$ ) UFP.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre  $2,15 \times 10^3$  e  $1,33 \times 10^5$  UFP.g.ST<sup>-1</sup>. No perfil profundo, registrou-se uma quantificação média de  $2,93 \times 10^4$  ( $\pm 4,75 \times 10^4$ ) UFP.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre  $4,14 \times 10^3$  e  $1,54 \times 10^5$  UFP.g.ST<sup>-1</sup>, como mostrado na **Figura 41**.

As concentrações entre os perfis (p<0,05) foram semelhantes entre si, sendo possível observar uma redução linear mais acentuada para o

perfil profundo no período compreendido entre agosto a novembro de 2016.

Diante destes resultados, foi possível observar para o perfil superficial e profundo, uma redução de 0,34 e  $1,05\log_{10}$ , respectivamente. García et al. (2003) encontraram em seu estudo, a relação entre a espessura do material filtrante e a remoção dos colifagos somáticos, registrando reduções variando entre 0,50 a  $2,60\log_{10}$ .

**Figura 41.** Quantificação de colifagos somáticos, no lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo durante o período de monitoramento do sistema.



Entre os colifagos somáticos e os parâmetros físico-químicos não foram encontradas correlações significativas, como apresentado na **Tabela 30**.

**Tabela 30.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de colifagos somáticos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.

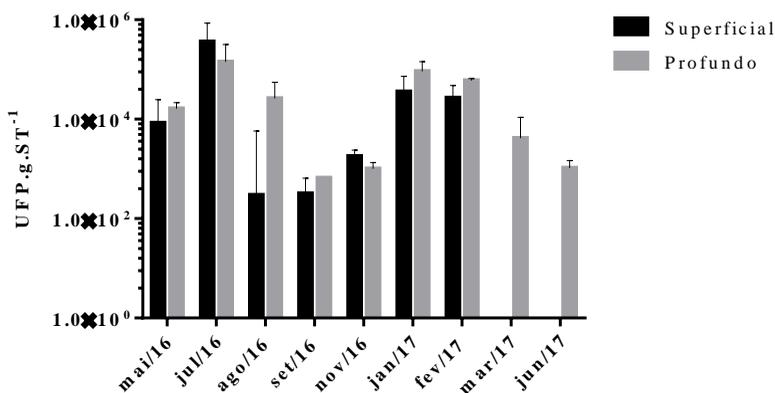
Parâmetros	Superficial		Profundo	
	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,21	não (p>0,05)	-0,17
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	0,11	não (p>0,05)	0,11
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	-0,16	não (p>0,05)	-0,32
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	0,00	não (p>0,05)	-0,01
pH	não (p>0,05)	0,00	não (p>0,05)	0,00

Com relação aos fagos RNA macho-específico, para o perfil superficial, obteve-se uma detecção média de  $6,21 \times 10^4$  ( $\pm 1,33 \times 10^5$ )

UFP.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre  $2,98 \times 10^2$  e  $3,62 \times 10^5$  UFP.g.ST<sup>-1</sup>. No perfil profundo, observou-se uma detecção média de  $3,82 \times 10^4$  ( $\pm 5,02 \times 10^4$ ) UFP.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre  $6,60 \times 10^2$  e  $1,42 \times 10^5$  UFP.g.ST<sup>-1</sup>, como mostrado na **Figura 42**.

As concentrações entre os perfis ( $p > 0,05$ ) variaram entre si, todavia, para ambos, foi possível observar um decaimento linear de jul/16 a set/16, seguido por um recrescimento, e novamente observou-se um decaimento linear de jan/17 a jun/17. Neste mesmo sentido, os fagos no lodo de alimentação apresentaram o mesmo comportamento exibido pelo lodo acumulado, tendo os mesmos decaimentos lineares. Diante dos resultados obtidos, foi possível observar para o perfil superficial e profundo, uma redução de 1,13 e 2,14log<sub>10</sub>, respectivamente.

**Figura 42.** Quantificação de fagos RNA macho-específico no lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo, durante o período de monitoramento do sistema.



Entre os fagos e os parâmetros físico-químicos não foram observadas correlações significativas, **Tabela 31**.

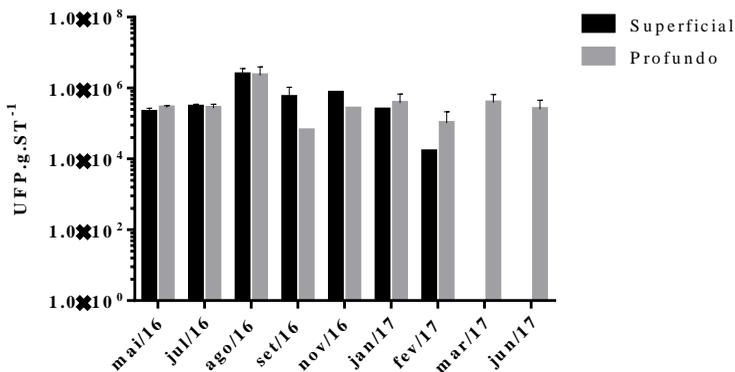
**Tabela 31.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de fagos RNA macho-específico e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.

Parâmetros	Superficial		Profundo	
	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	-0,39	não (p>0,05)	0,25
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	-0,18	não (p>0,05)	-0,01
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,10	não (p>0,05)	0,10
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	0,00	não (p>0,05)	0,00
pH	não (p>0,05)	0,21	não (p>0,05)	0,00

Com relação aos HAdV infecciosos, para o perfil superficial, obteve-se uma detecção média de  $6,39 \times 10^5$  ( $\pm 8,22 \times 10^5$ ) UFP.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre  $1,63 \times 10^4$  e  $7,33 \times 10^5$  UFP.g.ST<sup>-1</sup>. No perfil profundo, a quantificação de HAdV obteve uma detecção média de  $4,77 \times 10^5$  ( $\pm 6,88 \times 10^5$ ) UFP.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre  $6,39 \times 10^4$  e  $2,29 \times 10^6$  UFP.g.ST<sup>-1</sup>, como mostrado na **Figura 43**.

As concentrações entre os perfis foram similares (p>0,05), no perfil superficial é possível observar um decaimento linear a partir de nov/16 a fev/17 (última quantificação realizada para este perfil). Entretanto, o perfil profundo seguiu estável ao longo do monitoramento, com poucas variações. Diante dos resultados obtidos, foi possível observar para o perfil superficial e profundo, uma redução de 1,26 e 0,96log<sub>10</sub>, respectivamente.

**Figura 43.** Quantificação de HAdV no lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo durante o monitoramento do sistema.



A partir dos resultados obtidos entre os HAdV e os parâmetros físico-químicos, não foram observadas correlações significativas, **Tabela 32**.

A estabilidade dos HAdV no ambiente é relatada em diversos estudos devido seu genoma DNA dupla fita e suas características morfológicas, como já relatado anteriormente. Contudo, outra característica importante para sua estabilidade é a formação de agregados virais, os quais variam de pares simples a milhares de vírions (GERBA et al., 2018). São formados a partir de alterações de parâmetros físico-químicos, bem como durante a infecção nas células (GERBA; BETANCOURT; KITAJIMA, 2017).

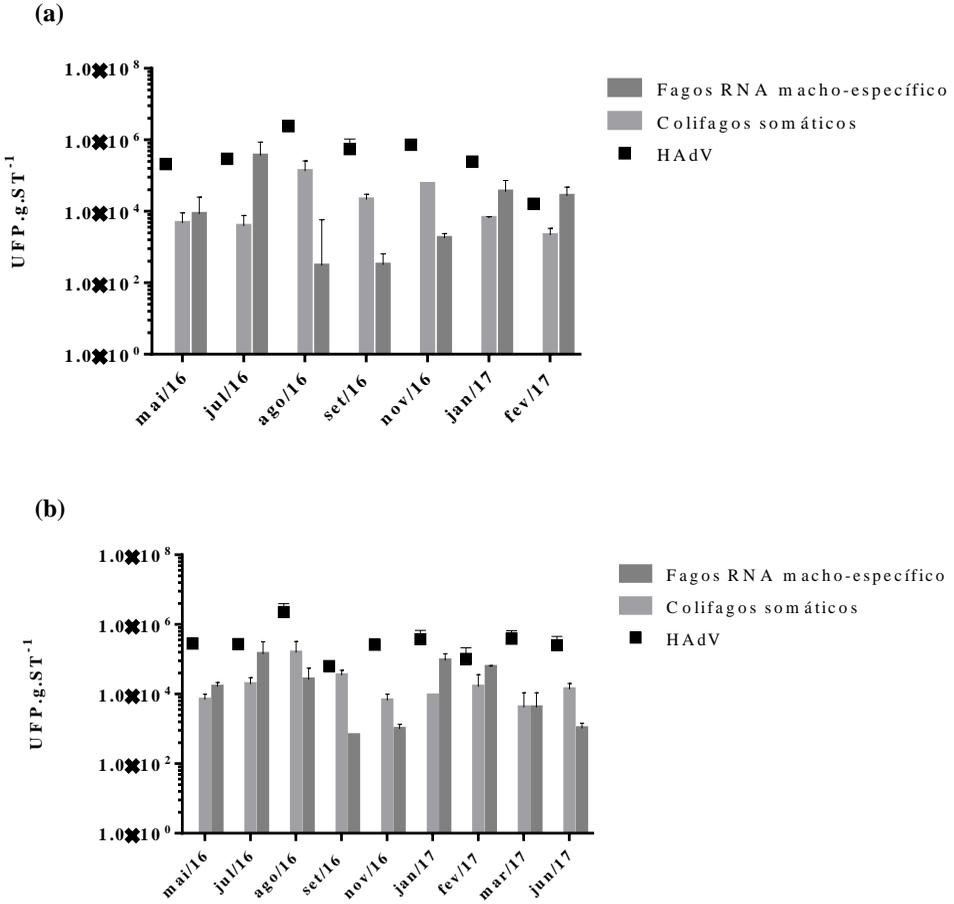
**Tabela 32.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de HAdV infecciosos e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.

Parâmetros	Superficial		Profundo	
	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	0,09	não (p>0,05)	-0,08
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	-0,01	não (p>0,05)	-0,10
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	0,27	não (p>0,05)	-0,12
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	-0,08	não (p>0,05)	-0,09
pH	não (p>0,05)	-0,02	não (p>0,05)	-0,11

Assim como relatado anteriormente para o filtro WCL em operação, os HAdV e bacteriófagos foram estáveis durante o monitoramento. No perfil superficial, os HAdV e fagos RNA macho-específico apresentam comportamento inverso nas fases finais das análises, onde os HAdV tiveram um decaimento linear, enquanto os fagos um crescimento linear, permanecendo com as concentrações similares entre si. Já os colifagos somáticos apresentaram uma concentração constante, com poucas variações, **Figura 44a**. No perfil profundo, os HAdV mantiveram-se constantes e concentrações superiores aos bacteriófagos. Estes por sua vez, apresentaram crescimento no início do monitoramento, seguidos por um pequeno decaimento linear e recrescimento nos meses seguintes, **Figura 44b**.

Deste modo, os bacteriófagos, embora tenham apresentado concentrações inferiores aos HAdV e variações em sua concentração, poderiam ser utilizados como substitutos deste, considerando a viabilidade técnica das quantificações.

**Figura 44.** Comparação entre as concentrações de HAdV infecciosos e os bacteriófagos para (a) perfil superficial e (b) profundo.



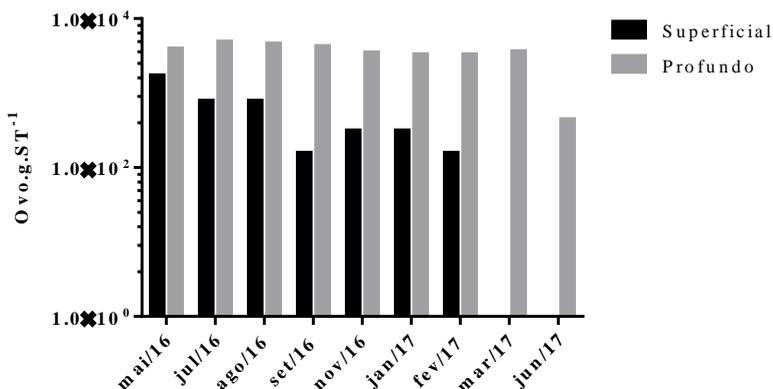
Quanto aos ovos de *Ascaris lumbricoides*, obteve-se uma detecção média para o perfil superficial de  $5,88 \times 10^2 (\pm 5,22 \times 10^2)$  Ovo.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre  $1,57 \times 10^2$  e  $1,72 \times 10^3$  Ovo.g.ST<sup>-1</sup>. No perfil profundo, observou-se uma detecção média de  $3,54 \times 10^3 (\pm 1,29 \times 10^3)$  Ovo.g.ST<sup>-1</sup>, variando entre  $4,40 \times 10^2$  e  $4,89 \times 10^3$  Ovo.g.ST<sup>-1</sup>, como mostrado na **Figura 45**.

As concentrações entre os perfis ( $p < 0,05$ ) foram distintas em cerca de  $1,00 \log_{10}$  e permaneceram estáveis durante todo o monitoramento, podendo se observar uma tendência de decaimento para o perfil profundo nos meses finais, pois entre fevereiro e junho não foram detectados ovos

por meio da técnica adotada, a qual é recomendada pela legislação brasileira e norte-americana.

A partir destes resultados, visualizou-se para o perfil superficial e profundo, uma redução de 1,04 e 1,02log<sub>10</sub>, respectivamente.

**Figura 45.** Quantificação de ovos viáveis de *Ascaris lumbricoides* no lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo durante o período de monitoramento do sistema.



Não foram encontradas correlações significativas entre as concentrações de ovos de *Ascaris lumbricoides* e os parâmetros físico-químicos durante o monitoramento do lodo, como exposto na **Tabela 33**.

**Tabela 33.** Correlação de *Pearson* entre as concentrações de ovos viáveis de *Ascaris lumbricoides* e parâmetros físico-químicos avaliados durante o monitoramento do lodo acumulado do filtro WCL 1 para os perfis superficial e profundo.

Parâmetros	Superficial		Profundo	
	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>	Diferença estatística	Valor de R <sup>2</sup>
Teor de ST (%)	não (p>0,05)	-0,21	não (p>0,05)	-0,20
Teor de STV (%)	não (p>0,05)	-0,19	não (p>0,05)	-0,19
Temperatura (°C)	não (p>0,05)	-0,31	não (p>0,05)	-0,20
Precipitação pluviométrica (mm)	não (p>0,05)	-0,38	não (p>0,05)	-0,08
pH	não (p>0,05)	0,00	não (p>0,05)	0,00

#### 4.4 Uso agrícola do lodo acumulado segundo parâmetros microbiológicos da Resolução 375 de 2006 do CONAMA

O lodo acumulado pode ser classificado conforme as concentrações máximas de substâncias e microrganismos patogênicos permitidos, presentes na Resolução 375 de 2006 do CONAMA.

Na **Tabela 34** estão dispostas as concentrações de microrganismos encontradas no lodo acumulado dos dois sistemas avaliados neste estudo, bem como as concentrações permitidas pela Resolução. Os microrganismos utilizados pela resolução como biomarcadores são *Salmonella* spp. e coliformes termotolerantes para o grupo de bactérias; vírus entéricos e; ovos de helmintos. Neste estudo analisamos *E.coli* como representante dos Coliformes termotolerantes, *Ascaris lumbricoides* para o grupo de helmintos, Adenovírus para vírus entéricos, e ainda adicionamos os bacteriófagos (colifagos somáticos e fagos RNA macho-específico) como indicadores virais alternativos.

Observando os resultados obtidos para os dois sistemas (em operação e repouso), após os 13 meses de monitoramento, os lodos acumulados não atingiram os parâmetros mínimos necessários para que fossem classificados como lodos Classe A ou B. Para melhorar as condições do lodo recomenda-se um tempo de repouso superior ao analisado para que ocorra a maior secagem e remoção destes microrganismos. Observa-se que atualmente no Brasil não é permitido o reuso de lodo Classe B, somente Classe A, exceto quando realizados estudos de avaliação de risco que demonstrem que existe segurança sanitária aceitável para o uso pretendido.

Ressalta-se que os wetlands estão sendo (no caso do WC em operação) ou foram (WC em repouso) operados com taxas de aplicação superficiais elevadas, quando comparado com o que usualmente é reportado em literatura, o que pode interferir na eficiência do sistema no desaguamento do lodo, e conseqüentemente na redução dos agentes patogênicos. Isto foi observado na prática e também com as análises de sólidos totais, o que demonstrou um lodo ainda com muita umidade, o que favorece a estabilidade dos microorganismos. Ressalta-se também, que as elevadas taxas aplicadas nos wetlands em operação, podem estar influenciando na estabilidade das macrófitas, o que foi observado em campo, o que também pode influenciar na estabilidade do sistema como um todo.

Outro fator que exerceu influência, quando comparando o sistema em estudo com outros trabalhos, como discutido no **Item 4.3.1**, foram as

rotinas operacionais com curto período de repouso (dois dias), quando comparado ao recomendado (seis dias) em literatura.

**Tabela 34.** Concentrações de microrganismos no WCL e permitidas pela Resolução nº 375 de 2006 do CONAMA.

	Microrganismo	Lodo acumulado inicial	Lodo acumulado final	Concentração permitida	
				Classe A	Classe B
<b>WCL1 Superficial</b>	<i>Salmonella</i> spp. (NMP.g.ST <sup>-1</sup> )	1,71×10	4,47	Ausência em 10g	-
	<i>E. coli</i> (UFC.g.ST <sup>-1</sup> )	4,23×10 <sup>6</sup>	2,35×10 <sup>5</sup>	<10 <sup>3</sup> UFC.g.ST <sup>-1</sup>	<10 <sup>6</sup> UFC.g.ST <sup>-1</sup>
	Colifagos somáticos (UFP.g.ST <sup>-1</sup> )	4,67×10 <sup>3</sup>	2,15×10 <sup>3</sup>	-	-
	Fagos RNA macho-específico (UFP.g.ST <sup>-1</sup> )	8,34×10 <sup>3</sup>	2,68×10 <sup>4</sup>	-	-
	HAdV (UFP.g.ST <sup>-1</sup> )	2,12×10 <sup>5</sup>	1,63×10 <sup>4</sup>	<0,25 UFP.g.ST <sup>-1</sup>	-
	Ovos de <i>Ascaris lumbricoides</i> (ovo.g.ST <sup>-1</sup> )	1,72×10 <sup>3</sup>	1,57×10 <sup>2</sup>	<0,25 ovo.g.ST <sup>-1</sup>	<10 ovo.g.ST <sup>-1</sup>
<b>WCL1 Profundo</b>	<i>Salmonella</i> spp. (NMP.g.ST <sup>-1</sup> )	4,43	6,24	Ausência em 10g	-
	<i>E. coli</i> (UFC.g.ST <sup>-1</sup> )	3,57×10 <sup>6</sup>	1,00×10 <sup>5</sup>	<10 <sup>3</sup> UFC.g.ST <sup>-1</sup>	<10 <sup>6</sup> UFC.g.ST <sup>-1</sup>
	Colifagos somáticos (UFP.g.ST <sup>-1</sup> )	6,90×10 <sup>3</sup>	1,37×10 <sup>4</sup>	-	-
	Fagos RNA macho-específico (UFP.g.ST <sup>-1</sup> )	1,63×10 <sup>4</sup>	1,04×10 <sup>3</sup>	-	-
	HAdV (UFP.g.ST <sup>-1</sup> )	2,84×10 <sup>5</sup>	2,54×10 <sup>5</sup>	<0,25 UFP.g.ST <sup>-1</sup>	-
	Ovos de <i>Ascaris lumbricoides</i> (ovo.g.ST <sup>-1</sup> )	3,94×10 <sup>3</sup>	4,40×10 <sup>2</sup>	<0,25 ovo.g.ST <sup>-1</sup>	<10 ovo.g.ST <sup>-1</sup>
<b>WCL em operação</b>	<i>Salmonella</i> spp. (NMP.g.ST <sup>-1</sup> )	3,98	8,34	Ausência em 10g	-
	<i>E. coli</i> (UFC.g.ST <sup>-1</sup> )	7,00×10 <sup>6</sup>	2,80×10 <sup>5</sup>	<10 <sup>3</sup> UFC.g.ST <sup>-1</sup>	<10 <sup>6</sup> UFC.g.ST <sup>-1</sup>
	Colifagos somáticos (UFP.g.ST <sup>-1</sup> )	3,89×10 <sup>3</sup>	2,29×10 <sup>3</sup>	-	-
	Fagos RNA macho-específico (UFP.g.ST <sup>-1</sup> )	9,66×10 <sup>3</sup>	2,94×10 <sup>3</sup>	-	-
	HAdV (UFP.g.ST <sup>-1</sup> )	2,80×10 <sup>5</sup>	2,66×10 <sup>4</sup>	<0,25 UFP.g.ST <sup>-1</sup>	-
	Ovos de <i>Ascaris lumbricoides</i> (ovo.g.ST <sup>-1</sup> )	3,07×10 <sup>3</sup>	4,96×10 <sup>3</sup>	<0,25 ovo.g.ST <sup>-1</sup>	<10 ovo.g.ST <sup>-1</sup>

## 5 CONCLUSÃO

Os WCL avaliados neste estudo, caracterizaram-se pela elevada TAS ( $177 \text{ kg.ST.m}^2 \cdot \text{ano}^{-1}$ ) e apresentaram uma boa eficiência na remoção de ST (97%) do lodo de alimentação (considerando como efluente final o líquido percolado gerado).

Neste estudo, as bactérias mostraram-se mais susceptíveis aos processos de inativação, sendo mais facilmente removidas quando comparadas aos outros biomarcadores utilizados, mostrando a importância de se avaliar outros grupos de microrganismos como biomarcadores de contaminação fecal, como vírus e parasitas intestinais. Na classe dos coliformes termotolerantes, a *E. coli* mostrou-se um bom representante deste grupo, tendo em vista sua técnica de quantificação ser simplificada e resultados rápidos, sendo encontrada em grandes concentrações em todas as matrizes amostradas.

Os bacteriófagos apresentaram comportamento semelhante aos HAdV, embora tenham sido encontrados em concentrações inferiores a esses, mostraram-se estáveis, podendo ser utilizados como substitutos dos vírus entéricos, viabilizando estas análises a outros laboratórios, uma vez que as técnicas de quantificação são menos laboriosas, apresentando um melhor custo-benefício, por não precisarem de cultura celular e técnicas moleculares.

O lodo acumulado não foi classificado como um lodo Classe A, devido as altas concentrações registradas para os microrganismos indicadores, mesmo após 13 meses de repouso. Com a remoção destes, o lodo poderá ser utilizado como um fertilizante, uma vez que contém um bom valor nutricional para ser utilizado na agricultura, reduzindo custos de importação de fertilizantes artificiais. Uma alternativa para reduzir o tempo necessário para essa remoção seria o uso de pós-tratamentos.

Para estudos futuros recomenda-se uma análise mais detalhada da composição dos macronutrientes e micronutrientes presentes no lodo acumulado, bem como as concentrações de metais pesados presentes. Ressalta-se ainda a importância de se incluir estudos mais aprofundados das populações microbianas que podem interferir e auxiliar nos processos de mineralização e inativação dos biomarcadores utilizados.

## REFERÊNCIAS

- BELL, R. L. et al. Recent and emerging innovations in Salmonella detection: a food and environmental perspective. **Microbial Biotechnology**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.279-292, 4 abr. 2016.
- BETTEGA, Janine Maria Pereira Ramos; MACHADO, Maria Rosa; PRESIBELLA, Mayra. Métodos analíticos no controle microbiológico da água para consumo humano. **Ciência e Agrotecnologia**, Si, v. 30, n. 5, p.950-954, jan. 2006.
- BLASER, M J; NEWMAN, L S. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. **Reviews Of Infectious Diseases**, Si, v. 4, n. 4, p.1096-1106, 1982.
- BOUDAUD, N. et al. Removal of MS2, Q $\beta$  and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. **Water Research**, [s.l.], v. 46, n. 8, p.2651-2664, maio 2012.
- BOURIOUG, Mohamed et al. Sewage sludge application in a plantation: Effects on trace metal transfer in soil–plant–snail continuum. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 502, p.309-314, jan. 2015.
- BURGOON, Peter et al. Reed beds for biosolids drying in the arid northwestern united states. **Water Science And Technology**, [s.l.], v. 35, n. 5, p.287-292, 1997.
- CAPIZZI, S.; SCHWARTZBROD, J.. Surface properties of *Ascaris suum* eggs: hydrophobic potential and Lewis acid–base interactions. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.99-105, out. 2001.
- CARRATALÀ, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; HUNDESA, A.; RUSIÑOL, M.; FRESNO, S.; COOK, N.; GIRONES, R. Effect of temperature and sunlight on the stability of human adenoviruses and MS2 as fecal contaminants on fresh produce surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, v. 164, n. 2–3, p. 128-134, 2013.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<http://www.bacteriainphotos.com/Escherichia%20coli%20electron%20microscopy.html>>. Acessado em: 05 de janeiro de 2018.
- CHENG, Hui-wen A. et al. Municipal wastewater treatment plants as pathogen removal systems and as a contamination source of noroviruses and *Enterococcus faecalis*. **Journal Of Water And Health**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.380-389, set. 2012.
- CROMEANS, Theresa L. et al. Development of plaque assays for adenoviruses 40 and 41. **Journal Of Virological Methods**, [s.l.], v. 151, n. 1, p.140-145, jul. 2008.
- DE SOUZA, G. S.; RODRIGUES, L. A.; DE OLIVEIRA, W.J.; GUIMARÃES, M. P.; MASSARA, C. L.; GROSSI, P. A. Disinfection of domestic effluents by gamma radiation: Effects on the inactivation of *Ascaris lumbricoides* eggs. **Water Research**, v.45, n.17, p. 5523-5528, 2011.
- DU, Xin; SHI, Chunhong; MA, Fangshu. Influence of intermittent aeration and organic loading rate on lab-scale constructed wetland systems treating synthetic wastewater. **Desalination And Water Treatment**, [s.l.], v. 57, n. 21, p.9651-9659, 25 jul. 2015.

- EDWARDS, J. Reed bed dewatering of agricultural sludges and slurries. **Water Science & Technology**, Si, v. 44, n. 11-12, p.551-558, jan. 2001.
- Engineering**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.91-105, out. 2001.
- EPI. University of Florida, Batz, M.B., Hoffmann, S., Morris, J.G., 2011. Ranking the Risks: The 10 Pathogen-Food Combinations with the Greatest Burden on Public Health.
- FONG, T. T.; LIPP, E. K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 69, n. 2, p. 357-371, 2005.
- FONG, Theng-theng et al. Massive Microbiological Groundwater Contamination Associated with a Waterborne Outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio. **Environmental Health Perspectives**, [s.l.], v. 115, n. 6, p.856-864, 6 fev. 2007.
- FONGARO, G. et al. Settling and survival profile of enteric pathogens in the swine effluent for water reuse purpose. **International Journal Of Hygiene And Environmental Health**, [s.l.], v. 219, n. 8, p.883-889, nov. 2016.
- FRIEDMAN, S. D. et al. Gene Mapping and Phylogenetic Analysis of the Complete Genome from 30 Single-Stranded RNA Male-Specific Coliphages (Family Leviviridae). **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 83, n. 21, p.11233-11243, 26 ago. 2009.
- GAGNON, Vincent et al. Effect of plant species on sludge dewatering and fate of pollutants in sludge treatment wetlands. **Ecological Engineering**, [s.l.], v. 61, p.593-600, dez. 2013.
- GAGNON, Vincent et al. Effect of plant species on water quality at the outlet of a sludge treatment wetland. **Water Research**, [s.l.], v. 46, n. 16, p.5305-5315, out. 2012.
- GALL, A. M.; SHISLER, J. L.; MARINAS, B. J. Analysis of the viral replication cycle of adenovirus serotype 2 after inactivation by free chlorine. *Environmental Science & Technology*, v. 49, n. 7, p. 4584-4590, 2015.
- GARCÍA, Joan et al. Role of hydraulic retention time and granular medium in microbial removal in tertiary treatment reed beds. **Water Research**, [s.l.], v. 37, n. 11, p.2645-2653, jun. 2003.
- GEENEN, P L et al. The morphogenesis of *Ascaris suum* to the infective third-stage larvae within the egg. **Journal Of Parasitology**, Si, v. 4, n. 85, p.616-622, ago. 1999.
- GERBA, C. P.; GRAMOS, D. M.; NWACHUKU, N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 10, p. 5167-5169, 2002.
- GERBA, Charles P. et al. Reducing uncertainty in estimating virus reduction by advanced water treatment processes. **Water Research**, [s.l.], v. 133, p.282-288, abr. 2018.

- GERBA, Charles P.; BETANCOURT, Walter Q.; KITAJIMA, Masaaki. How much reduction of virus is needed for recycled water: A continuous changing need for assessment?. **Water Research**, [s.l.], v. 108, p.25-31, jan. 2017
- GINO, Efrat; STAROSVETSKY, Jeana; ARMON, Robert. Bacteriophage ecology in a small community sewer system related to their indicative role in sewage pollution of drinking water. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 9, n. 10, p.2407-2416, out. 2007.
- HAVELAAR, A. H. **F-specific Bacteriophages as Model Viruses in Water Treatment Processes**. 1986. 221 f. Tese (Doutorado) - University Of Utrecht, Utrecht, Netherlands, 1986.
- HAVELAAR, A. H., M. VAN OLPHEN, AND Y. C. DROST. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2956–2962, 1993.
- HENCH, Keith R. et al. Fate of physical, chemical, and microbial contaminants in domestic wastewater following treatment by small constructed wetlands. **Water Research**, [s.l.], v. 37, n. 4, p.921-927, fev. 2003.
- HERNROTH, B. E. et al. Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential Indicator Organisms in the Blue Mussel, *Mytilus edulis*: the First Scandinavian Report. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 68, n. 9, p.4523-4533, 1 set. 2002.
- ICTV - INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY VIRUSES. Virus taxonomy — classification and nomenclature of viruses. In Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses ed. King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego, CA, USA: Elsevier Academic Press. 2016
- JIANG, S. C. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. *Environmental Science & Technology*, v. 40, n. 23, p. 7132-7140, 2006.
- JOFRE, Juan et al. Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources. **Water**, [s.l.], v. 8, n. 5, p.199-220, 12 maio 2016.
- KADLEC, Robert; WALLACE, Scott. **Treatment Wetlands**. 2. ed. Florida, Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2009.
- KÄFER, Silvana Cristina. **Tratamento de lodo anaeróbio em wetlands construídos operados em alta taxa e com a recirculação de líquido percolado**. 2015. 143 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- KAHLER, A. M. et al. Aggregation of Adenovirus 2 in Source Water and Impacts on Disinfection by Chlorine. **Food And Environmental Virology**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.148-155, 24 fev. 2016.
- KANG, Wei et al. Assessment of low concentration wastewater treatment operations with dewatered alum sludge-based sequencing batch constructed wetland system. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-7, dez. 2017.
- KARKASHAN, Alaa et al. Comparison of methodologies for enumerating and detecting the viability of *Ascaris* eggs in sewage sludge by standard incubation-

- microscopy, the BacLight Live/Dead viability assay and other vital dyes. **Water Research**, [s.l.], v. 68, p.533-544, jan. 2015.
- KING, A.M.Q., ADAMS, M.J., CARSTENS, E.B. AND LEFKOWITZ, W.J. (2011) *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, London, UK.
- KOTWAL, Grishma; CANNON, Jennifer L. Environmental persistence and transfer of enteric viruses. **Current Opinion In Virology**, [s.l.], v. 4, p.37-43, fev. 2014.
- KUMAR, J.I.g. et al. Nitrogen dynamics model for a pilot field-scale novel dewatered alum sludge cake-based constructed wetland system. **Environmental Technology**, [s.l.], v. 36, n. 6, p.732-741, 3 out. 2014.
- LEE, Jae-kune et al. Mass balance of nitrogen, and estimates of COD, nitrogen and phosphorus used in microbial synthesis as a function of sludge retention time in a sequencing batch reactor system. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 99, n. 16, p.7788-7796, nov. 2008.
- LIMA, M.x. et al. Performance of different substrates in constructed wetlands planted with *E. crassipes* treating low-strength sewage under subtropical conditions. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 630, p.1365-1373, jul. 2018.
- LOCAS, Annie et al. Virus occurrence in municipal groundwater sources in Quebec, Canada. **Canadian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 53, n. 6, p.688-694, jun. 2007.
- LUTE, S. et al. Characterization of Coliphage PR772 and Evaluation of Its Use for Virus Filter Performance Testing. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 70, n. 8, p.4864-4871, 1 ago. 2004.
- MAGRI, M. E. et al. Inactivation of adenovirus, reovirus and bacteriophages in fecal sludge by pH and ammonia. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 520, p.213-221, jul. 2015.
- MAGRI, M. E.; FIDJELAND J.; JÖSSON H.; ALBIHN A.; VINNERÅS B. Inactivation of adenovirus, reovirus and bacteriophages in fecal sludge by pH and ammonia. **Science of The Total Environment**, v. 520, p. 213-221, 2015.
- MAGRI, Maria Elisa et al. Constructed wetlands for sludge dewatering with high solids loading rate and effluent recirculation: Characteristics of effluent produced and accumulated sludge. **Ecological Engineering**, [s.l.], v. 95, p.316-323, out. 2016.
- MANDI, L et al. Wastewater treatment by stabilization ponds with and without macrophytes under arid climate. **Water Science & Technology**, Si, v. 28, n. 1, p.177-181, 1993.
- MARSHALL, J. M.; GUNN, J. S.. The O-Antigen Capsule of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Facilitates Serum Resistance and Surface Expression of FliC. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 83, n. 10, p.3946-3959, 20 jul. 2015.

- MATTLE, Michael J.; VIONE, Davide; KOHN, Tamar. Conceptual Model and Experimental Framework to Determine the Contributions of Direct and Indirect Photoreactions to the Solar Disinfection of MS2, phiX174, and Adenovirus. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.334-342, 9 dez. 2014.
- MCQUISTON, J. R. et al. Molecular Phylogeny of the Salmonellae: Relationships among Salmonella Species and Subspecies Determined from Four Housekeeping Genes and Evidence of Lateral Gene Transfer Events. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 190, n. 21, p.7060-7067, 29 ago. 2008.
- MENA, K. D.; GERBA, C. P. Waterborne adenovirus. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 198, p. 133-167, 2009
- MENDONÇA, Eliane Pereira. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no brasil**. 2016. 134 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Uberlândia, 2016.
- MOLINA-QUIROZ, Roberto C. et al. Exposure to sub-inhibitory concentrations of cefotaxime enhances the systemic colonization of Salmonella Typhimurium in BALB/c mice. **Open Biology**, [s.l.], v. 5, n. 10, p.1-10, out. 2015.
- MURRAY, Patrick. **Microbiologia médica**. 8. ed. Si: Elsevier, 2017.
- NATARO, J P; KAPER, J B. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology Reviews**, Si, v. 1, n. 11, p.142-201, jan. 1998.
- NEMEROW, G R et al. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. **Virology**, Si, v. 2, n. 384, p.380-388, 20 fev. 2009.
- NEVES, David Pereira. **Parasitologia humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.
- NIELSEN, S. Helsingør sludge reed bed system: reduction of pathogenic microorganisms. **Water Science And Technology**, Si, v. 3, n. 56, p.175-182, jan. 2007.
- NIELSEN, S. Sludge reed bed facilities: operation and problems. **Water Science & Technology**, Si, v. 51, n. 9, p.99-107, 2005.
- NIELSEN, S. Sludge treatment in wetland systems. In: DIAS, V; VYMAZAL, J. **Proceedings of the Conference on the Use of Aquatic Macrophytes for Wastewater Treatment in Constructed Wetlands**. Lisboa, Portugal: Eds, 2003.
- NIELSEN. Mineralisation of hazardous organic compounds in a sludge reed bed and sludge storage. **Water Science And Technology**, Si, v. 9, n. 51, p.109-117, jan. 2005.
- ORTA DE VELASQUEZ, M. T. et al. Destruction of helminth (*Ascaris suum*) eggs by ozone. **Ozone: Science & Engineering**, v. 26, p. 359-366, 2004.
- PEDROSO, M Z et al. Attaching-effacing lesions and intracellular penetration in HeLa cells and human duodenal mucosa by two Escherichia coli strains not belonging to the classical enteropathogenic E. coli serogroups. **Infection And Immunity**, Si, v. 3, n. 61, p.1152-1156, mar. 1993

- PELTOMAA, Riikka et al. Application of bacteriophages in sensor development. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 408, n. 7, p.1805-1828, 15 out. 2015.
- PUSSAYANAVIN, Tatchai et al. Enhanced sludge reduction in septic tanks by increasing temperature. **Journal Of Environmental Science And Health, Part A**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.81-89, dez. 2014.
- ROCHA, Maria Carolina Vieira da; BARÉS, Monica Eboly; BRAGA, Maria Cristina Borba. Quantification of viable helminth eggs in samples of sewage sludge. **Water Research**, [s.l.], v. 103, p.245-255, out. 2016.
- SANTOS, N. S. D. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. Introdução à virologia humana. 2. 2008. 532
- SCALLAN, Elaine et al. Estimates of Illnesses, Hospitalizations, and Deaths Caused By Major Bacterial Enteric Pathogens in Young Children in the United States. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, [s.l.], p.217-221, dez. 2012.
- SCALLAN, Elaine et al. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.7-15, jan. 2011.
- SCHLINDWEIN, Ad; SIMÕES, Cmo; BARARDI, Crm. Comparative study of two extraction methods for enteric virus recovery from sewage sludge by molecular methods. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 104, n. 4, p.576-579, jul. 2009.
- SHELEF, Oren; GROSS, Amit; RACHMILEVITCH, Shimon. Role of Plants in a Constructed Wetland: Current and New Perspectives. **Water**, [s.l.], v. 5, n. 2, SOUSA, Cristina Paiva de. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista Aps**, Si, v. 9, n. 1, p.83-88, jun. 2006.
- TONANI, K. A. A. et al. Behavior of Metals, Pathogen Parasites, and Indicator Bacteria in Sewage Effluents During Biological Treatment by Activated Sludge. **Biological Trace Element Research**, [s.l.], v. 143, n. 2, p.1193-1201, 20 nov. 2010.
- TRABULSI, Luiz R; KELLER, Rogéria; GOMES, Tânia A Tardelli. Typical and Atypical Enteropathogenic Escherichia coli. **Emerging Infectious Diseases**, Si, v. 8, n. 5, p.508-513, maio 2002.
- UGETTI, Enrica. **Sewage sludge treatment in constructed wetlands: Technical, economic and environmental aspects applied to small communities of the Mediterranean Region**. 2011. 199 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Civil, Departament D'enginyeria Hidràulica, Marítima I Ambiental de La Universitat Politècnica de Catalunya, Universitat Politècnica de Catalunya, Catalunya, 2011.
- UGGETTI, E. et al. Sludge dewatering and stabilization in drying reed beds: Characterization of three full-scale systems in Catalonia, Spain. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 100, n. 17, p.3882-3890, set. 2009.
- UGGETTI, Enrica et al. Performance of sludge treatment wetlands using different plant species and porous media. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 217-218, p.263-270, maio 2012.

- UGGETTI, Enrica et al. Sludge treatment wetlands: A review on the state of the art. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 9, p.2905-2912, maio 2010.
- UGGETTI, Enrica. et al. Dewatering model for optimal operation of sludge treatment wetlands. **Water Research**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.335-344, fev. 2012.
- ULRICH, Hagendorf et al. Microbiological investigations for sanitary assessment of wastewater treated in constructed wetlands. **Water Research**, [s.l.], v. 39, n. 20, p.4849-4858, dez. 2005.
- US EPA - United States Environment Protection Agency, 2015. Review of Coliphages as Possible Indicators of Fecal Contamination for Ambient Water Quality. Office of Water, Washington, DC, 820-R-15e098.
- US EPA - United States Environmental Protection Agency, 2003. Environmental Regulations and Technology: Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. U.S. Environment Protection Agency. EPA/625/R-92/013. Disponível em: <<http://www.epa.gov/nrmrl/pubs/625r92013/625R92013.pdf>>. Acessado em: 17 de dezembro de 2017.
- VINJE, J. et al. Molecular Detection and Genotyping of Male-Specific Coliphages by Reverse Transcription-PCR and Reverse Line Blot Hybridization. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 70, n. 10, p.5996-6004, 1 out. 2004.
- VYMAZAL, J. Removal of enteric bacteria in constructed treatment wetlands with emergent macrophytes: a review. **Journal Of Environmental Science And Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering**, Si, v. 40, n. 6-7, p.1355-1367, 2005.
- VYMAZAL, Jan. Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetlands systems for wastewater treatment. **Ecological Engineering**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.478-490, dez. 2005.
- VYMAZAL, Jan. Long-term performance of constructed wetlands with horizontal sub-surface flow: Ten case studies from the Czech Republic. **Ecological Engineering**, [s.l.], v. 37, n. 1, p.54-63, jan. 2011.
- VYMAZAL, Jan. Plants used in constructed wetlands with horizontal subsurface flow: a review. **Hydrobiologia**, [s.l.], v. 674, n. 1, p.133-156, 17 maio 2011.
- VYMAZAL, Jan; BřEZINOVÁ, Tereza. The use of constructed wetlands for removal of pesticides from agricultural runoff and drainage: A review. **Environment International**, [s.l.], v. 75, p.11-20, fev. 2015.
- WAGNER, Carolin; HENSEL, Michael. Adhesive Mechanisms of Salmonella enterica. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [s.l.], p.17-34, 2011.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for Drinking Water Quality. 3 ed. Switzerland, 2004.
- WHO guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater, 3rd ed. Volumes I-IV. Geneva: World Health Organization; 2006 ([http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/sanitation-waste/wastewater/wastewater-guidelines/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/sanitation-waste/wastewater/wastewater-guidelines/en/), accessed 12 June 2017).
- WHO, 2008. Viruses in Food: Scientific Advice to Support Risk Management Activities

WHO, WSH e CDS. **Written for World Water Day 2001**. Reviewed by staff and experts from the cluster on Communicable Diseases (CDS) and Water, Sanitation and Health unit (WSH), World Health Organization (WHO). Disponível em: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases-risks/diseases/ascariasis/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases-risks/diseases/ascariasis/en/)>. Acessado em 30 de dezembro de 2017.

WU, Shubiao et al. Sanitation in constructed wetlands: A review on the removal of human pathogens and fecal indicators. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 541, p.8-22, jan. 2016.

WWDR. **Wastewater the untapped water**. Paris: Wwap, 2017.

ZHU, Hui et al. Monitoring of Poyang lake water for sewage contamination using human enteric viruses as an indicator. **Virology Journal**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.2-9, 5 jan. 2018.