

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA – ENSP
DEPARTAMENTO DE SANEAMENTO E SAÚDE AMBIENTAL - DSSA**

“Avaliação da eficiência de um sistema de tratamento de efluente hospitalar por processo anaeróbico na remoção de coliformes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos e Vírus da Hepatite A”

Tatiana Prado

Orientador: Dr^a. Wilma de Carvalho Pereira

Co-orientadores: Dr. Dalton Marcondes Silva e Dr^a. Marise Dutra Asensi

Rio de Janeiro, fevereiro de 2007

DEDICATÓRIA

Aos meus avós
Anna Migliozi Baldon e Pacífico Baldon (“Arlindo”)
(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dr^a. Wilma de Carvalho Pereira, pelo apoio e incentivo, que com uma postura sempre amistosa me honrou com a sua orientação.

Ao co-orientador Dr. Dalton Marcondes Silva, por toda a ajuda prestada e pelos aprendizados na área de engenharia sanitária.

À co-orientadora Dr^a. Marise Dutra Asensi, pelos inúmeros conhecimentos transmitidos em microbiologia e por ter ajudado a engrandecer este trabalho.

À Dr^a. Ana Maria Coimbra Gaspar, por ter disponibilizado o laboratório de virologia (IOC/FIOCRUZ), os materiais e equipamentos necessários para as análises de detecção do vírus da hepatite A e por toda a atenção dada.

À Sandra Ferreira de Oliveira, responsável pelas análises físico-químicas.

Aos colegas Liliane Miyuki, Pricila Silva de Souza, Wilson Dantas, Adriano Anselmo da Silva, Luciane Amado, Leonardo Mendes-Diniz e Fabiana Fioretti, por terem me ajudado em etapas importantes das análises laboratoriais.

Ao Major Tedin por permitir a retirada periódica de amostras de esgoto e lodo de esgoto e por disponibilizar dados técnicos importantes do sistema de tratamento de esgoto em estudo.

Ao meu querido pai Norvaldo do Amaral Prado e à minha querida mãe Vera Lucia Baldon, por tudo que fizeram por mim, agradeço eternamente a possibilidade que me foi dada para escolher o meu próprio caminho.

Ao grande amigo, meu tio João Silvio do Amaral Prado, pelas inúmeras reflexões, pelos grandes ensinamentos, por estar sempre presente nas horas difíceis e pela ajuda e conselhos valiosos para a consecução do presente trabalho.

Aos amigos e pessoas queridas Renato Prado, Carolina Marques Oliboni, Regina Neri, Andréa Provasi Lanzara e Flavinha.

E ao meu grande amor Arnaldo Provasi Lanzara, por ser uma fonte de motivação e inspiração, pela nossa história e por tudo que representa para mim.

À FIOCRUZ pela concessão de uma bolsa de estudos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE SIGLAS	viii
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 – INTRODUÇÃO	01
1.1 – OBJETIVOS	03
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
2.1 – Características do esgoto hospitalar	06
2.2 – Impacto do lançamento de efluentes hospitalares sem um pré-tratamento	12
2.3 – Alternativas para o tratamento de esgotos hospitalares	15
2.4 – Poluição microbiológica das águas residuárias: vírus patogênicos	20
2.5 – Metodologias para a detecção de vírus em amostras de água	21
2.6 – Vírus da Hepatite A	22
2.6.1 – Propriedades estruturais e físico-químicas	22
2.6.2 – Manifestações clínicas	25
2.6.3 – Epidemiologia	25
2.6.4 – Prevenção	27
3 – METODOLOGIA	29
3.1 – Caracterização da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) hospitalar	30
3.2 – Amostragem	35

3.2.1 – Coleta de esgoto e lodo de esgoto-----	35
3.3 – Análise de coliformes totais e <i>E.coli</i> – Técnica dos tubos múltiplos -----	37
3.4 – Análise de enterobactérias e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -----	37
3.5 – Antibiograma (técnica de disco-difusão e discos-combinados)-----	39
3.5.1 – Disco-difusão -----	39
3.5.2 – Discos-combinados-----	40
3.6 – Análise de vírus da hepatite A-----	41
3.6.1 – Adsorção-eluição -----	41
3.6.2 – Concentração -----	44
3.6.3 – Identificação do vírus da hepatite A (RT-PCR e <i>Nested PCR</i>)-----	44
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	49
4.1 – Resultados de coliformes totais e termotolerantes-----	50
4.2 – Resultados da detecção de enterobactérias e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -----	58
4.3 – Resultados do antibiograma -----	65
4.4 – Resultados de vírus da hepatite A -----	77
5 – CONCLUSÃO -----	84
6 – RECOMENDAÇÕES -----	89
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	92
8 – ANEXOS-----	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos presentes no esgoto hospitalar e as suas características -----	07
Tabela 2 – Concentração de antibióticos em diferentes estágios do tratamento de esgoto e nos pontos do rio receptor -----	09
Tabela 3 – Caracterização físico-química e microbiológica do esgoto hospitalar de ITDD (França) -----	12
Tabela 4 – Proporção de municípios, por condição de esgotamento sanitário, segundo as grandes regiões – 2000-----	14
Tabela 5 – Características do esgoto bruto e do efluente tratado-----	16
Tabela 6 – Concentração de alguns parâmetros avaliados durante o processo de tratamento de esgoto hospitalar -----	17
Tabela 7 – Parâmetros de projeto de acordo com a capacidade hospitalar -----	30
Tabela 8 – Parâmetros físico-químicos obtidos da ETE hospitalar-----	35
Tabela 9 – Antibióticos utilizados, concentração e classe a que pertencem -----	40
Tabela 10 – SST (mg/L) e valores correspondentes em mg de lodo utilizados em cada amostra -- -----	43
Tabela 11 – Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR -----	47
Tabela 12 – Dados de coliformes totais/ 100 mL -----	51
Tabela 13 – Dados de coliformes termotolerantes – <i>E.coli</i> / 100 mL -----	52
Tabela 14 – Resultados das eficiências médias de cada unidade que compõe o sistema e eficiência total de coliformes totais e termotolerantes -----	53
Tabela 15 – Média das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) nos respectivos meios de cultura por pontos de coleta-----	60
Tabela 16 – Bactérias identificadas nos pontos de coleta -----	62
Tabela 17 – Distribuição do número de colônias identificadas por pontos de coleta -----	64
Tabela 18 – Frequência (%) de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes, com resistência intermediária e a somatória das frequências de bactérias resistentes e intermediárias aos antibióticos utilizados -----	68
Tabela 19 – Frequência (%) de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes e intermediárias aos antibióticos utilizados distribuídos por pontos de coleta-----	76
Tabela 20 – Detecção de RNA de HAV através de <i>Nested</i> RT-PCR por pontos de coleta da ETE -----	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo cíclico de cepas resistentes em três ambientes propostos, considerando seleção, transferência genética e processos de disseminação-----	11
Figura 2 - Volume de esgoto coletado e tratado , segundo as grandes regiões – Brasil – 2000	15
Figura 3 – Detalhes de um estágio individual do reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASR) -- -----	19
Figura 4 – Diagrama das regiões do genoma do vírus da hepatite A -----	24
Figura 5 – Mapa mostrando a prevalência da hepatite A em várias regiões do mundo -----	26
Figura 6 – Dimensionamento do reator UASB -----	32
Figura 7 – Fluxograma geral do processo e das unidades de tratamento de esgoto -----	34
Figura 8 – Reator UASB-----	34
Figura 9 – Filtros anaeróbios -----	34
Figura 10 – Tergitol -7 -----	37
Figura 11 – EMB -----	37
Figura 12 – GSP -----	37
Figura 13 – Esquema das diluições empregadas na análise por cada ponto de coleta e meios de cultura utilizado-----	38
Figura 14 – Sistema de filtração -----	43
Figura 15 - Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Termotolerantes por 100 mL de amostra pelos respectivos pontos de coleta -----	53
Figura 16 - Frequência (%) de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes e com resistência intermediária aos antibióticos utilizados -----	69
Figura 17 – Resultados do <i>Nested</i> RT-PCR -----	79

LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AK – Amicacina

AMC – Amoxicilina e Ácido Clavulânico

AOX – Compostos Orgânicos Halogenados

AVE – *Elution Buffer*

AW 1 – *Washer Buffer 1*

AW 2 – *Washer Buffer 2*

BGN – Bacilo Gram Negativo

C - Cloranfenicol

CAQs – Compostos Quartenários de Amônio

cDNA – DNA complementar

CEDAE – Companhia Estadual de Água e Esgoto do Rio de Janeiro

CIP - Ciprofloxacina

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CN – Gentamicina

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

COT – Carbono Orgânico Total

CRO – Ceftriaxona

CTX - Cefotaxima

CV – Costa & Vernin

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DBO₅ – Demanda Bioquímica de Oxigênio a 5 dias

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DQO – Demanda Química de Oxigênio

E – Eficiência (%)

EMB – Eosina Azul de Metileno

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública

ESBL – β – Lactamase de Espectro Estendido

ETE – Estação de Tratamento de Esgotos

FEP - Cefepime

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FOX - Cefoxitina

GSP – *Glutamato Starch Phenol Red*

HAV – Vírus da Hepatite A

HCL – Ácido Clorídrico

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMP - Imipeném

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

MgCL₂ – Cloreto de Magnésio

MMLV – RT – *Moloney Murine Virus Reverse Transcription*

MR - Multirresistentes

NaOH – Hidróxido de Sódio

NMP – Número Mais Provável

OMP – Proteína de Membrana Externa

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RNA – Ácido Ribonucléico

RNA_r – RNA ribossômico

RNA_t – RNA Transportador

RT – PCR – *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*

SIM – Sulfato/ Indol/ Motilidade

SS – Sólidos Suspensos

SST – Sólidos Suspensos Totais

SXT – Sulfametoxazol – Trimetoprim

TE - Tetraciclina

TTC – Cloreto de Trifeniltetrazólico

UASB – *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* em português (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo)

UERJ – Universidade Estadual do Rio de Janeiro

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UNT – Unidade de Turbidez Nefelométrica

RESUMO

O presente trabalho abrange a discussão sobre as características microbiológicas de esgotos hospitalares, bem como os impactos do lançamento destes efluentes sem um pré-tratamento adequado em corpos receptores, cujos riscos associados incluem a disseminação de microrganismos patogênicos no ambiente. Desta forma, estudou-se a eficiência de um sistema de tratamento de esgoto hospitalar localizado na cidade do Rio de Janeiro, para verificar se o mesmo era capaz de eliminar coliformes totais e fecais, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos e vírus da hepatite A. O sistema experimental se constitui de uma unidade de reator UASB seguido de pós-tratamento por três filtros anaeróbios dispostos em série, conferindo-lhe uma característica particular. Também teve como meta a verificação da adequação de uma técnica para detectar vírus da hepatite A em amostras de esgoto e lodo de esgoto. Concluiu-se que o sistema de tratamento estudado não foi capaz de eliminar os coliformes totais e fecais, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias resistentes do efluente tratado. Entretanto, nenhum vírus da hepatite A foi detectado no efluente final tratado, indicando que este sistema pode ser eficiente na remoção de vírus patogênicos. Também foi possível concluir que no efluente hospitalar há uma frequência alta de bactérias resistentes a antibióticos: 44,18% das *Klebsiella pneumoniae* detectadas foram resistentes contra a gentamicina, 27,9% foram resistentes contra ceftriaxona e cefoxitina, 46,51% foram produtoras de β – lactamases de espectro estendido (ESBLs) e 32,5% foram multirresistentes aos antibióticos utilizados. Os antibióticos mais efetivos, que apresentaram 93,03% de susceptibilidade bacteriana foram: cefepime, cloranfenicol e ciprofloxacina. Estes resultados confirmam a emergência do problema da alta prevalência de bactérias resistentes a antibióticos nos hospitais, bem como em amostras ambientais.

Palavras - chave: Esgoto hospitalar, lodo de esgoto, bactérias resistentes a antibióticos, vírus da hepatite A, métodos de detecção, sistema de tratamento de esgoto.

ABSTRACT

The present work is concerned about discussion on the microbiological characteristics of the hospitals wastewater, as well as the impacts of the effluents discharging without a suitable pre-treatment in the receptors bodies, whose associated risks include the dissemination of environmental pathogens microorganisms. Thus, we have studied the efficiency of the hospitals wastewater treatment system in Rio de Janeiro city to verify if it could eliminate the coliforms, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotics resistant *Klebsiella pneumoniae* and hepatitis A virus (HAV). The experimental system is composed of the UASB reactor unity followed of the three anaerobic filters disposed in series, providing particular characteristics to the assembly. Also, other aiming of the work was the verification of the method to detect HAV in sludge and sewage samples. We have concluded that the treatment system couldn't eliminate the coliforms, *Pseudomonas aeruginosa* and resistant bacterial of the final effluent. However, none hepatitis A virus was detect at that point, indicating that the present system may be efficient on these pathogens viruses removal. Also was possible to conclude that in hospitalar effluents there is a high quantity of the antibiotics resistant bacterial: 44,18% *Klebsiella pneumoniae* detect were resistant against the gentamicina, 27,9% were resistant against ceftriaxona and cefoxitina, 46,51% were producers of extended espectre β – lactamases (ESBLs) and 32,5% were antibiotics multiresistant utilized. The most effective antibiotics, that presented 93,03% of bacterial susceptibility were: cefepime, cloranfenicol and ciprofloxacin. These results confirmed risky and serious emergency problems of antibiotics resistant bacterial on hospitals and environmental samples.

Key-words: wastewater hospitals, sludge, antibiotics resistant bacterial, hepatitis A virus, methods of the detection, wastewater treatment system.

1 - INTRODUÇÃO

Até recentemente não havia no Brasil uma preocupação efetiva com relação ao gerenciamento e ao descarte adequado dos resíduos gerados pelos estabelecimentos de assistência à saúde, bem como para as águas residuárias provenientes destes locais. Com o aumento da carga poluidora nos corpos hídricos e devido às condições bastante favoráveis no país à propagação de doenças veiculadas pela água, cada vez mais vem sendo dada ênfase para a necessidade do controle ambiental. As pesquisas estão sendo direcionadas à avaliação das características destes tipos de efluentes e dos impactos reais que o descarte inadequado, ou o não tratamento dos mesmos, poderiam gerar no ecossistema aquático.

Muitos estudos têm apontado que os efluentes hospitalares possuem altas concentrações de substâncias tóxicas, tais como antibióticos, agentes citostáticos, metais pesados, desinfetantes, hormônios e bactérias resistentes aos antimicrobianos, os quais podem se disseminar no meio ambiente (KUMMERER, 2001; MEIRELLES-PEREIRA et al, 2002; REINTHALER et al, 2003; SCHWARTZ et al, 2003; EMMANUEL et al, 2005).

A preocupação com a disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos se refere, sobretudo, à infecção hospitalar. Estudos realizados em hospitais brasileiros têm detectado altas taxas de infecção hospitalar no país (GALLES et al, 1997; DE MORAIS et al, 2000; VILLAS BÔAS et al, 2004; SILVA et al, 2006).

Além de bactérias resistentes, os efluentes hospitalares também contêm outros tipos de microrganismos patogênicos e que podem ser veiculados através dos corpos receptores caso não haja um tratamento adequado destes efluentes. Indicadores da poluição viral das águas, tais como enterovírus e adenovírus, também têm sido identificados em efluente hospitalar (GAUTAM et al, 2006). A detecção de vírus patogênicos em amostras ambientais vem sendo realizada através de metodologias específicas, estando o vírus da hepatite A entre os microrganismos analisados.

A infecção pelo vírus da hepatite A é recorrente em várias regiões do mundo, mas, a prevalência da doença é mais comum nos países em desenvolvimento, pois ela está muito associada com as condições socioeconômicas e de saneamento básico de cada localidade, sendo transmitida, principalmente, através da água e alimentos contaminados. Ainda que a incidência da doença venha decrescendo no Brasil, surtos da doença continuam a ocorrer (VILLAR^b et al, 2002). Uma das alternativas de controle da contaminação ambiental seria a melhoria dos serviços de saneamento básico oferecidos no país e o desenvolvimento de tecnologias apropriadas e eficientes na remoção de tais microrganismos.

Desta forma, um sistema de tratamento de esgoto hospitalar no Rio de Janeiro foi escolhido para o estudo da caracterização de alguns microrganismos presentes em tais efluentes. O sistema de tratamento anaeróbio é constituído de uma unidade de reator UASB (*Upflow Anaerobic*

Sludge Blanket) seguido de pós-tratamento por três filtros anaeróbios dispostos em série. A implantação de sistemas combinados de tratamento formados por reatores UASB seguidos de pós-tratamento vem sendo incentivada no Brasil (CHERNICHARO, 1997).

O sistema de pós-tratamento composto por três unidades de filtros anaeróbios é raro na literatura, pois, o pós-tratamento de reatores UASB por filtros anaeróbios, geralmente envolve apenas uma unidade de filtro. Desta forma, é necessária a obtenção de dados da eficiência deste sistema na remoção de alguns parâmetros, tais como microrganismos patogênicos. Além da particularidade do projeto da estação, ainda há a especificidade do tipo de efluente tratado. As características destes efluentes hospitalares e os dados da eficiência dos sistemas de tratamento que operam em escala real ainda são pouco conhecidos no Brasil.

Diante da problemática apresentada, o presente estudo teve como objetivo geral detectar a população de coliformes, de *Pseudomonas aeruginosa*, de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos e vírus da hepatite A presentes nos diversos estágios de um sistema de tratamento de esgoto hospitalar. Este estudo teve o intuito de verificar se o sistema foi capaz de remover estes agentes patogênicos, contribuindo para o controle da disseminação destes microrganismos no ambiente.

Um dos objetivos específicos da pesquisa foi verificar se a técnica utilizada para concentrar o vírus da hepatite A, inicialmente desenvolvida para concentrar vírus em amostras de água do mar, foi adequada para detectar estes agentes em amostras de esgoto e lodo de esgoto. Outro objetivo específico foi verificar se o meio de cultura Tergitol – 7, utilizado para a detecção e a enumeração de bactérias do grupo coliforme em amostras de água e alimentos, foi adequado para quantificar e detectar estes microrganismos nas amostras de esgoto e lodo de esgoto.

Além disso, uma particular atenção foi dada para a detecção de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos, pois, foi possível avaliar o perfil de resistência bacteriana, além da obtenção de dados sobre a frequência de bactérias resistentes em tais ambientes.

O monitoramento destes microrganismos permitiu o conhecimento mais específico da população de alguns agentes patogênicos presentes nos efluentes hospitalares e quais são persistentes ao processo de tratamento de esgoto empregado. A questão do risco de contaminação associado com a emissão de agentes patogênicos em determinados ambientes é extensivamente abordado nesta pesquisa, bem como a melhoria da saúde pública através da pesquisa de resíduos provenientes de estabelecimentos de assistência à saúde.

Na primeira parte do trabalho é apresentada uma revisão sobre as características dos esgotos hospitalares, bem como os impactos do lançamento destes efluentes sem um pré-tratamento em corpos receptores ou em redes coletoras de esgoto sem que exista um pós-

tratamento. Foram descritas também algumas alternativas específicas para o tratamento de tais efluentes. Foi dado um enfoque nas metodologias recentemente mais utilizadas na detecção de vírus em amostras ambientais, e também para as características estruturais e a epidemiologia do vírus da hepatite A.

Na segunda parte é descrita a localização, a caracterização do sistema de tratamento de esgoto, a amostragem, além dos parâmetros físico-químicos obtidos durante o período estudado. Também foram descritas as metodologias para a detecção de coliformes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos e vírus da hepatite A.

A terceira parte contém os resultados obtidos e envolve a discussão sobre a eficiência da estação de tratamento na remoção dos microrganismos de interesse, a adequação das metodologias utilizadas para detectar bactérias do grupo coliforme e vírus da hepatite A e o perfil de resistência antimicrobiana encontradas nas bactérias da espécie *Klebsiella pneumoniae* identificadas nas diversas etapas do processo de tratamento.

A conclusão destes resultados consta na parte final do presente estudo.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Características do Esgoto Hospitalar

Nos estabelecimentos de assistência à saúde, entre eles hospitais e postos de saúde, há uma constante geração de resíduos, um consumo de água elevado e o conseqüente descarte de efluentes que necessitam de uma destinação adequada.

Os hospitais consomem um volume importante de água por dia. O consumo de água doméstico mínimo é de 100 L/pessoa/dia, enquanto os valores demandados pelos hospitais geralmente variam de 400 a 1200 L/leito/dia. Estes importantes consumos de água pelos hospitais representam volumes significativos de esgoto (EMMANUEL et al, 2005; GAUTAM et al, 2006).

A geração de efluentes líquidos nos estabelecimentos de saúde provém de diversas atividades, entre elas: águas de lavagem de vestimentas, de objetos de uso pessoal, de procedimentos clínicos, dos funcionários de serviços de saúde, dos visitantes destes serviços e dos pacientes. Os serviços de saúde geram também efluentes das águas servidas de refeitórios, de higienização de áreas administrativas, bem como das instalações sanitárias de funcionários, podendo conferir ao esgoto hospitalar muitas características semelhantes aos esgotos domésticos (GUEDES e VON SPERLING, 2005).

Um estudo comparando águas residuárias de serviços de saúde e águas residuárias urbanas em Montes Claros, Minas Gerais, com relação a alguns parâmetros sanitários, tais como: DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), DQO (Demanda Química de Oxigênio), SST (Sólidos Suspensos Totais), temperatura, alcalinidade, fósforo total, nitrogênio amoniacal, óleos e graxas, oxigênio dissolvido, pH, surfactantes, coliformes totais e *E. coli*, demonstrou que, para as análises de surfactantes, coliformes totais e *E.coli*, não ocorreram diferenças significativas nos efluentes, indicando a similaridade entre os esgotos domésticos e hospitalares. Para os outros parâmetros ocorreram diferenças, mas, nestes casos, as concentrações médias dos esgotos domésticos foram mais elevadas do que aquelas dos esgotos hospitalares (GUEDES e VON SPERLING, 2005).

Entretanto, algumas características são atribuídas ao esgoto hospitalar, tais como uma grande concentração de agentes citostáticos, medicamentos, metais pesados, desinfetantes, hormônios, reagentes contendo cloro e radioisótopos (KUMMERER, 2001; EMMANUEL et al, 2005; GAUTAM et al, 2006). Muitas destas substâncias presentes nos esgotos hospitalares são frequentemente tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas e podem comprometer o equilíbrio do ecossistema aquático.

A Tabela 1 mostra os principais grupos de substâncias presentes no esgoto hospitalar e que merecem uma atenção especial.

Tabela 1. Compostos presentes no esgoto hospitalar e as suas características

Compostos presentes no esgoto hospitalar	Características
<ul style="list-style-type: none">▪ Agentes citostáticos	<ul style="list-style-type: none">▪ Frequentemente carcinogênicos, mutagênicos ou embriotóxicos
<ul style="list-style-type: none">▪ Antibióticos e desinfetantes	<ul style="list-style-type: none">▪ Toxicidade bacteriana e potencial para promover resistência bacteriana
<ul style="list-style-type: none">▪ Hormônios	<ul style="list-style-type: none">▪ Desreguladores endócrinos
<ul style="list-style-type: none">▪ Clorofenóis e outros reagentes que liberam cloro, meios de diagnósticos como meios de contraste de raios – X contendo iodeto orgânico	<ul style="list-style-type: none">▪ Contribuem para a adsorbância de compostos halogenados orgânicos (AOX). Estes são frequentemente não biodegradáveis e se difundem no ambiente aquático e /ou entram na cadeia alimentar
<ul style="list-style-type: none">▪ Metais pesados	<ul style="list-style-type: none">▪ Mercúrio (Hg) presente em desinfetantes (ingredientes ativos, ex: Mercurochrom®, Nitromersol), agentes citostáticos contendo platina (Pt) ou meios de contraste de ressonância magnética contendo gadolínio (Gd): não são facilmente degradados e são altamente tóxicos em alguns estados oxidativos

Fonte: KUMMERER, 2001.

Muitas destas substâncias, incluindo grandes quantidades de desinfetantes são usadas nos hospitais para desinfetar as superfícies, os instrumentos e a pele de pacientes, entre outros.

Álcoois e aldeídos, bem como compostos contendo cloro são usados como ingredientes ativos. Também são usados compostos quaternários de amônio (CAQs) que são microbicidas

catiônicos largamente usados nos desinfetantes para a limpeza de superfícies. Eles são um dos mais importantes ingredientes ativos ao lado de álcoois e aldeídos. Os CAQs são conhecidos por serem efetivos contra os microrganismos aquáticos, mesmo em baixas concentrações. Os efeitos inibitórios contra bactérias denitrificantes têm sido medidos em concentrações abaixo de 1 a 2 mg/L (WAGNER e KAYSER, 1991 *apud* KUMMERER, 2001).

Efeitos sinérgicos negativos no ecossistema aquático decorrentes da combinação de glutaraldeído (composto químico volátil, tóxico e irritante) presente nos desinfetantes com surfactantes (aniônicos, catiônicos e não-iônicos) encontrados no esgoto, resultaram na toxicidade aguda para a bactéria *Vibrio fischeri* e *Daphnia sp.* (EMMANUEL et al, 2005 b).

Uma outra discussão importante em relação ao descarte de efluentes hospitalares e de serviços de saúde sem um tratamento adequado é que eles podem apresentar grandes quantidades de microrganismos potencialmente patogênicos, dos quais os mais relevantes seriam as bactérias resistentes a antibióticos e que parecem estar em maiores concentrações nestes efluentes quando comparados com efluentes provenientes de outras fontes geradoras (MEIRELLES-PEREIRA et al., 2002., REINTHALER et al, 2003., SCHWARTZ et al, 2003., CONSTANZO et al, 2005).

Há uma crescente preocupação na saúde pública relativa à disseminação e ao aumento de bactérias resistentes a antibióticos, que implicam diretamente no tratamento e na cura das infecções.

A resistência bacteriana é um problema médico crescente em todo o mundo, gerado pelo processo seletivo conseqüente do uso massivo de antibióticos. Na Austrália, é estimado um consumo de antibióticos de 700 000 Kg/ano. Na Alemanha, em 1999, 411 toneladas de antibióticos foram usadas em aplicações humanas, sendo que 105 toneladas foram consumidas nos hospitais. Esta quantidade representou aproximadamente 26% do consumo total. Calcula-se que entre 30% e 90% das doses administradas de antibióticos são excretadas na urina como substâncias ativas e, considerando as taxas de excreção destes produtos não metabolizados, significa que o volume de antibióticos descarregados dentro do esgoto é bastante elevado (KUMMERER, 2001; CONSTANZO et al, 2005).

O maior problema é que estes medicamentos geralmente apresentam baixa biodegradabilidade e frequentemente podem atingir as águas superficiais. Kummerer et al (2000) verificaram que ciprofloxacina, ofloxacina e metronidazol não apresentaram biodegradabilidade em testes de garrafa fechada. A degradação dos antibióticos, quando ocorre no meio ambiente, pode estar mais associada com os processos de eliminação não-biótica, como adsorção e hidrólise (KUMMERER et al, 2000).

Entretanto, ainda pouco é conhecido sobre a eliminação ou a persistência de antibióticos no meio ambiente, mas o fato é que muitas destas substâncias podem se dirigir para os corpos hídricos, mesmo após o tratamento do esgoto hospitalar. Brown et al (2005) determinaram a ocorrência de antibióticos em efluentes hospitalares, residenciais, municipais, de indústrias de ração animal e nas águas do Rio Grande (Novo México), que recebia esgotos da estação de tratamento de Albuquerque.

No efluente hospitalar foi detectado um maior número de antibióticos: sulfametoxazol, trimetoprim, ciprofloxacina, ofloxacina, lincomicina e penicilina G. Nos sítios de amostra residencial, ofloxacina foi encontrado no efluente de um asilo, enquanto numa república de estudantes, nenhum antibiótico foi detectado. Somente lincomicina foi encontrado no efluente industrial. No esgoto municipal foi detectado sulfametoxazol, trimetoprim, ciprofloxacina e ofloxacina (BROWN et al., 2005).

Em ambos os esgotos, bruto e tratado, foram detectados sulfametoxazol, trimetoprim e ofloxacina em concentrações de 110 a 470 ng/L. Nenhum antibiótico foi detectado no Rio Grande a montante da descarga de efluentes da ETE de Albuquerque e sulfametoxazol foi detectado no Rio Grande a jusante da descarga do efluente da ETE de Albuquerque, indicando a contaminação do rio por este medicamento (BROWN et al., 2005).

Constanzo et al, 2005, também avaliaram a presença de três antibióticos (ciprofloxacina, norfloxacina e cefalexina) em vários estágios de um sistema de tratamento de esgoto na Austrália e à jusante (0 m, 50 m, 500 m) do ponto de descarga deste esgoto em um rio. As concentrações obtidas nos vários pontos analisados estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração de antibióticos em diferentes estágios do tratamento de esgoto e nos pontos do rio receptor

Pontos de coleta	Ciprofloxacina (ng/l)	Norfloxacina (ng/l)	Cefalexina (ng/l)
Afluente	90	NT	2000
Bioreator	154,8	192	316,4
Efluente	132,2	210	78,2
Rio – 0 m	41,5	80	15,4
Rio – 50 m	23	32	20,4
Rio – 500 m	ND	ND	26,8

Fonte: CONSTANZO, et al, 2005.

NT = não testado, ND = não detectado

Os resultados mostraram que os níveis de remoção dos antibióticos através do processo de tratamento foram muito variáveis. A cefalexina (o segundo antibiótico mais prescrito na Austrália) foi encontrada em altas concentrações no afluente, entretanto, apresentou menor concentração no efluente, indicando taxas altas de remoção. Mas, ele foi persistente nas águas do corpo receptor por até 500 m após o lançamento. As taxas de desnitrificação no sistema de tratamento de esgoto ficaram comprometidas de acordo com o tipo de antibiótico e da concentração, afetando as bactérias desnitrificantes Gram negativas, como *Nitrosomonas sp.* (CONSTANZO et al, 2005).

Os padrões de resistência a antibióticos também variaram entre os pontos de coleta analisados. Da água do rio, a cepa de *E.coli* analisada foi resistente a somente um antibiótico: ampicilina, enquanto aquelas isoladas do processo de tratamento foram resistentes contra eritromicina, ampicilina e tetraciclina, indicando que os antibióticos presentes em maiores concentrações no sistema de tratamento de esgoto são capazes de promover o aumento de resistência bacteriana ou selecionar bactérias resistentes (CONSTANZO et al, 2005).

As bactérias Gram negativas da família *Enterobacteriaceae*, principalmente aquelas multirresistentes aos antibióticos, são apontadas como um dos principais grupos de microrganismos que causam infecção hospitalar. Elas são comuns nas infecções do trato urinário, nas infecções da corrente sanguínea e infecções intra-abdominais (PATERSON, 2006).

Alguns microrganismos importantes por causarem infecções humanas, tais como os Bacilos Gram Negativos (BGN), incluindo enterobactérias, tais como *Enterobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae* e outros BGNs como os não-fermentadores de glicose (ex. *Pseudomonas aeruginosa*), podem persistir por longos períodos no meio ambiente e também podem sobreviver a baixas concentrações de antibióticos presentes na água (MEIRELLES-PEREIRA et al., 2002).

Três fatores têm contribuído para o desenvolvimento e a difusão de resistência bacteriana:

- mutação em genes comuns que estendem seu espectro de resistência (CONSTANZO et al, 2005);
- transferência horizontal de genes resistentes entre os microrganismos;
- ambientes seletivos que aumentam a prevalência de organismos resistentes (SCHWARTZ et al, 2003; EMMANUEL et al, 2005).

Meirelles-Pereira et al (2002) compararam as concentrações de bactérias resistentes a antibióticos entre os esgotos domésticos, hospitalar (Hospital Universitário Pedro Ernesto, no Rio de Janeiro) e da zona limnética de três lagoas (Cabiúnas, Imboassica e Geribá, no Estado do Rio de

Janeiro). Das bactérias analisadas, somente no esgoto hospitalar foram encontradas cepas multirresistentes aos antibióticos. Os resultados do antibiograma reforçam a idéia do ambiente seletivo atuando no aumento da freqüência ou na disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos.

Da mesma forma, Schwartz et al (2003) analisaram bactérias resistentes a antibióticos e seus genes de resistência em amostras de esgoto municipal e hospitalar, de águas superficiais e de águas de abastecimento público. Concluíram que *Enterococcus* resistentes à vancomicina e *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases foram cultivadas em todos os ambientes e encontradas menos frequentemente nas águas superficiais. Além disso, o gene de resistência à vancomicina (*vanA*) de *Enterococcus*, o gene de resistência à meticilina (*mecA*) de *Staphylococcus* e o gene de resistência aos β -lactâmicos (*ampC*) de *Enterobacteriaceae* foram amplificados por PCR predominantemente do esgoto hospitalar.

A forte ocorrência de ambientes seletivos, tais como efluentes de hospitais, levam ao aumento na freqüência de genes bacterianos que expressam fenótipos resistentes a estes medicamentos. A falta de saneamento nas comunidades pode levar ao estabelecimento de rotas de disseminação destes microrganismos e dos elementos genéticos (MEIRELLES-PEREIRA et al., 2002).

Um modelo cíclico das inter-relações entre determinados ambientes na seleção de bactérias resistentes a antibióticos ou na transferência de genes de resistência está expresso na Figura 1, indicando como os efluentes hospitalares podem contaminar os corpos receptores e causar prejuízos para a comunidade.

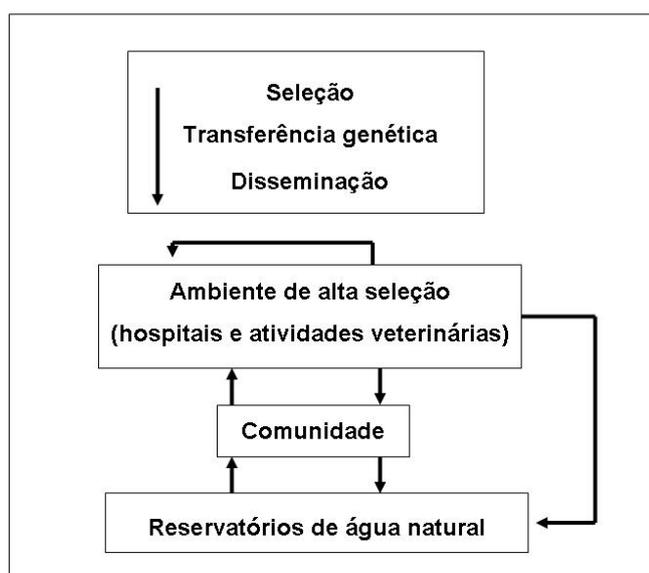


Figura 1. Modelo cíclico de cepas resistentes por três ambientes propostos, considerando seleção, transferência genética e processos de disseminação.

Fonte: MEIRELLES - PEREIRA et al; 2002.

O impacto do lançamento de efluentes hospitalares sem um pré-tratamento em corpos receptores será discutido adiante.

2.2 - Impacto do lançamento de efluentes hospitalares sem um pré-tratamento

Na França, um estudo de risco ambiental decorrente do descarte de efluentes hospitalares sem um tratamento adequado dentro da rede de coleta pública foi realizado. Promoveram-se duas campanhas de amostragem (2001 e 2002) nos efluentes originários do Departamento de Doenças Tropicais e Infecciosas (ITDD), com capacidade de 144 leitos. O esgoto foi coletado antes de entrar na rede de esgoto hospitalar, o qual recebe o volume total dos efluentes de vários departamentos do hospital, desembocando na rede de esgoto urbana sem um pré-tratamento (EMMANUEL et al, 2005).

Os parâmetros físico-químicos e biológicos analisados foram: pH, SST, DBO, DQO e COT (carbono orgânico total), coliformes e um ensaio de ecotoxicidade (EMMANUEL et al, 2005). A caracterização do esgoto hospitalar está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização Físico-química e microbiológica do esgoto hospitalar de ITDD (França)

Parâmetros	concentrações 2001	concentrações 2002	Valores de referência	Referência
pH (U)	8,8	8,2	-	-
Cloro (mg/ L)	359	127,1	-	-
SST (mg/L)	298	236	-	-
DBO₅ (mg/ L)	1559	1530	30	MATE ¹
DQO (mg/ L)	2516	2664	125	MATE ¹
COT (mg/ L)	350	3095	-	-
NH₄⁺ (mg/ L)	ND *	68	-	-
Bactérias fecais (NMP/100ml)	2 x 10 ³	1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁸	Barkay et al, 1995

Fonte: EMMANUEL et al, 2005.

* ND: não determinado

¹ MATE (Ministere de l'aménagement du territoire et de l'environnement – J. Officiel de la France 1998, 52/3247)

O pH em todas as amostras analisadas estava sempre alcalino (7,7 a 8,8). De todas as amostras analisadas, as concentrações de SST alcançaram 155 a 298 mg/ L e foram menores do que os valores de 100 a 350 mg/ L proposto para o esgoto doméstico (METCALF & EDDY, 1991 *apud* EMMANUEL et al, 2005). As concentrações de cloro de 47 a 359 mg/ L foram maiores do que os propostos para esgoto urbano convencional. Estas diferenças podem estar relacionadas a importantes quantidades de desinfetantes contendo cloro usado nos hospitais (EMMANUEL et al, 2005).

Nas amostras do efluente, as concentrações de DBO alcançaram de 200 a 1559 mg/ L e foram maiores do que os valores obtidos para esgoto hospitalar. A mesma observação foi obtida para a análise de DQO (alcance de 362 a 2664 mg/ L), SST (155 a 298 mg/ L) e COT (160 a 3095 mg/ L). Os valores obtidos para estes parâmetros também foram maiores do que os valores propostos por Metcalf e Eddy (1991) para esgotos domésticos (EMMANUEL et al, 2005).

A toxicidade detectada sobre os organismos aquáticos pode ser atribuída a importantes valores de NH_4^+ (28 a 68 mg/ L) presentes nas amostras e às elevadas concentrações de DQO encontradas. As comunidades aquáticas poderiam ser adversamente afetadas pela amônia em concentrações totais maiores que 1,04 mg/ L. O estudo concluiu que os efluentes hospitalares se constituem em uma importante fonte de contaminação (EMMANUEL et al, 2005).

No Brasil, devido à preocupação com a geração e o gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) e às implicações decorrentes da emissão de carga poluidora no meio ambiente, foi criada uma legislação específica instituída na Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº306 de 10 de dezembro de 2004, da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde, estabelecendo que: *Os resíduos líquidos provenientes de esgoto e de águas servidas de estabelecimentos de saúde devem ser tratados antes do lançamento no corpo receptor ou na rede coletora de esgoto, sempre que não houver sistema de tratamento de esgoto coletivo atendendo a área onde está localizado o serviço* (ANVISA, 2005).

Entretanto, ainda que as localidades sejam servidas pela rede pública de coleta de esgoto, o tratamento prévio destes efluentes pelos estabelecimentos de saúde é sempre uma alternativa para minimizar as concentrações de carga poluidora na rede pública, contribuindo, desta forma, para reduzir os custos finais de tratamento de esgoto.

Também se deve levar em consideração a situação das condições de saneamento dos municípios brasileiros, cuja maioria não dispõe de serviços de esgotamento sanitário adequado.

Entre os serviços de saneamento básico, o esgotamento sanitário é o que tem menor presença nos municípios brasileiros. Em 2000, dos 5.507 municípios avaliados pela Pesquisa

Nacional de Saneamento Básico (PNSB), realizada pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) apenas 52,2% destes eram servidos com algum tipo de serviço de esgotamento sanitário. (IBGE – 2002).

A Tabela 4 apresenta a proporção de municípios, por condição de esgotamento sanitário, segundo as grandes regiões no Brasil, em 2000 (IBGE, 2002).

Tabela 4. Proporção de municípios, por condição de esgotamento sanitário, segundo as grandes regiões - 2000

Grandes Regiões	Proporção de Municípios, por Condição de Esgotamento Sanitário (%)		
	Sem coleta	Só coletam	Coletam e Tratam
Brasil	47,8	32	20,2
Norte	92,9	3,5	3,6
Nordeste	57,1	29,6	13,3
Sudeste	7,1	59,8	33,1
Sul	61,1	17,2	21,7
Centro-Oeste	82,1	5,6	12,3

Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Departamento de População e Indicadores Sociais, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 1989/2000.

Além da insuficiência dos serviços de esgotamento sanitário no país, sobretudo nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, os volumes de esgoto efetivamente tratados são muito irrisórios. A Figura 2 mostra as discrepâncias entre os volumes de esgoto que são coletados e aqueles que são tratados, mesmo nas regiões mais desenvolvidas do país.

Outro dado bastante desalentador é que nas regiões brasileiras que não tratam seus esgotos, estes são despejados *in natura* nos corpos receptores, principalmente nos rios, comprometendo a qualidade da água utilizada para o abastecimento, a irrigação e a recreação (IBGE – PNSB – 2002).

Portanto, o tratamento de esgoto hospitalar se torna ainda mais relevante se forem trazidas à discussão as condições de saneamento básico existentes no Brasil, bem como as características destes efluentes. A alta concentração de substâncias tóxicas e microrganismos

potencialmente patogênicos podem ser persistentes no ambiente. Para controlar os níveis de poluição provenientes de efluentes de estabelecimentos de assistência à saúde, algumas alternativas para o tratamento dos mesmos têm sido propostas.

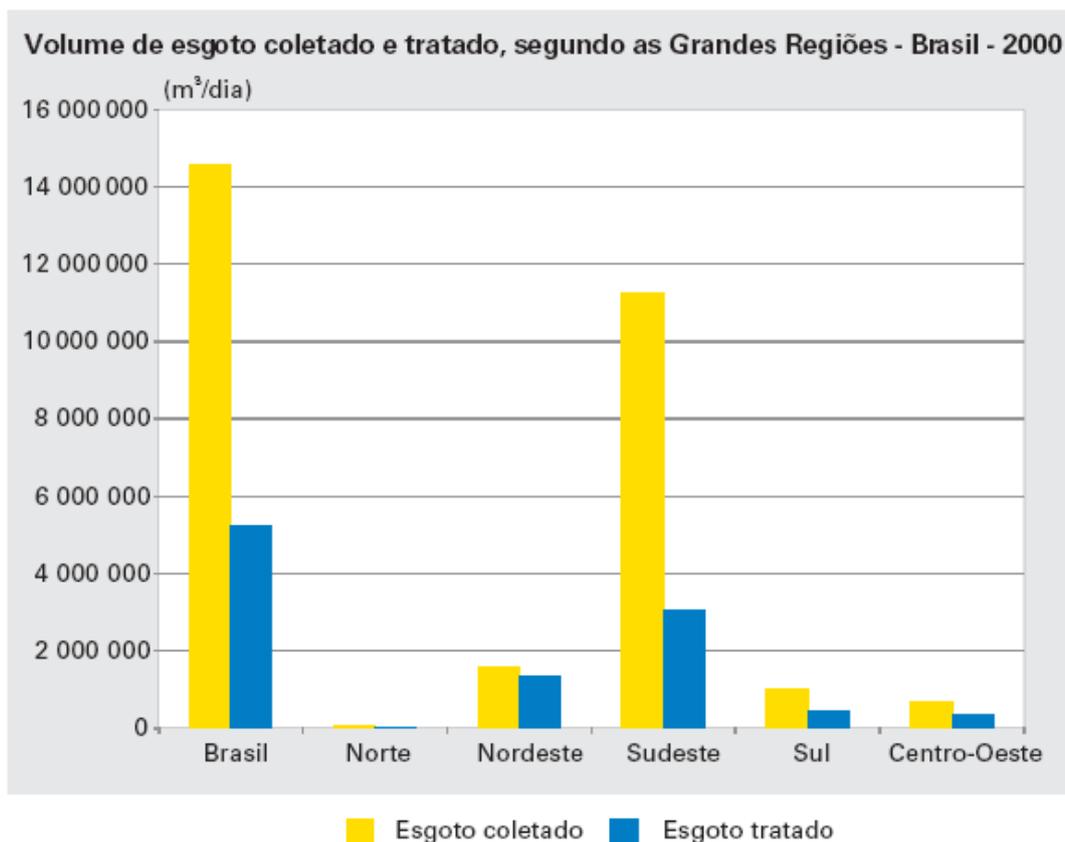


Figura 2. Fonte: IBGE, Diretoria de pesquisas, coordenação de população e indicadores sociais, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico – 2002

2.3 - Alternativas para o tratamento de esgotos hospitalares

Apesar da preocupação crescente com o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde, pouca atenção vinha sendo dada para o esgoto gerado nestes estabelecimentos, assim como para o seu tratamento e descarte adequados (GAUTAM et al, 2006). Entretanto, devido aos altos níveis de poluição ambiental, estudos sistemáticos sobre a caracterização e os impactos do lançamento de efluentes hospitalares em corpos receptores sem um tratamento adequado estão sendo realizados recentemente, principalmente nos países desenvolvidos.

Devido à presença de medicamentos e de substâncias tóxicas contidas em grandes concentrações nos esgotos hospitalares, vários sistemas alternativos aos convencionais vêm sendo propostos para realizar o tratamento destes efluentes.

Na China, um sistema de bioreator de membrana submersa foi utilizado em escala real para o tratamento de um esgoto hospitalar da comunidade de Haidian. O bioreator possuía um volume de 6 m³ e foi dividido em duas partes iguais por uma placa. Um conjunto de 24 módulos de membranas de polietileno (Mitsubishi Raygon Co. Ltd. Japão), com tamanhos de poro de 0,4 µm, foram colocadas em cada lado das placas, perfazendo um volume total de área de membrana de 96 m². Tubos de aeração foram colocados sob os módulos da membrana para fornecer oxigênio à massa microbiana e para facilitar a pressão exercida pela bomba de água.

Utilizou-se um sensor de nível de água para controlar a bomba do afluente e para manter o nível hídrico constante no bioreator. Um sensor monitorou a pressão transmembrana durante um longo período de operação e o esgoto hospitalar do tanque de alimentação foi bombeado para o bioreator, permitindo com que o mesmo passasse através de uma tela fina; o efluente era removido através da membrana por uma bomba de sucção. O lodo utilizado proveio de um tanque de sedimentação secundário de um sistema de tratamento de esgoto de Pequim. O tempo de retenção hidráulica no reator foi de 7,2 horas. A composição do esgoto hospitalar e o padrão para o descarte de lodo hospitalar preconizado pelas autoridades sanitárias da China, estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5. Características do esgoto bruto e do efluente tratado

Parâmetros	Afluente	Efluente	Padrão *
DQO (mg/l)	48 – 277,5	< 30	150
DBO ₅ (mg/l)	20 – 55	< 0,4	100
NH ₄ ⁺ - N (mg/l)	10,1 – 23,7	< 1	25
Turbidez (UNT)	6,1 – 27,9	< 4	-
Temperatura	14 – 20	16 – 18	< 55
pH	6,2 – 7,1	6,2 – 7,1	6 - 9
Bactérias (número/ 100 ml)	9,9 x 10 ³	-	-
<i>E.coli</i> (número/100ml)	> 1600	< 23	< 50

Fonte: WEN et al, 2004.

* GBJ48-83: Padrão para o descarte de esgoto hospitalar. NTU: Unidade Nefelométrica de Turbidez

A eficiência de remoção de DQO, NH₄⁺ e turbidez foi 80, 93 e 83% respectivamente. O efluente não apresentava cor e odor. O sistema apresentou uma alta eficiência de remoção de

amônia e a produção de lodo foi baixa e estável, nenhum lodo foi descartado em 6 meses de operação do sistema. A pressão transmembrana aumentou sensivelmente após o período de 100 dias depois da partida inicial do sistema. Considerou-se que este tipo de sistema é adequado e eficiente no tratamento do esgoto hospitalar analisado. Entretanto, o próprio estudo indica que não foi possível medir a eficiência deste sistema na remoção de vírus patogênicos (WEN et al, 2004).

Outra opção de tratamento de esgoto hospitalar foi proposta por Gautam et al, em 2006. O tratamento proposto foi o físico-químico, através de coagulação com cloreto férrico (FeCl_3), seguido por uma etapa posterior de filtração e outra de desinfecção utilizando concentrações apropriadas de cloro como agente desinfetante. Os experimentos foram realizados em aparato de *jar test*, em laboratório, utilizando-se um efluente de esgoto hospitalar (GAUTAM et al, 2006). As concentrações de alguns parâmetros avaliados no esgoto bruto e após as etapas de tratamento, estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Concentração de alguns parâmetros avaliados durante o processo de tratamento de esgoto hospitalar

Parâmetros	Esgoto bruto	Após coagulação	Após desinfecção
pH	7,36	6,76	7,4
SST (mg/ L)	531	42	12
DQO (mg/ L)	1067	388	16
Bactérias heterotrófica (UFC/ mL)	$7,5 \times 10^7$		42×10^4

Fonte: GAUTAM et al, 2006.

A dose ótima requerida de cloreto férrico utilizada foi 200 mg/ L. Da DQO inicial de 1067 mg/ L, ocorreu uma redução para 388 mg/ L. O pH foi reduzido para 6,76 como resultado da coagulação. Como a concentração de sólidos suspensos foi de 42 mg/ L, mesmo após o tratamento primário anterior, um processo de filtração foi realizado para que o esgoto pudesse passar pelo processo de desinfecção de maneira mais eficiente. Para o processo de desinfecção, uma dose ótima de 20 mg/ L em um período de contato de 30 minutos com hipoclorito de cálcio foi considerada a mais eficiente. A DQO foi reduzida para 16 mg/ L. De modo geral, o processo apresentado foi considerado eficiente para o tratamento de esgoto hospitalar. Entretanto, os autores recomendam que mais estudos sejam realizados para corroborar os resultados apresentados (GAUTAM et al, 2006).

Outra opção de tratamento físico-químico poderia ser a ozonização seguida da adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este tratamento foi eficaz para degradar alguns antibióticos e compostos aromáticos de um esgoto que continha altas concentrações destas substâncias (BALCIOGLU et al, 2003).

Entretanto, a aplicação de ozônio para a desinfecção de microrganismos contidos no esgoto hospitalar não parece ser a melhor opção, assim como verificado por Silveira et al, 2005.

Silveira et al (2005) analisaram a desinfecção por ozônio dos coliformes presentes em esgotos hospitalares e domésticos, concluindo que a adição de $200 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$ garantiu a completa inativação de coliformes totais em efluentes domésticos, ao passo que no efluente hospitalar, mesmo na maior dosagem testada de $315 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$, não foi verificada a completa inativação destes microrganismos. Isto pode ter ocorrido devido à presença da matéria orgânica complexa do efluente hospitalar, que pode ter induzido uma demanda inicial de ozônio para a degradação destes compostos.

O estudo da caracterização dos efluentes hospitalares é particularmente importante porque altas concentrações de antibióticos ou outras substâncias tóxicas podem afetar o desempenho dos sistemas de tratamento de esgoto.

Chelliapan et al (2006) investigaram o desempenho de um reator anaeróbio de fluxo ascendente em escala de laboratório tratando esgoto farmacêutico contendo antibióticos macrolídeos. Foram desenvolvidos dois sistemas de reator anaeróbio de fluxo ascendente idênticos, cada um compreendendo quatro compartimentos cilíndricos com 80 mm de diâmetro interno por 64 mm de altura e todos ligados em série. Cada estágio do reator tinha um separador trifásico para reter a biomassa. Cada compartimento foi designado como um estágio do processo de tratamento e o volume de cada um foi de 2,75 L. O esquema da unidade de cada estágio do reator pode ser visualizado na Figura 3.

Operou-se o reator com aumentos seqüenciais da carga orgânica correspondente à DQO de 0,43 a $3,73 \text{ Kg DQO/m}^3 \text{ d}$ e, novamente reduzidas para $1,86 \text{ Kg}$ ao final de 279 dias. No tempo de retenção hidráulica de 4 dias e de carga orgânica de $1,86 \text{ Kg de DQO/ m}^3 \text{ d}$ a redução de DQO foi de 70 a 75%, mostrando que a biomassa se aclimatou aos antibióticos. Também foi avaliada a influência de concentrações elevadas de tilosina sobre o desempenho do sistema, adicionando concentrações estabelecidas de fosfato-tilosina. Os resultados mostraram uma eficiência similar para a remoção de DQO, onde a tilosina estava presente em concentrações de 0 a 400 mg/ L (a média de remoção foi de 93%). Entretanto, as concentrações de tilosina de 600 a 800 mg/ L provocaram um declínio sensível na eficiência do tratamento, de 85 para 75% de remoção de DQO, respectivamente (CHELLIAPAN et al, 2006).

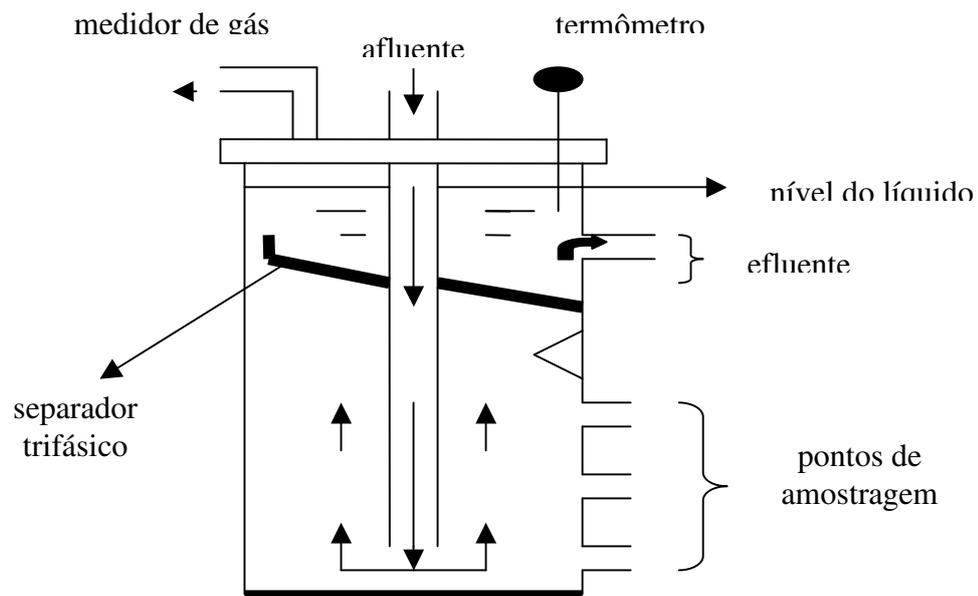


Figura 3. Detalhes de um estágio individual do reator anaeróbico de fluxo ascendente (UASR)
 Fonte: Chelliapan et al, 2006.

Paulo et al (2005) também avaliaram a eficiência de um reator anaeróbico de fluxo ascendente no tratamento de esgotos domésticos e hospitalares. Tais autores verificaram que houve uma redução do metabolismo das *archaea* metanogênicas do esgoto hospitalar, as quais podem estar sofrendo as conseqüências do contato com as concentrações elevadas de desinfetantes, medicamentos ou outras substâncias tóxicas possivelmente contidas no esgoto hospitalar.

O incentivo para o emprego de tecnologias que utilizam processo anaeróbico de tratamento de esgoto é importante tendo em vista algumas vantagens de custo, de operação e manutenção que eles oferecem quando comparados com outros tipos de sistemas, como aqueles que utilizam processo aeróbico de tratamento. Porém, é preciso conhecer melhor o desempenho real destes sistemas quando utilizados para o tratamento de esgotos hospitalares, sem perder de vista a questão da eficiência e da efetividade do processo.

Um sistema de tratamento de esgoto hospitalar composto de reator UASB seguido de pós-tratamento por três filtros anaeróbios dispostos em série utilizado para o tratamento de esgoto hospitalar na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, será analisado com maiores detalhes nos capítulos referentes à metodologia e aos resultados e discussão do presente trabalho, quanto à caracterização e a eficiência na remoção de microrganismos patogênicos.

2.4 – Poluição microbiológica das águas residuárias: vírus patogênicos

Os microrganismos patogênicos, entre eles bactérias, vírus, protozoários e helmintos presentes em esgoto doméstico também são encontrados em efluentes hospitalares. A maioria destes patogênicos é de origem entérica, sendo, portanto, excretados na matéria fecal, as quais podem contaminar o meio ambiente, tendo acesso novamente a novos hospedeiros através de ingestão da água contaminada. Existem também vários microrganismos não-entéricos, notadamente bactérias do gênero *Legionella sp.*, *Micobacterium sp.* e vários patogênicos oportunistas que podem estar presentes na água, acarretando um potencial risco epidemiológico, principalmente em locais com condições de saneamento precárias (TOZE, 1999).

Tradicionalmente, as bactérias do grupo coliforme são utilizadas para monitorar a qualidade microbiológica da água. Entretanto, vírus, ovos de helmintos e cistos de protozoários também podem estar presentes e a concentração destes microrganismos pode não ser equivalente àquela encontrada para as bactérias presentes nestes ambientes.

Estudos recentes indicam que a presença de bactérias indicadoras não está relacionada com a prevalência de vírus entéricos nas águas. Este fato ocorre, principalmente, pelas diferentes propriedades físico-químicas encontradas entre vírus e bactérias e nas diferenças de resistência aos processos de tratamento de água, de esgoto ou de resíduos sólidos (BURGENER et al, 2003; TYRRELL et al, 1995). Os vírus entéricos humanos são capazes de persistir no ambiente por longos períodos devido à sua extrema resistência às condições desfavoráveis do meio (GILGEN et al, 1997). Os vírus são mais resistentes ao cloro em concentrações geralmente empregadas nas estações de tratamento de esgoto, enquanto as bactérias são mais sensíveis (TYRRELL et al, 1995). Desta forma, coloca-se em discussão qual seria o melhor indicador microbiológico das águas, tendo em vista que, mesmo na ausência de coliformes fecais, os vírus podem estar presentes (BAGGI et al, 2001; TYRRELL et al, 1995).

Nos esgotos, a concentração viral é muito grande e a quantidade de vírus presentes varia de acordo com alguns fatores, tais como: as regiões geográficas, as condições socioeconômicas e sanitárias e as variações sazonais (BLOCK e SCHWARTZBROD, 1989). Villar et al (2002) avaliaram a sazonalidade da infecção pelo Vírus da Hepatite A (HAV) no Rio de Janeiro. Observou-se um aumento sazonal durante a estação chuvosa (dezembro a março) com surtos mais frequentes nas estações quentes (VILLAR et al, 2002). Vaidya et al (2002) também detectaram um aumento significativo da proporção da população infectada com este vírus nos meses de verão, na Índia (VAIDYA et al, 2002).

Um obstáculo apresentado ao monitoramento de rotina dos vírus poderia ser justificado pela falta de metodologias mais rápidas e eficientes para a detecção destes agentes. Recentemente, técnicas de biologia molecular têm sido aperfeiçoadas para identificar e quantificar os vírus em amostras ambientais.

2.5 - Metodologias para detecção de vírus em amostras de água

Os vírus têm partículas de tamanho entre 300 a 20 nm, são obrigatoriamente parasitas intracelulares e para isolar e propagar os vírus até meados dos anos de 1980, era preciso propagá-los na presença de células vivas de animais ou de ovos embrionados, mais frequentemente, dentro de culturas de células *in vitro* (BLOCK; SCHWARTZBROD, 1989).

Em 1980, o surgimento de técnicas de biologia molecular como o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) revolucionou as técnicas tradicionais para a detecção e a quantificação de microrganismos e, mais especificamente de vírus presentes em amostras ambientais. Tal técnica reduziu o tempo requerido para a análise, além de apresentar resultados mais confiáveis na detecção e na quantificação de vírus devido à maior sensibilidade do método.

O PCR é um método que produz múltiplas cópias de um DNA alvo. O método de PCR usa uma enzima polimerase termoestável (ex: *Taq*) para criar múltiplas cópias do DNA alvo. A detecção do DNA alvo é alcançada através do uso de pequenas seqüências de oligonucleotídeos, conhecidas como *primers*. Diferentes ciclos de temperatura são empregados para promover a separação da dupla fita de DNA (desnaturação), para anelar os *primers* ao DNA alvo (anelamento) e para promover a reprodução da parte do genoma escolhido pela enzima polimerase (extensão). Os ciclos de temperatura são repetidos muitas vezes, mais de 25 a 30 ciclos, devido à natureza exponencial do PCR e, mais do que 10^9 cópias do DNA alvo podem ser produzidas. Este grande número de segmentos de DNA alvo pode ser visualizado usando um método padrão, tais como a eletroforese em gel de agarose (TOZE, 1999).

Entre as principais técnicas que utilizam o método de PCR, podem-se citar: RT-PCR (*Reverse Transcription – PCR*), *Nested PCR*, *Multiplex PCR*, PCR em tempo real (*Real Time PCR*). Para detectar vírus de genoma de RNA é utilizado o método de RT-PCR, o qual utiliza uma enzima chamada *transcriptase reversa* para converter uma amostra de RNA em DNA complementar (cDNA) antes da etapa de amplificação.

O *Nested* PCR emprega uma segunda etapa de amplificação com um par de *primers* internos além dos utilizados na primeira etapa de PCR e visa aumentar a sensibilidade do método.

Já, o *Real Time* PCR permite que a amplificação e a detecção ocorram simultaneamente, quantificando os microrganismos presentes na amostra.

Todos estes métodos envolvem o mesmo conceito, que incluem a extração do material genético (DNA ou RNA), a amplificação de uma região do genoma selecionada através de PCR e a análise dos produtos de PCR (BURGENER et al, 2003). O RT-PCR tem sido aplicado com sucesso para a detecção de vírus RNA em amostras ambientais (CASAS et al, 2002; VILLAR et al, 2006).

Diversos vírus patogênicos, como enterovírus, adenovírus, calicivírus e vírus da hepatite A (HAV) têm sido detectados em amostras ambientais, tais como esgoto e lodo de esgoto e o monitoramento ambiental destes microrganismos é cada vez mais requerido.

2.6 - VÍRUS DA HEPATITE A

2.6.1 - Propriedades estruturais e físico-químicas

O vírus da hepatite A (HAV) apresenta distribuição mundial e devido à alta incidência apresentada, principalmente nos países em desenvolvimento, representa um sério problema de saúde pública. A principal via de transmissão é a fecal-oral, por contato pessoa a pessoa ou por água e alimentos contaminados (FOCACCIA, 1997). A carência ou a falta de serviços de saneamento básico, tais como a coleta e o tratamento de esgotos, contribuem para a disseminação do vírus da hepatite A no meio ambiente e na comunidade.

O HAV pertence à família *Picornaviridae* e possui algumas características que permitiram a sua classificação dentro de um novo gênero: *Hepatovirus* (KNIPE et al, 2001):

- a seqüência de aminoácidos e nucleotídeos do HAV é diferente daquela de outros membros da família *Picornaviridae*, assim como o tamanho de várias proteínas;
- o HAV não é de difícil propagação em culturas de células e frequentemente a replicação não produz um efeito citopático;

- o HAV é mais resistente à temperatura e a muitas drogas que inativam vários picornavírus;
- o HAV apresenta somente um sorotipo e um sítio de neutralização é imunodominante;
- os anticorpos monoclonais enterovírus-específicos não reagem com o HAV.

O HAV não possui envelope, tem diâmetro de 27 a 32 nm, apresenta simetria icosaédrica e seu genoma é constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 7,5 Kb. A organização genômica pode ser dividida em três partes (KNIPE et al, 2001):

- uma região não codificante 5' que compreende aproximadamente 10% do genoma e possui uma proteína viral (VPg) que é covalentemente ligada na extremidade 5', esta região parece ser a mais conservada do genoma;
- uma única fase de leitura aberta (*Open Reading Frame* – ORF) que parece codificar todas as proteínas virais com regiões denominadas de P1 (proteínas do capsídeo e estruturais) e P2 e P3 (proteínas não estruturais);
- uma pequena região não codificante 3', com aproximadamente 60 nucleotídeos que possui uma cauda poli (A).

A Figura 4 apresenta as regiões do genoma do HAV que são responsáveis pela tradução das proteínas virais.

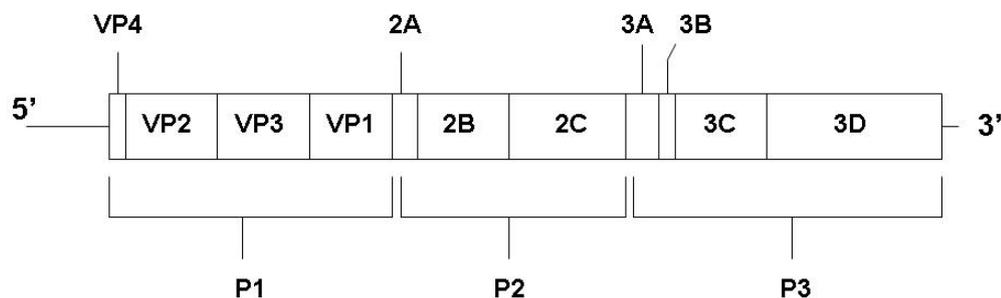


Figura 4. Diagrama das regiões do genoma do vírus da hepatite A (HAV). P1: precursora das proteínas do capsídeo ou estruturais; P2 e P3: precursoras das proteínas não estruturais

Fonte: KNIPE et al, 2001.

O HAV é bem resistente a temperaturas elevadas, a integridade do vírus ou a antigenicidade não é afetada quando ele é incubado a 60°C em pH neutro por 60 minutos e é parcialmente inativado após 10 a 12 horas. A temperatura na qual 50% das partículas virais se desintegram é 61°C após 10 minutos (KNIPE et al, 2001; NASSER et al, 1999).

A infectividade pode ser preservada por pelo menos um mês após a secagem e estocagem a 25°C com 42% de umidade ou por anos a - 20°C ou menos (KNIPE et al, 2001). Esta infectividade diminui substancialmente com etanol 70% a 25°C (PEREIRA e GONÇALVES, 2003).

O HAV é bastante persistente sob condições adversas e podem sobreviver longos períodos, de 12 semanas a 10 meses, em água. Moluscos e crustáceos podem reter e acumular estes vírus no organismo, podendo contaminar as pessoas que ingerem estes alimentos contaminados (FERREIRA et al, 2004).

Este vírus pode ser inativado por autoclave a 121°C por 20 minutos, por radiação ultravioleta, fervura (20 minutos), formalina (3% por 5 minutos), β – propiolactona (0,03% por 72 horas a 4°C), por iodo (3 mg/l por 5 minutos), por cloro (2 a 2,5 mg/l após 15 minutos) ou por compostos contendo cloro (hipoclorito de sódio com 3 a 10 mg/l a 20°C por 5 a 15 minutos) (KNIPE et al, 2001; PEREIRA e GONÇALVES, 2003).

2.6.2 - Manifestações Clínicas

As partículas virais são ingeridas e adsorvidas no intestino delgado, transitam na corrente circulatória e chegam aos hepatócitos através da circulação portal e sistêmica (PEREIRA e GONÇALVES, 2003). Elas se replicam nos hepatócitos e são liberadas para os canalículos biliares, indo para o intestino, juntamente com a bile e, conseqüentemente, eliminadas com as fezes em grandes quantidades. Os sintomas mais comuns são: fadiga, febre, problemas gastrointestinais como anorexia, náusea, vômito, dor abdominal, hepatomegalia e icterícia verificada nas membranas mucosas, da conjuntiva e da pele. Altas concentrações de HAV são expelidas nas fezes de 3 a 10 dias antes do aparecimento dos sintomas clínicos ou poucos dias antes da icterícia. Mas também tem sido relatado que o vírus pode ser excretado até 8 dias após os sintomas ictéricos (KNIPE et al, 2001).

A gravidade do quadro clínico está diretamente ligada à idade do paciente. A icterícia costuma estar presente em menos de 10% das crianças com idade inferior a 6 anos, em 40 a 50% daquelas com mais idade e em 70 a 80% dos adultos. Nos pacientes que não desenvolvem icterícia, os vírus comportam-se da mesma maneira, disseminando-se no meio ambiente, antes do diagnóstico ser realizado (FERREIRA et al, 2004).

2.6.3 - Epidemiologia

A principal rota de transmissão é a fecal-oral, podendo ser considerada como uma doença transmitida entericamente. A transmissão parenteral é rara, mas pode ocorrer quando se utiliza sangue de um doador, durante a fase de viremia no período de incubação (FOCACCIA, 1997).

Estima-se que 125 000 a 200 000 casos de infecção por hepatite A ocorrem anualmente nos Estados Unidos, dos quais 84 000 a 134 000 são sintomáticos. Baseado no número total de casos de hepatites virais relatados em 1998 nos Estados Unidos, 63% correspondeu à hepatite A, 28% de hepatite B e 9% para hepatite C (KNIPE et al, 2001). No Brasil, a hepatite A continua sendo o principal causador das doenças por hepatites, representando 43% dos casos registrados de 1996 a 2000 (CLEMENS et al, 2000).

A hepatite A tem distribuição universal, sendo endêmica em muitas regiões, mas a prevalência da infecção varia muito com o grau de higiene e de acordo com os serviços de saneamento oferecidos para a população. A prevalência da hepatite A em várias regiões do mundo pode ser vista pela Figura 5.

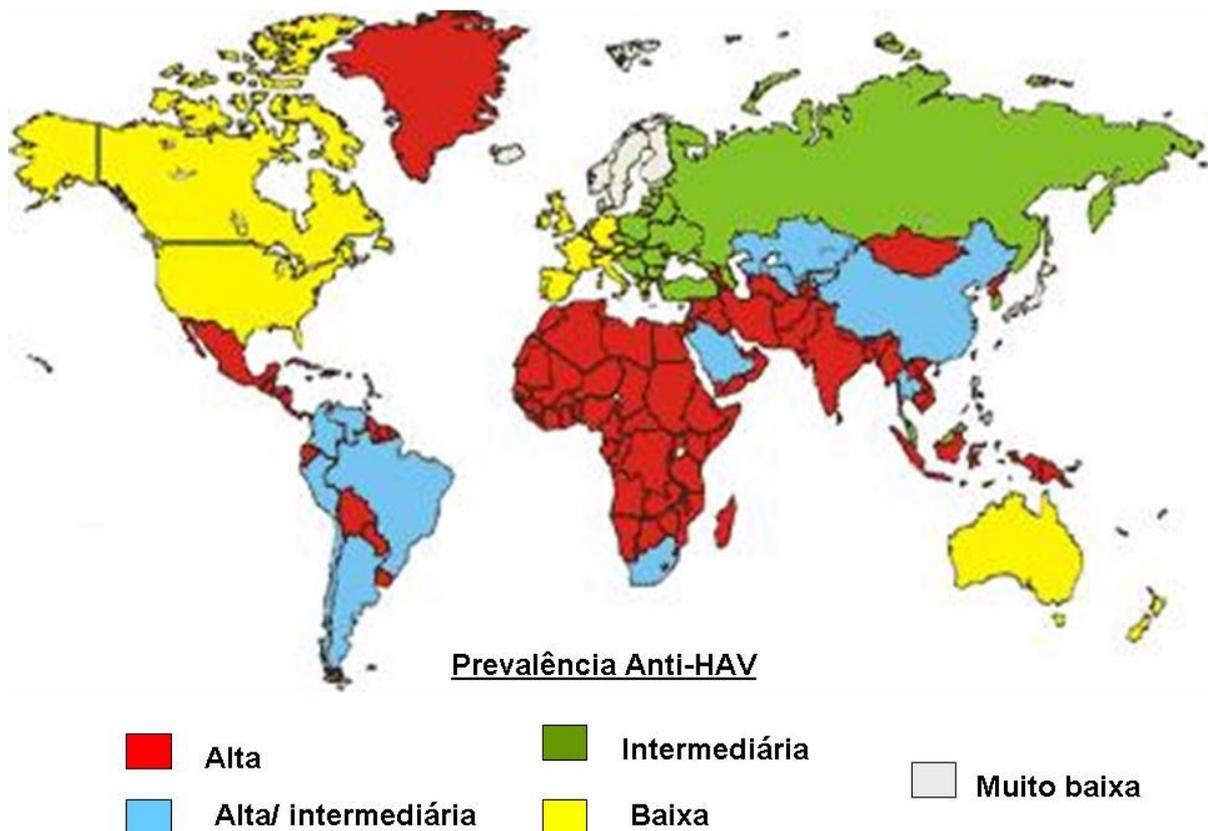


Figura 5. Mapa mostrando a prevalência da hepatite A em várias regiões do mundo.

Fonte. *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC - Feb 2007.

Nos países menos desenvolvidos, com baixos níveis de saneamento, a infecção tem incidência muito alta e mais de 90% das crianças tem sorologia positiva para o HAV até o final da primeira década de vida, adquirindo imunidade posterior ao vírus, fazendo com que as epidemias se tornem mais raras.

Nos países com melhores condições de saneamento, a prevalência da infecção atinge a fase final da infância e o início da adolescência e, nestas regiões, a hepatite aguda é mais

freqüente e os surtos epidêmicos podem ocorrer devido à contaminação acidental da água e dos alimentos.

Têm-se incluído o Brasil como um país de condições intermediárias na prevalência da doença, pois, as condições de vida e dos serviços de saneamento prestados estão melhorando nos últimos anos e a soroprevalência de anticorpos anti-HAV está sendo mais pronunciada numa população com idade um pouco mais avançada, mais frequentemente dos 5 aos 9 anos de idade, de acordo com uma análise de anticorpos anti-HAV entre os anos de 1996 e 2000 realizadas em algumas regiões do país (CLEMENS et al, 2000; FERREIRA et al, 2004).

Altas taxas de soroprevalência da hepatite A ainda são encontradas no Brasil, sobretudo nas regiões menos desenvolvidas. Clemens et al (2000) analisaram a soroprevalência da hepatite A no país, numa população de 3600 indivíduos com idades entre 1 e 40 anos, em 4 diferentes capitais e obtiveram os resultados gerais de 64,7% de soroprevalência. Os maiores padrões de ocorrência foram documentadas nas regiões Norte e Nordeste (92,8% e 76,5%, respectivamente), enquanto as menores endemicidades foram observadas no Sul e Sudeste (55,7%). O nível sócio-econômico e as condições de saneamento básico ainda influenciam os padrões epidemiológicos da doença no Brasil (CLEMENS et al, 2000).

Nas regiões desenvolvidas, a incidência da doença é baixa e mais prevalente em adultos jovens, podendo ocorrer surtos esporádicos, principalmente devido às migrações. Em regiões desenvolvidas com pouca migração, a incidência da doença é muito baixa e ocorre em adultos ou idosos, geralmente por pessoas que viajaram para áreas endêmicas. Os surtos epidêmicos são raros.

2.6.4 - Prevenção

Como já descrito anteriormente, o principal modo de transmissão do HAV é através de água e alimentos contaminados e, sendo assim, uma das melhores formas de prevenção seria a melhoria dos serviços de saneamento básico, mais especificamente dos serviços de abastecimento de água e esgotamento sanitário. Outras formas de prevenção seriam: a imunização passiva através da injeção intramuscular de gamaglobulina ou da imunização ativa, através de vacinas inativadas, introduzidas pelos programas de vacinação.

Têm-se discutido o uso de vacinas como uma das formas de prevenir e erradicar a doença, sobretudo nos países que apresentam prevalência intermediária ou baixa. Porém, o custo da vacinação ainda é bastante elevado no Brasil, embora esta medida venha ganhando

importância na medida em que os padrões de prevalência começam a ser mais freqüentes em faixas etárias tardias e cujas implicações da doença são mais graves. Entretanto, surtos da doença ainda são freqüentes no Brasil (VILLAR et al, 2002^b) e são relacionados, principalmente, com a qualidade da água. Enfatiza-se a importância da melhora dos serviços de saneamento das comunidades brasileiras, sobretudo nas regiões mais carentes. Esta medida, em longo prazo, pode reduzir os custos destinados à vacinação e à medicina curativa no país.

3 - METODOLOGIA

3.1 – Caracterização da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Hospitalar

A Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) específica do estudo recebe os efluentes de um hospital, na cidade do Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

A ETE utiliza processo anaeróbio de tratamento de esgotos, composta pelas unidades de reator UASB seguido de pós-tratamento por três filtros anaeróbios, dispostos em série, com direção de fluxo ascendente.

O uso de tecnologias que empregam sistema anaeróbio de tratamento, tais como reator UASB e filtro anaeróbio, é interessante, sobretudo do ponto de vista de custos. Estes sistemas não demandam gasto de energia (exceto para estação elevatória de chegada, quando houver), funcionam bem a altas temperaturas (condição bastante favorável para países de clima tropical como o Brasil), apresentam maior simplicidade de operação e manutenção, baixos custos de implantação, da ordem de 20 a 30 dólares *per capita*, baixa produção de sólidos, cerca de 5 a 10 vezes inferior ao que ocorre nos sistemas aeróbios, além da aplicabilidade em pequena e grande escala (CHERNICHARO, 1997), podendo-se tornar vantajoso para o tratamento de efluentes hospitalares.

Os esgotos a serem tratados são provenientes das unidades que compõem o hospital, como laboratórios, unidades de reabilitação, diálise, internação, cirurgia, ambulatórios, lavanderia e refeitório.

Os parâmetros de cálculo do projeto da ETE foram baseados na capacidade de atendimento do hospital e nas atividades exercidas neste estabelecimento. Os parâmetros adotados foram obtidos do memorial de cálculo da ETE correspondente à época da execução do projeto (junho de 2002) e podem ser vistos na Tabela 7:

Tabela 7. Parâmetros de Projeto de acordo com a capacidade hospitalar*

Número de leitos	200 leitos
Pacientes externos	2000 pacientes
Número de funcionários	800 funcionários
Diálise	9 cadeiras
Cozinha	1300 refeições/dia
Lavanderia	6Kg/leito x 200 leitos = 1200 kg/dia

*junho de 2002

As principais unidades que compõem este sistema de tratamento de esgotos são:

- **Sistema de gradeamento:** para a retenção e remoção de sólidos grosseiros que estão contidos no fluxo.
- **Estação elevatória:** para elevar o líquido da cota de chegada após a etapa de gradeamento, até o nível de entrada do reator anaeróbio, através de dois conjuntos motor-bomba do tipo submerso, acionada por bóias de nível.
- **Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo (UASB):** onde é realizado o principal processo de estabilização da matéria orgânica, através da formação de uma manta de lodo densa e de elevada atividade.
- **Filtros anaeróbios:** unidades de pós-tratamento para o polimento de esgotos, utilizando três filtros biológicos anaeróbios em série, de fluxo ascendente, com uma capacidade de remoção complementar de matéria orgânica. Apresentam como suporte de preenchimento pedra brita nº 4.
- **Sistema de cloração:** desinfecção do efluente final utilizando pastilhas de hipoclorito de cálcio para a eliminação de organismos patogênicos. É importante enfatizar que foi estabelecido um acordo com os técnicos de operação da ETE para que no período de coleta das amostras de esgoto, não fossem adicionadas as pastilhas de hipoclorito de cálcio para a desinfecção do efluente final, pois, o objetivo da presente pesquisa não foi avaliar a eficiência do processo com a interferência de cloro como agente de remoção de patógenos, mas, somente a eficiência dos filtros.

A seguir, será apresentado o dimensionamento do reator UASB e dos filtros anaeróbios:

Dimensionamento do reator UASB:

- Vazão média (adotada): $220 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ ou $2,54 \text{ L. s}^{-1}$
- DBO afluente: 290 mg/L
- DQO afluente: 580 mg/L
- Tempo de retenção hidráulica (TRH): 8 horas
- Volume total do reator: $73,36 \text{ m}^3$

- Altura do reator: 4,5 m
- Área corrigida: 16,5 m²
- Distribuidores internos: 8
- Estimativa da eficiência de remoção de DQO: $E_{DQO} = 67,5\%$
- Estimativa de eficiência de remoção de DBO: $E_{DBO} = 75,4\%$
- Estimativa das concentrações de DQO e DBO na saída do reator:
- $S_{DQO} = 189,6 \text{ mg/l}$
- $S_{DBO} = 71,3 \text{ mg/l}$
- Avaliação da produção de metano: $Q_{CH_4} = 22,5 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$

O dimensionamento do reator UASB está representado na Figura 6:

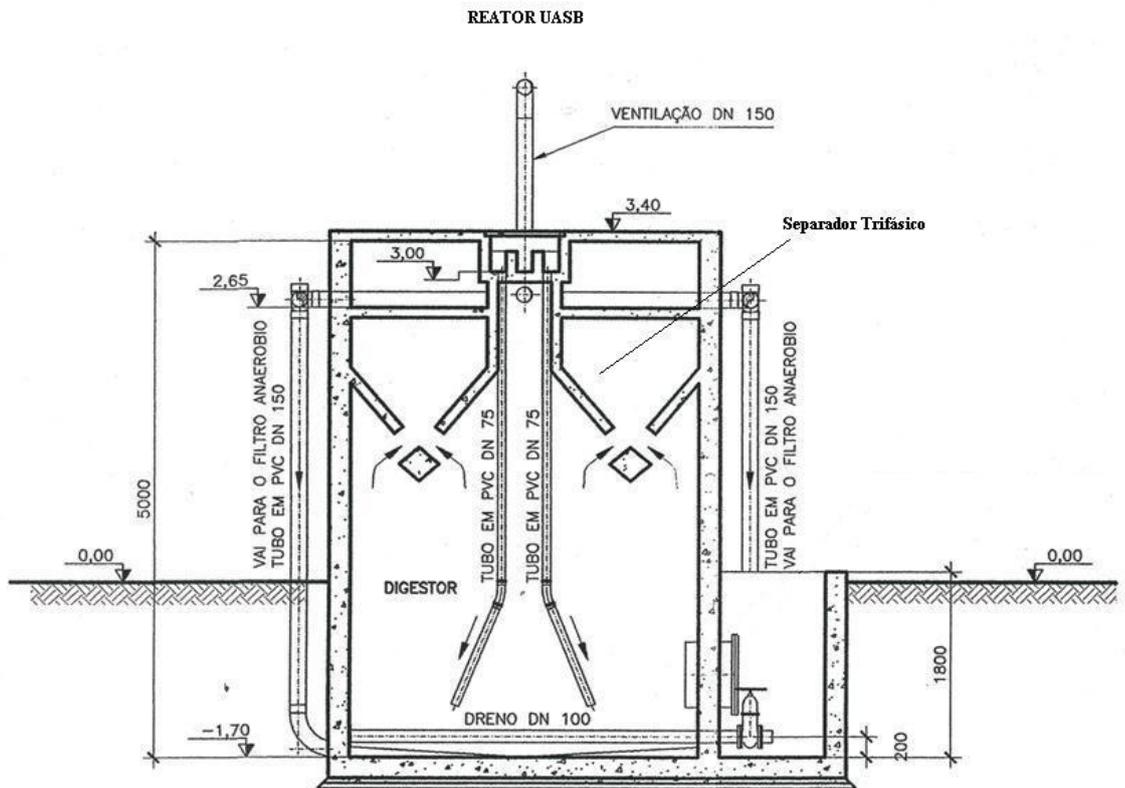


Figura 6. Dimensionamento do reator UASB

Dimensionamento do filtro anaeróbio:

Para o dimensionamento dos filtros anaeróbios utilizaram-se as disposições contidas na norma ABNT 7229/93 referentes a fossas sépticas e disposição final de efluentes. Como parâmetro de tempo de retenção hidráulica média para filtro anaeróbio como unidade de pós-tratamento, adotou-se 4 horas.

- Volume útil: $50,7 \text{ m}^3$
- Profundidade máxima do filtro: 1,2 m
- Área (adotada): $42,24 \text{ m}^2$
- Eficiência esperada: $E = 56,5\%$
- Estimativa das concentrações de DQO e DBO na saída do efluente final:
- $S_{\text{DQO}} = 82,5 \text{ mg/l}$
- $S_{\text{DBO}} = 31 \text{ mg/l}$
- Suporte de preenchimento dos filtros: pedra brita nº 4

O esquema geral das unidades de tratamento que compõem o sistema pode ser visto em anexo (pág. 113).

O afluente que chega do hospital passa pela primeira etapa de tratamento que consiste na remoção de sólidos grosseiros (partículas com dimensões maiores ou iguais a 1cm e areia) através de gradeamento e, logo em seguida, é bombeado para o interior do reator UASB. O efluente do reator UASB passa pelos três filtros anaeróbios dispostos em série, com direção de fluxo ascendente e pela etapa final de desinfecção por cloração, através da adição de pastilhas de hipoclorito de sódio. Após o tratamento, o efluente é lançado na rede pública de coleta de esgotos da CEDAE (Companhia Estadual de Água e Esgotos).

Um esquema geral da dinâmica e das unidades de tratamento de esgoto envolvidas pode ser visto através de um fluxograma simplificado (Figura 7).

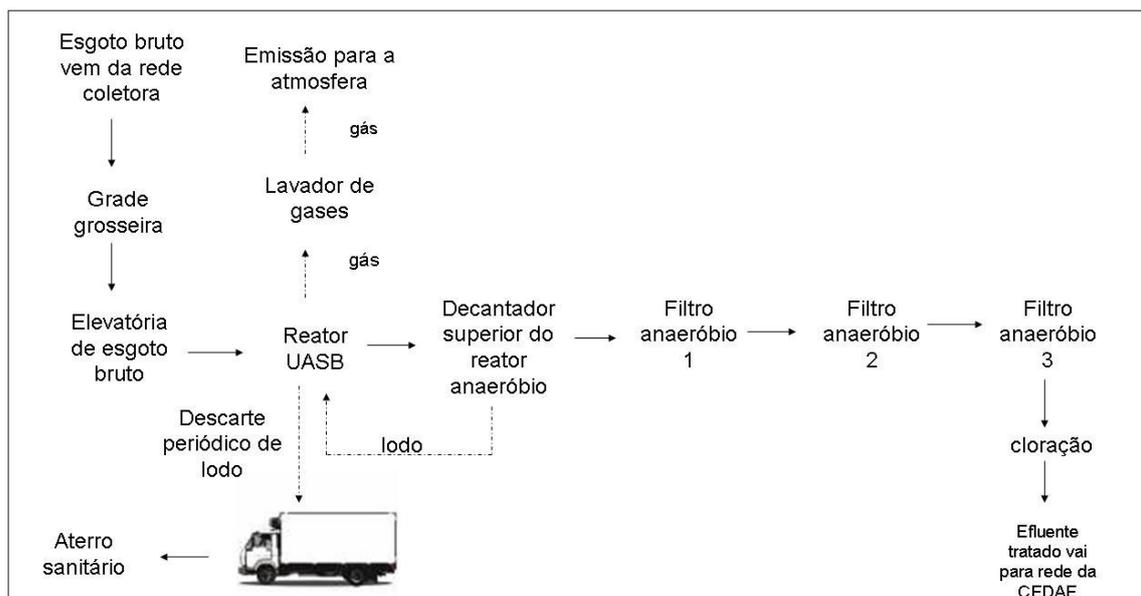


Figura 7. Fluxograma geral do processo e das unidades de tratamento de esgoto

A ETE localiza-se numa área externa dentro dos limites do estabelecimento hospitalar e o reator UASB e os filtros anaeróbios cobertos podem ser vistos nas Figuras 8 e 9, respectivamente.



Figura 8. Reator UASB



Figura 9. Filtros Anaeróbios

Alguns parâmetros físico-químicos foram obtidos durante o período de coleta de amostras. Os parâmetros analisados foram: DQO, DBO₅, pH, turbidez, amônia e SST presentes no lodo. A vazão também foi medida durante algumas coletas realizadas.

A turbidez foi medida no próprio local de coleta através de um turbidímetro 2100P Turbidimeter – Hexis, da Hach. Os outros parâmetros foram obtidos pelo laboratório de

Saneamento e Meio Ambiente da UERJ. As metodologias utilizadas para o monitoramento destes parâmetros foram baseadas no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998).

Os resultados dos parâmetros físico-químicos e da vazão estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros físico-químicos obtidos da ETE hospitalar

Parâmetros	Unidade	Média	Desvio padrão
Vazão	L. s ⁻¹	2,37	0,27
SST (lodo)	mg. L ⁻¹	1726,5	1441,7
pH afluente		6,95	0,11
pH UASB		6,96	0,15
pH efluente		6,54	0,40
Turbidez afluente	UNT	44,9	28,3
Turbidez UASB	UNT	13,41	11,02
Turbidez efluente	UNT	5,34	3,69
Amônia afluente	mg.L ⁻¹	13,57	6,33
Amônia UASB	mg.L ⁻¹	17,79	20
Amônia efluente	mg.L ⁻¹	4,46	7,18
DBO ₅ afluente	mg.L ⁻¹	30,15	13,11
DBO ₅ UASB	mg.L ⁻¹	11	4,3
DBO ₅ efluente	mg.L ⁻¹	4,25	4,85
DQO afluente	mg.L ⁻¹	158,43	81,3
DQO UASB	mg.L ⁻¹	71,82	11
DQO efluente	mg.L ⁻¹	34,3	15,98

Obs: os resultados correspondentes à saída do reator UASB e da saída final foram obtidos das coletas em que ETE operava normalmente.

3.2 - Amostragem

3.2.1 - Coleta de Esgoto e Lodo de Esgoto

Foram realizadas 10 coletas de esgoto e lodo de esgoto para as análises bacteriológicas e 5 coletas de esgoto e lodo de esgoto para as análises do vírus da hepatite A, durante o período compreendido entre outubro de 2005 a novembro de 2006. As coletas ocorreram no período da manhã (entre às 9:00 e 11:00 horas), na maioria delas às segundas-feiras e as amostras eram levadas imediatamente para os laboratórios de análise.

O horário das coletas realizado pela manhã foi escolhido em decorrência da necessidade de processar rapidamente as amostras nos laboratórios de análise. O dia de coleta predominante (segunda-feira) também foi escolhido para que houvesse tempo hábil de realizar as análises bacteriológicas sem períodos longos de interrupção das metodologias aplicadas.

Os pontos de amostragem foram:

- Afluente (esgoto bruto)
- Lodo (amostra composta correspondente aos três compartimentos de alturas diferentes)
- Efluente do reator UASB
- Efluente tratado (após a passagem pelos filtros anaeróbios)

Os volumes de amostras necessários para realizar os experimentos em cada coleta foram:

- 2 L de esgoto retirados de cada ponto de coleta e 2 L de lodo de esgoto (amostra composta) para a análise dos vírus da hepatite A.
- Aproximadamente 100 mL de esgoto retirados de cada ponto de coleta e 100 mL de lodo de esgoto (amostra composta) para a análise de coliformes totais e fecais, enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os materiais utilizados para a coleta foram: frascos de plástico de 1L para a armazenagem do esgoto e do lodo, balde, luvas de borracha e funil, devidamente lavados e desinfetados.

As análises bacteriológicas foram realizadas no Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia do IOC/ FIOCRUZ e as análises do Vírus da hepatite A no Laboratório de Vírus da Hepatite A, do Departamento de Virologia – IOC/ FIOCRUZ.

3.3 – Análise de Coliformes Totais e *E.coli* - Técnica dos Tubos Múltiplos

A análise de coliformes totais e termotolerantes (*E.coli*) foi realizada através do método de fermentação em tubos múltiplos, padronizada pelo *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998).

Os números de coliformes foram obtidos através da Tabela do Número Mais Provável (NMP) e representam os valores encontrados em 100 mL de amostra (NMP/ 100 mL).

Foram obtidas as médias geométricas dos resultados de coliformes totais e *E.coli* e o cálculo da média geométrica, da fórmula:

$$\text{Média geométrica} = 10^{(\text{média aritmética dos logaritmos})}$$

Os resultados foram apresentados em tabelas e gráficos para facilitar a visualização.

3.4 – Análise de Enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa*

Para isolar e identificar os microrganismos da família das *Enterobacteriaceae*, os seguintes meios de cultura foram utilizados: Tergitol – 7 (Oxoid) com adição de TTC (cloreto de trifeniltetrazólio a 0,05%) (Figura 10), EMB (Eosina Azul de Metileno) (Figura 11) e GSP (*Glutamato Starch Phenol Red*) – (Figura 12), para a detecção de *Pseudomonas aeruginosa*.

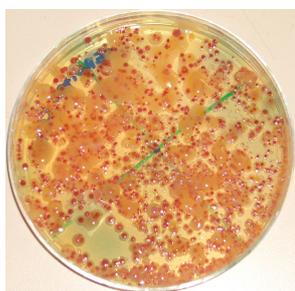


Figura 10. Tergitol – 7



Figura 11. EMB



Figura 12. GSP

As amostras de esgoto e lodo de esgoto foram inoculadas diretamente nas placas (10 µL) e também foram diluídas em solução salina, nas concentrações de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} para cada ponto

de coleta e meio de cultura utilizado, perfazendo um total de 48 placas de meios de cultura por coleta. O esquema adotado para as diluições pode ser visto na Figura 13.

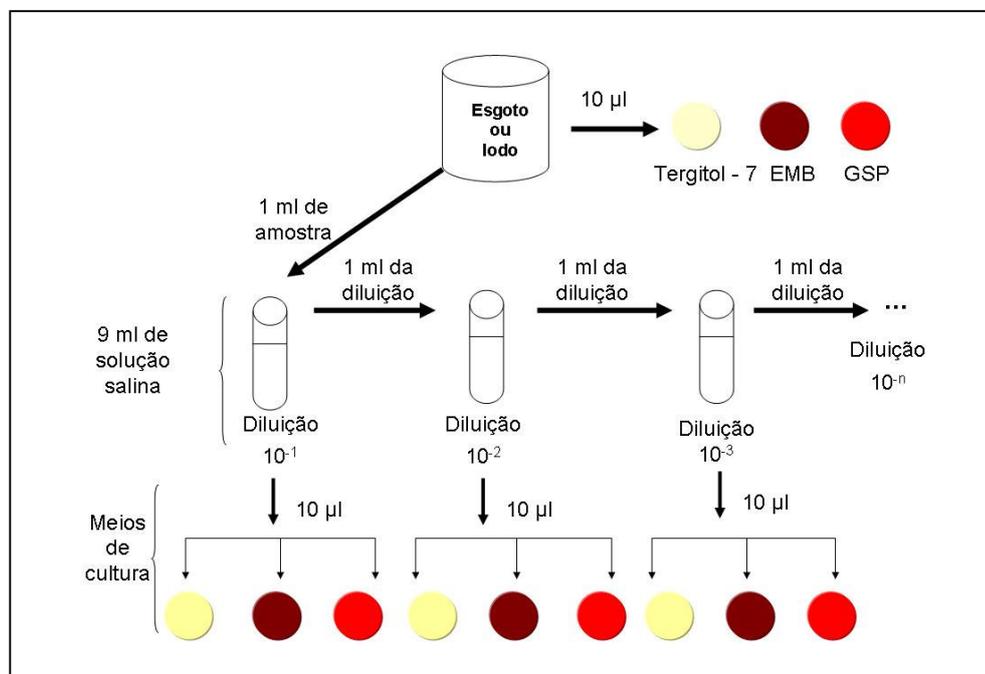


Figura 13. Esquema das diluições empregadas na análise por cada ponto de coleta e meio de cultura utilizado

Após semeadas (*spread plate*) as placas foram incubadas na estufa a 35°C por 24 a 48 horas para o crescimento das colônias e após este período foi realizada a contagem das colônias nas placas.

A seleção das colônias para o isolamento e a identificação foi baseada nas diferenças morfológicas apresentadas e aproximadamente 10 colônias foram isoladas de cada meio de cultura por dia de coleta. Diferentes tipos de colônias isoladas foram submetidas aos meios de triagem: CV (Costa & Vernin), SIM (Sulfato/Indol/Motilidade) e Ágar Citrato. Após a semeadura nestes meios, incubou-se novamente e colocou-se na estufa a 35°C por mais 18 a 24 horas. As provas bioquímicas adicionais para a identificação das espécies foram realizadas segundo a orientação do Manual de Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica (ANVISA, 2005).

O resultado do crescimento de colônias foi expresso em UFC (Unidades Formadoras de Colônias) nos meios de cultura utilizados correspondente às amostras de esgoto e lodo de esgoto dos diferentes estágios do sistema de tratamento de esgoto.

3.5 – Antibiograma (Técnica de Disco-Difusão e Disco Combinado)

O antibiograma foi realizado através dos testes de disco-difusão, recomendados pela Norma M2 – A8, V.23, n° 1, 8ª edição da ANVISA, padronizados pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2005). O método de discos combinados para detectar *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL (β -Lactamases de Espectro Estendido) foi realizado de acordo com o CLSI (2005).

3.5.1 - Disco-difusão

Para o teste de disco-difusão, as colônias identificadas como *Klebsiella pneumoniae* foram semeadas em agar nutriente. Deste meio, uma alçada das colônias foi transferida para uma solução salina e a suspensão foi comparada com o padrão de turvação 0,5 da escala de Mac Farland. Em seguida foi realizada a semeadura no meio de agar Müeller-Hinton e os discos de antibióticos (Oxoid – Basingstoke, Hampshire, England) próprios para bactérias Gram negativas foram introduzidos no meio.

Os antibióticos e suas respectivas concentrações e classes podem ser vistos na Tabela 9.

As placas foram colocadas na estufa a 35°C +/- 2°C, por 16 a 18 horas. O resultado do teste de disco-difusão para a resistência aos antibióticos foi obtido através da medida do halo de inibição de crescimento, provocado pelos discos de antibióticos colocados nas placas semeadas. De acordo com o diâmetro do halo de inibição foi possível conferir se a bactéria era sensível, mais ou menos sensível (intermediária) ou resistente ao antibiótico testado. A zona do diâmetro é particular para cada droga e microrganismo, sendo comparados com diâmetros padronizados do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2005).

O uso de amoxicilina com o inibidor de β – lactamases, o ácido clavulânico, foi utilizado como um indicador de bactérias produtoras de ESBLs (β – lactamases de espectro estendido). Estes discos foram colocados ao lado dos antibióticos β – lactâmicos (ceftriaxona e ceftazidima) e a presença de uma zona clara entre os discos indicou a possível presença de bactérias produtoras de ESBLs. Estas bactérias suspeitas de serem ESBL positivas foram submetidas ao teste de discos combinados.

Tabela 9. Antibióticos utilizados, concentração e classe a que pertencem

Antibióticos	Concentração (µg)*	Classe do antimicrobiano
Cefoxitina (FOX)	30	Cefalosporina de 2 ^a geração
Ceftriaxona (CRO)	30	Cefalosporina de 3 ^a geração
Ceftazidima (CAZ)	30	Cefalosporina de 3 ^a geração
Cefepima (FEP)	30	Cefalosporina de 4 ^a geração
Imipenem (IMP)	10	carbapenem
Gentamicina (CN)	10	aminoglicosídeo
Amicacina (AK)	30	aminoglicosídeo
Ciprofloxacina (CIP)	5	fluoroquinolona
Cloranfenicol (C)	30	cloranfenicol
Sulfametoxazol- trimetoprim (SXT)	1,25/ 23,75	Inibidores da via metabólica dos folatos
Tetraciclina (TE)	30	Tetraciclina
Amoxicilina + ácido clavulânico (AMC)	20/ 10	Penicilina + inibidor de β - lactamases

* Concentrações padronizadas pelo CLSI (2005).

3.5.2 - Discos combinados

Para o método de discos combinados, as bactérias que apresentaram indício de ESBL positivas foram transferidas para uma solução salina e a suspensão foi comparada com a escala 0,5 de Mac Farland. Foi feita a semeadura e dois antibióticos β – lactâmicos foram inseridos nas placas: cefotaxima (CTX, 30 µg) e ceftazidima (CAZ, 30 µg), e os mesmos antibióticos em conjunto com um inibidor de β – lactamases, o ácido clavulânico (10 µg). Os discos foram inseridos nas placas aos pares, um par de cefotaxima e cefotaxima em conjunto com ácido clavulânico e o outro par de ceftazidima e ceftazidima em conjunto com ácido clavulânico, dispostos a uma distância aproximada de 2 cm.

O resultado foi positivo para a produção de ESBL quando os discos de ceftazidima possuíam um halo menor que 22 mm e menor que 27 mm para os discos de cefotaxima. Foram consideradas cepas produtoras de ESBL quando ocorreu um aumento de mais de 5 mm de diferença entre os halos dos discos de ceftazidima e ceftazidima com ácido clavulânico e um aumento de mais de 3 mm entre o disco de cefotaxima comparado com o disco de cefotaxima com ácido clavulânico. A cepa controle utilizada foi a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

A frequência relativa de bactérias resistentes por antibiótico testado foi apresentada em tabelas e gráficos para facilitar a visualização dos resultados.

3.6 – Análise de Vírus da Hepatite A

A metodologia utilizada para identificar o vírus da hepatite A nas amostras de esgoto e lodo de esgoto se consistiu de três procedimentos essenciais:

- Adsorção-eluição
- Concentração
- Análises de biologia molecular através de RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) seguido pelo *Nested PCR*.

As etapas serão descritas a seguir:

3.6.1 - Adsorção-eluição

Materiais:

- Sistema Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts 01730. Capacidade máxima: 10L Catalog. N° XX6700P10® - funciona a alta pressão
- Filtro AP20 14250 Millipore, microfibras de vidro, 0,45 µm de poro, 142 mm de diâmetro, branco, liso (1º filtro)
- Filtro HAWP 14250 Membrana HA em ester de celulose, 0,45 µm de poro, 142 mm de diâmetro, branco, liso (2º filtro)

Reagentes:

- NaOH 1mM pH 10,5
- TE (Tris-EDTA) 100X 1M pH 8
- 1M Tris HCl pH 8 c/ 100mM EDTA
- H₂SO₄ 0,5mM pH 3
- HCl 6N

A etapa que consistiu na purificação e na concentração dos vírus, seguiu a metodologia realizada previamente por Katayama (2002). Este método consiste no uso de um sistema de bomba a vácuo, cuja amostra a ser analisada passa através de duas membranas: (AP20), para a retenção de bactérias e outras impurezas e através de outra membrana (HA - Millipore) carregada negativamente para a adsorção dos vírus.

Para concentrar os vírus das amostras de lodo de esgoto foi necessário incluir um passo de diluição para que as amostras pudessem passar pela etapa da filtração. Todas as amostras tiveram um volume final de 2 L. As diluições empregadas em cada amostra estão especificadas a seguir:

- **Coleta 04/10/05:** não foi realizada a análise de lodo
- **Coleta 08/05/06:** 2 L de lodo foram passados pelo sistema de filtração
- **Coleta 22/05/06:** 200 mL de lodo foram diluídos em 1800 mL de água destilada
- **Coleta 06/06/06:** 1 mL de lodo foram diluído em 1999 mL de água destilada
- **Coleta 14/08/06:** 10 mL de lodo foram diluídos em 1990 mL de água destilada

Dos volumes de lodo utilizados em cada diluição, foram obtidas as concentrações correspondentes em miligrama de lodo, baseados na conversão dos valores de sólidos suspensos totais (SST mg/ L).

Foram utilizadas as concentrações de Sólidos Suspensos Totais (SST) correspondentes às coletas dos dias 22/05/06, 06/06/06 e 14/08/06. Na coleta do dia 08/05/06 não foi possível obter a análise de sólidos da amostra, por isso, a massa de lodo correspondente não foi considerada. Os valores de sólidos suspensos totais (SST) em mg/ L, correspondentes às amostras analisadas de acordo com cada diluição utilizada, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. SST (mg/ L) e valores correspondentes em miligrama de lodo utilizados em cada amostra

Datas das coletas	SST (mg/ L)	Massa de lodo (mg)
22/05/06	15565	3100
06/06/06	3788	3,7
14/08/06	759	7,5

A primeira etapa da análise consistiu na filtração de cada amostra (2L) através do sistema de bomba a vácuo (Millipore – Figura 14) que funciona a alta pressão. O Líquido filtrado passou primeiramente através do filtro AP20 de tamanho de poro 0,45 μm , que retém as bactérias e outras impurezas.

O líquido filtrado (aproximadamente 2 L) foi colocado no agitador magnético por 10 minutos com adição de 1,2 g de MgCl_2 . O pH da água foi ajustado para 5 utilizando HCl.

O líquido foi passado novamente pelo sistema de bomba a vácuo através de outro filtro (membrana carregada negativamente HA Millipore de 0,45 μm de diâmetro de poro) para adsorver as partículas virais. A água residual foi desprezada.



Figura 14. Sistema de filtração

Em seguida, 350 mL de H_2SO_4 a 0,5 mM e pH 3 foi passado através da membrana carregada negativamente pelo sistema de bomba para extrair os cátions. O filtro foi cortado e colocado em tubo Falcon com 15 mL de NaOH a 1mM, agitando no vórtex por 10 minutos para a eluição dos vírus. Ao final dos 10 minutos, o eluato foi transferido para outro tubo contendo 50 μL

de H₂SO₄ 50 mM e 50 µL de tampão TE 100X para neutralização, perfazendo um volume final de aproximadamente 15 mL.

3.6.2 - Concentração

O próximo passo foi concentrar a amostra usando o kit Centriprep YM – 50 (Regenerated Cellulose 50,000 MWCO – Amicon), centrifugando (centrífuga 5804R – Instrucom) por 10 minutos a 5000 rpm (rotações por minuto) a 4°C. O volume do concentrado final foi de 2 mL. As amostras foram estocadas a – 20°C até serem utilizadas para os testes de biologia molecular.

3.6.3 - Identificação do vírus da hepatite A (RT-PCR e *Nested* PCR)

Para a identificação dos vírus presentes na amostra, cinco passos essenciais foram realizados:

- Extração do RNA viral
- Transcrição Reversa do RNA para cDNA (DNA complementar)
- PCR
- *Nested* PCR
- Visualização dos produtos do PCR através de gel de eletroforese

Os procedimentos empregados nesta etapa serão especificados a seguir:

1) Extração do RNA viral das amostras de esgoto e lodo de esgoto:

O RNA das amostras foi extraído utilizando-se o kit comercial: “Viral RNA Mini Kit” (Qiagen Sciences, Maryland, EUA), segundo as instruções do fabricante.

Após a identificação dos tubos (numeração das amostras), 560 µL do tampão AVL (*Viral Lysis Buffer*) foram adicionados e, logo em seguida, foram acrescentados 140 µL de cada amostra (esgoto e lodo de esgoto) correspondente. Após a homogeneização e a incubação em temperatura ambiente por 10 minutos, foi adicionado 560 µL de etanol a 100% e novamente homogeneizado por meio de vórtex por aproximadamente 15 segundos.

Esta solução foi transferida para colunas e estas foram submetidas a uma centrifugação (centrífuga 5415R – AG 22331 – Hamburg, Germany) por 1 minuto a 8 000 rpm.

Os tubos coletores das colunas foram descartados e novos tubos foram recolocados. Os tubos coletores contêm uma membrana que servem para adsorver o RNA viral. O próximo passo foi a adição de 500 µL do tampão AW1 (*Washer Buffer 1*) para a lavagem da coluna (retirar as impurezas da membrana), seguida por nova centrifugação a 8 000 rpm por 1 minuto.

Novamente, os tubos coletores foram descartados e novos tubos foram recolocados. Os tubos internos com a membrana foram repassados para novos tubos coletores. Foram adicionados 500 µl do tampão AW2 (*Washer Buffer 2*) para a segunda lavagem. As colunas foram centrifugadas a 14 000 rpm por 3 minutos e os tubos coletores com o líquido sedimentado foram descartados. Os tubos internos com as membranas foram transferidos para tubos cônicos estéreis de poliestireno de 1,5 mL e foram adicionados 60 µL de tampão AVE (*Elution Buffer*) para eluir o RNA da membrana e estas colunas foram submetidas à centrifugação por 1 minuto a 8 000 rpm.

Posteriormente, as colunas internas com a membrana foram descartadas (o RNA foi eluído e estava sedimentado no fundo do tubo) e os tubos cônicos estéreis contendo o RNA viral foram submetidos à síntese do DNA complementar através da reação da transcriptase reversa.

2) Transcrição Reversa

Materiais:

Mix para a reação (concentrações por amostra):

- *random primer* – 2 pmol/ µL (Invitrogen, Escócia)
- dNTP's – 1 µL
- RNAsin - 0,5µL
- Tampão - 4 µL
- Enzima *Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase* (MMLV-RT) (Invitrogen, CA, EUA) – 1 µL

Após a mistura, as amostras foram incubadas no termociclador (TC-312, Analítica) a 37°C durante 60 minutos para ocorrer a transcrição reversa do RNA em DNA complementar. Logo em seguida, a enzima foi inativada pela incubação das amostras a 65°C por 10 minutos. As amostras estavam prontas para a próxima etapa: PCR I.

3) PCR I

Mix para a reação (concentrações por amostra):

- Água Milli-Q – 9,7µL
- dNTP – 4 µL (GIBCO, NI, EUA)
- Tampão – 2,5 µL (Invitrogen, CA, EUA)
- MgCl₂ – 1,5 µL
- *Primer F₆* – 1 µL
- *Primer F₇* – 1 µL
- *Taq* DNA polimerase – 0,3 µL (Invitrogen, CA, EUA)
- Adicionar 5 µL do cDNA

Após a mistura dos reagentes especificados anteriormente, 25 µL da solução obtida foram transferidas para cada tubo de poliestireno (0,5 mL) para a reação de PCR. As amostras foram colocadas em um termociclador (TC-312, Analítica, UK) e, após a desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, foram submetidas a 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistia de: 94°C por 30 segundos para a desnaturação, 40°C por 30 segundos para a hibridização dos oligonucleotídeos, 72°C por 1 minuto para a síntese do DNA. Após o último ciclo, uma etapa de 72°C por 7 minutos foi acrescida para o alongamento final das cadeias de DNA. Em seguida, as amostras foram submetidas a um segundo ciclo de amplificação (*Nested* RT-PCR).

4) *Nested* PCR (PCR II)

Mix da reação:

- Água Milli-Q – 13,9 µL
- dNTP – 4 µL
- tampão – 2,5 µL
- MgCl₂ – 1,5 µL
- *Primer F₈* - 1 µL
- *Primer F₉* – 1 µL
- *Taq* DNA polimerase - 0,15 µL
- Adicionar 2 µL do PCR 1

Após a mistura dos reagentes especificados anteriormente, 26 µL da solução obtida foram transferidas para cada tubo de poliestireno (0,5 mL) para a reação de PCR II. Colocaram-se as amostras em um termociclador (TC-312, Analítica, UK) e após a desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, as mesmas foram submetidas a 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistia de: 94°C por 30 segundos para a desnaturação, 48°C por 30 segundos para a hibridização dos oligonucleotídeos, 72°C por 1 minuto para a síntese do DNA. Após o último ciclo, uma etapa de 72°C por 7 minutos foi acrescentada para o alongamento final das cadeias de DNA. Os produtos da reação de *nested* PCR estavam prontos para a visualização em eletroforese em gel de agarose.

Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR:

Os oligonucleotídeos (par de *primers*) utilizados nas reações de PCR correspondem à região do genoma VP1/2A e as polaridades, as posições no genoma e as seqüências nucleotídicas, podem ser vistos na Tabela 11.

Tabela 11. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR

Oligonucleotídeo	Polaridade	Posição no genoma	Seqüência (De Paula et al, 2002)
F6	Positiva	2897	TATTCAgATTgCAAATTAYaAT
F7	Negativa	3288	AAYTTCATYATTTTCATgCTCCT
F8	Positiva	2949	TTgTCTgTYACAgAACAATCAg
F9	Negativa	3192	AggRggTggAAgYACTTCATTTgA

5) Visualização dos produtos de PCR através do gel de eletroforese

Materiais:

- Tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE) (50x: 242g Tris base/ 57,1 mL de ácido acético glacial/ 100 mL de EDTA 0,05 M; pH 8,0)
- Tampão da amostra (50% de glicerol, 0,4% de azul de bromofenol, 0,4% de xileno cianol)
- Brometo de etídeo (EtBr) – 0,5µg/ mL
- Agarose 1,5% em tampão TAE contendo 0,5% de EtBr

- Padrão de peso molecular (247 pb) (□X174 DNA/Hae III fragments I) (Invitrogen, CA, EUA)

Um volume de 10 µL do produto da reação de *Nested* PCR foram submetidos à eletroforese (85 volts/ 40 minutos) em gel de agarose a 1,5%, contendo 0,5% de brometo de etídeo, em tampão TAE. O marcador molecular □X174 foi colocado em um orifício em cada gel para a determinação do tamanho da banda obtida na reação de PCR. Um controle negativo também foi utilizado em cada gel para confirmar e comparar com os resultados apresentados. Após a corrida eletroforética, o gel foi examinado em luz ultravioleta no transiluminador (TMW-20, UVP Imagestore, CA, EUA) para a visualização das bandas de DNA de 247 pb (pares de bases).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Resultados de coliformes totais e termotolerantes

O estudo do monitoramento de coliformes foi realizado porque estes microrganismos ainda são considerados os melhores indicadores da poluição microbiana das águas e também ainda são extensivamente usados como indicadores da eficiência de sistemas de tratamento de esgotos na remoção de microrganismos.

Antes da apresentação dos resultados, é preciso descrever que a ETE em estudo apresentou problemas operacionais (falhas na bomba de sucção) durante parte do período de coletas de amostras, comprometendo os resultados de coliformes presentes nos diversos estágios do processo de tratamento de esgoto.

Foram considerados como resultados fidedignos aqueles obtidos durante as coletas em que a ETE estava operando normalmente. Todos os resultados do afluente, antes da entrada no sistema, foram considerados. Entretanto, as médias dos resultados de coliformes obtidas dos pontos de coleta do lodo, do efluente do reator UASB e do efluente tratado foram correspondentes aos dias de coleta em que a ETE operou normalmente.

A seguir serão apresentados os resultados de coliformes totais e termotolerantes encontrados nos efluentes hospitalares (Tabelas 12 e 13) e a eficiência do sistema na remoção destes microrganismos (Tabela 14).

Tabela 12. Resultados de Coliformes Totais/ 100 mL

Datas	Entrada	Log₁₀	Lodo	Log₁₀	UASB	Log₁₀	Saída	Log₁₀
22/05/06*	1,8 x 10 ⁸	8,255	1,3 x 10 ⁷	7,113	1,6 x 10 ⁷	7,204	DN	-
06/06/06*	2,8 x 10 ⁷	7,447	7 x 10 ⁷	7,845	9,2 x 10 ⁷	7,963	1,6 x 10 ⁵	5,204
26/06/06	1,8 x 10 ⁸	8,255	-	-	-	-	-	-
17/07/06*	3,5 x 10 ⁸	8,544	3 x 10 ⁷	7,477	1,7 x 10 ⁸	8,230	9 x 10 ⁶	6,954
28/08/06*	3,4 x 10 ⁷	7,531	4 x 10 ⁶	6,602	1,6 x 10 ⁹	9,204	DN	-
12/09/06	4,7 x 10 ⁷	7,672	-	-	-	-	-	-
25/09/06	1,7 x 10 ⁷	7,230	-	-	-	-	-	-
07/11/06	2 x 10 ⁶	6,301	-	-	-	-	-	-
29/11/06*	1,6 x 10 ¹¹	11,204	DN	DN	1,6 x 10 ⁹	9,204	1,6 x 10 ⁷	7,204
Médias de Log₁₀		8,048		7,259		8,361		6,454
Médias geométricas	1,12 x 10⁸		1,2 x 10⁷		2,3 x 10⁸		2,8 x 10⁶	

• Datas das coletas em que a ETE operou normalmente. Os resultados das médias correspondentes ao lodo, à saída do reator UASB e do efluente final foram obtidos das coletas em que a ETE operou normalmente.
DN: Dados Não Obtidos

Tabela 13. Resultados de Coliformes Termotolerantes (E.coli)/ 100 mL

Datas	Entrada	Log₁₀	Lodo	Log₁₀	UASB	Log₁₀	Saída	Log₁₀
22/05/06*	2 x 10 ⁷	7,301	2 x 10 ⁴	4,301	2,4 x 10 ⁵	5,380	DN	-
06/06/06*	DN		DN		1,3 x 10 ⁷	7,113	1,6 x 10 ⁵	5,204
26/06/06	8 x 10 ⁶	6,903	-	-	-	-	-	-
17/07/06*	5,2 x 10 ⁷	7,716	1,3 x 10 ⁶	6,113	2,1 x 10 ⁷	7,322	5,6 x 10 ⁵	5,748
28/08/06*	2,2 x 10 ⁶	6,342	DN		DN		0	
12/09/06	3,3 x 10 ⁷	7,518	-	-	-	-	-	-
25/09/06	1,1 x 10 ⁶	6,041	-	-	-	-	-	-
07/11/06	0		-	-	-	-	-	-
29/11/06*	2 x 10 ⁹	9,301	DN		2,4 x 10 ⁷	7,380	4,8 x 10 ⁵	5,681
Médias de Log₁₀		7,303		5,207		6,798		5,544
Médias geométricas	2 x 10⁷		1,6 x 10⁵		6,3 x 10⁶		3,5 x 10⁵	

• Datas das coletas em que a ETE operou normalmente. Os resultados das médias correspondentes ao lodo, à saída do reator UASB e do efluente final foram obtidos das coletas em que a ETE operou normalmente.
DN: Dados Não Obtidos

Tabela 14. Resultados das eficiências médias de cada unidade que compõem o sistema e eficiência total na remoção de coliformes totais e termotolerantes

Parâmetros	Entrada	UASB	<i>E</i> (%)	Saída	<i>E</i> (%)	<i>E</i> total (%)
Col. Totais (NMP/100mL)	$1,12 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	-	$2,8 \times 10^6$	98,78	98,78
<i>E.coli</i> (NMP/100mL)	2×10^7	$6,3 \times 10^6$	68,5	$3,5 \times 10^5$	94,44	98,25

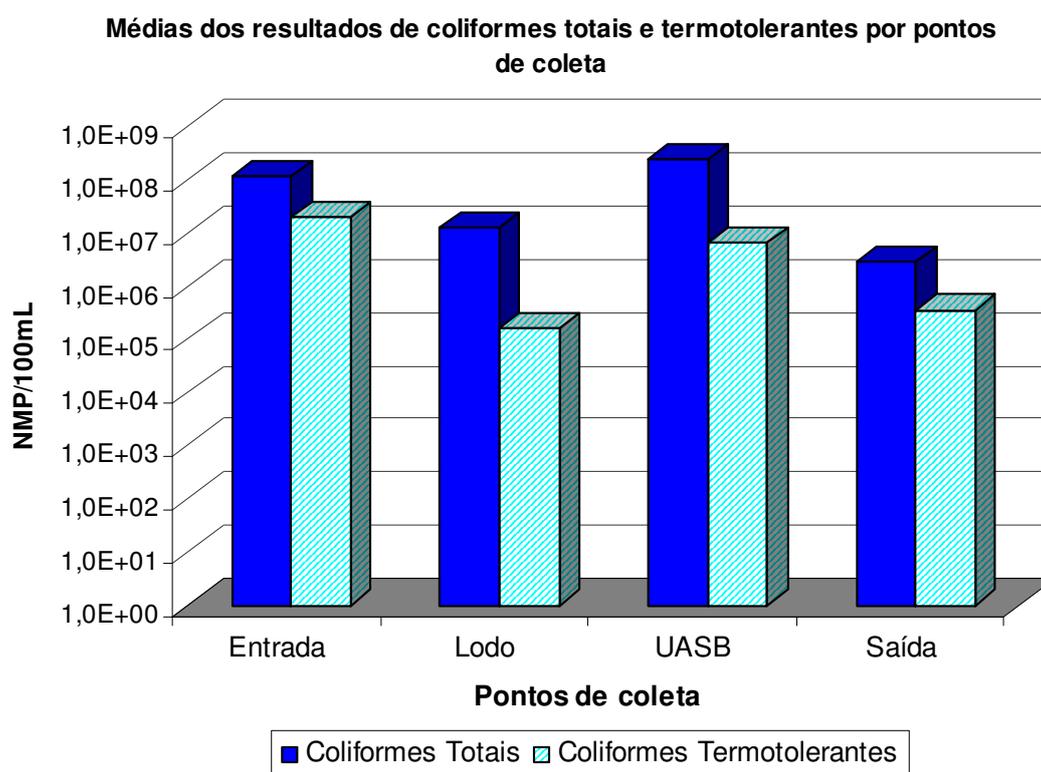


Figura 15. Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais e Termotolerantes por 100 mL de amostra pelos respectivos pontos de coleta.

O número de coliformes totais ($1,12 \times 10^8$ NMP/100 mL) e coliformes termotolerantes ($2,8 \times 10^6$ NMP/100 mL) encontrados no afluente hospitalar não diferiram muito das concentrações que geralmente ocorrem em afluentes de esgoto doméstico, cujas concentrações para coliformes totais frequentemente estão entre os valores de 10^6 a 10^{10} organismos por 100 mL e entre 10^6 a 10^9 para coliformes termotolerantes (VON SPERLING, 2005).

Entretanto, alguns trabalhos relataram que as concentrações de coliformes fecais encontradas no afluente de esgotos hospitalares apresentaram valores menores, da ordem de 10^3 a 10^6 bactérias por 100 mL (WEN et al, 2004; EMMANUEL et al, 2005; GALLERT et al, 2005).

Descreve-se na literatura internacional que os afluentes hospitalares geralmente apresentam concentrações de bactérias menores que 10^8 / 100 ml, comumente presentes nos sistemas de esgoto municipal (METCALF & EDDY, 1991 *apud* EMMANUEL et al, 2005). Uma hipótese para explicar o menor número de coliformes expressos por NMP nos efluentes hospitalares tem sido atribuída à presença de desinfetantes e antibióticos, que provavelmente possuem um potencial genotóxico para estas bactérias (LEPRAT, 1998 *apud* EMMANUEL et al, 2005).

No presente trabalho, nas condições normais de operação da ETE estudada, parece que os fatores que poderiam influenciar na queda do número de coliformes, tais como uma concentração elevada de medicamentos ou substâncias tóxicas, não foram significativos. Além disso, os dados de coliformes do afluente hospitalar também foram compatíveis com os dados apresentados por Guedes et al (2005) para as concentrações de coliformes presentes nos efluentes hospitalares de estabelecimentos de assistência à saúde em Minas Gerais.

As concentrações de coliformes termotolerantes (fecais) presentes no lodo de esgoto ($1,6 \times 10^5$ NMP/100 mL) foram elevadas. Entretanto, já era esperado que o lodo contivesse uma concentração alta de bactérias, tendo em vista que muitas delas permanecem retidas no reator UASB ao passarem através das camadas de lodo. Um estudo de Chitnis et al (2004) demonstra que uma maior concentração de bactérias permanece contida nas fases sólidas dos efluentes hospitalares filtrados em relação aos efluentes líquidos (CHITNIS et al, 2004).

Apesar do lodo de esgoto não ter sido retirado do reator UASB desde o período inicial de operação da ETE, deve-se considerar a possibilidade futura de retirada e o conseqüente descarte deste resíduo. A disposição de lodo proveniente de ETEs hospitalares em aterros sanitários ou em outros locais não apropriados pode comprometer as condições do ambiente em que este resíduo for disposto, caso não haja um processo de desinfecção adequado.

O descarte de lodo de ETEs, muitas vezes, é realizado em corpos hídricos ou em lixões, provocando impacto ambiental devido à concentração de substâncias tóxicas, metais pesados e microrganismos potencialmente patogênicos. As bactérias podem permanecer ativas no lodo ou na mistura solo-lodo por longos períodos, podendo contaminar o lençol freático através da percolação do líquido contaminado através do solo. Mesmo após a desidratação e à desinfecção através de radiação solar, o lodo permanece com uma alta concentração de coliformes.

Chitnis et al (2004) avaliaram as concentrações de bactérias presentes no lodo líquido e no lodo seco de uma estação de tratamento de esgoto hospitalar e encontraram a concentração de

$3,4 \times 10^5$ UFC/g no lodo úmido. O lodo foi exposto à radiação solar e este processo não apresentou um efeito satisfatório na redução da população de bactérias. A concentração aumentou para $5,7 \times 10^8$ UFC/g, indicando a interferência da turbidez neste processo de desinfecção.

Prado et al (2003) também encontraram resultados semelhantes sobre a viabilidade de bactérias no lodo de esgoto aplicado no solo e submetido à exposição da radiação solar por períodos de tempo prolongados. Foi concluído que de um a dois dias após a aplicação de lodo no solo há um aumento da população bacteriana inicial e somente após 15 dias de exposição à radiação é que a população de coliformes decresce consideravelmente. Durante este período de 15 dias, há um risco eminente de percolação de bactérias através do solo e também há um risco de contaminação humana através da manipulação ou do contato com este solo contendo o lodo infectado. Por este motivo, é necessário que sempre se realize o monitoramento adequado deste resíduo, a fim de evitar danos à saúde e ao meio ambiente.

Em decorrência das altas concentrações de microrganismos patogênicos, de metais pesados e das evidências de contaminação por substâncias tóxicas tais como medicamentos, a aplicação de lodo de esgoto proveniente de estabelecimentos de assistência à saúde para outras finalidades, como, por exemplo, na reutilização como fertilizante agrícola, é desconsiderada.

Outros tipos de microrganismos presentes no lodo de esgoto hospitalar, tais como vírus patogênicos e bactérias resistentes a antibióticos, também devem ser monitorados e a discussão envolvendo a contaminação do lodo da ETE hospitalar por estes agentes será discutido posteriormente.

Os valores obtidos de coliformes totais na saída do reator UASB foram bastante elevadas ($2,3 \times 10^8$ NMP/100 mL) e não ocorreu uma redução satisfatória destes microrganismos através deste processo de tratamento. A eficiência média de remoção de coliformes fecais através do processo de tratamento por reator UASB apresentou um resultado de 68,5%, valor abaixo da eficiência média de remoção de coliformes que geralmente varia entre 70 a 90% para este tipo de tratamento (VON SPERLING, 2005).

Com relação às eficiências médias totais de remoção de coliformes após a passagem dos efluentes pelos filtros anaeróbios (98,78% de remoção para coliformes totais e 98,25% de remoção para coliformes fecais) estas se apresentaram na faixa dos valores encontrados na literatura para padrões de eficiência de sistemas de fossa séptica, seguido de pós-tratamento por filtro anaeróbio (70 a 90%) (VON SPERLING, 2005).

Como as tecnologias de reator UASB seguida por várias opções de pós-tratamento são relativamente recentes no Brasil, ainda não há dados suficientes na literatura sobre a eficiência de remoção de coliformes nestes tipos de sistemas, pois, as opções de pós-tratamento também são

bastante diversificadas. Além disso, o tipo de sistema composto de reator UASB seguido pelo pós-tratamento de três filtros anaeróbios dispostos em série é raro na literatura, sendo mais freqüente a utilização de reator UASB seguido de pós-tratamento de filtro anaeróbio de câmara única.

Mello Júnior (1999) analisou a eficiência de remoção de coliformes em um sistema de tratamento de esgoto, compostos por unidades de tanque séptico seguido de pós-tratamento por três filtros anaeróbios dispostos em série, tratando esgoto de beneficiamento de pescado. As concentrações de coliformes nos efluentes finais também foram da ordem de 10^6 NMP/ mL (MELLO JÚNIOR, 1999).

Apesar das eficiências médias de remoção final de coliformes, após a passagem pelo tratamento dos filtros anaeróbios, terem atingido 98,78% para coliformes totais e 98,25% de remoção para coliformes fecais, os números de coliformes encontrados na saída do sistema são bastante elevados ($2,8 \times 10^6$ e $3,5 \times 10^5$ NMP/ 100 mL, respectivamente) e não se enquadram nos valores de coliformes termotolerantes permitidos para padrões de corpo receptor de classe II, estabelecido pela Resolução CONAMA 357/2005. De acordo com esta Resolução, não deve ser excedido um limite de 1000 coliformes termotolerantes por 100 mL de amostra.

Estudos desenvolvidos por Von Sperling e Chernicharo (2000 *apud* SOARES et al, 2002) indicam que as tecnologias de tratamento de esgotos empregadas no Brasil são eficientes somente no que se refere à remoção de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Sólidos em Suspensão (SS). Entretanto, não produzem um efluente compatível com os padrões de qualidade exigidos pela legislação anteriormente referida em termos de amônia, nitrogênio, coliformes fecais e fósforo.

Desta forma, como descrito por estes autores, o sistema de tratamento estudado se mostrou eficiente na remoção dos parâmetros físico-químicos analisados e os valores encontrados no efluente final de pH = 6,54, DBO₅ = 4,25 mg/ L e turbidez = 5,34 UNT atingem um limite adequado, atendendo às especificações da Resolução CONAMA 357/2005 para padrões de corpos receptores de classe II. Entretanto, ele não se mostra muito adequado para reduzir a carga de microrganismos como desejado.

Deve-se descrever que o sistema foi projetado para operar com valores de carga orgânica maiores do que os apresentados pela presente pesquisa. Uma hipótese pode ser atribuída a possíveis mudanças de atividades exercidas no estabelecimento ou à diminuição da capacidade de atendimento hospitalar.

Entretanto, os valores dos parâmetros obtidos para pH, DBO₅, DQO, amônia e turbidez no esgoto hospitalar estão de acordo com os valores encontrados por Wen et al (2004) e os valores de DBO₅ e DQO também se enquadram nos valores de referência estabelecidos na França para

padrões de esgotos hospitalares (*Ministere de l'aménagement du territoire et de l'environnement apud* EMMANUEL et al, 2005).

As concentrações de carga orgânica e presença de microrganismos patogênicos podem ser variáveis de acordo com as atividades exercidas em cada hospital, com a capacidade de atendimento e com a região geográfica em que se localiza cada estabelecimento.

No que se refere às condições específicas do tipo de esgoto hospitalar estudado, a fração de DQO/ DBO₅ encontrada no afluente hospitalar e nos efluentes das etapas do processo de tratamento, encontrou-se acima da faixa de 3,5 ou 4, indicando que a fração não biodegradável do esgoto é elevada e que outro tipo de tratamento, como o físico-químico, poderia ser a melhor opção (VON SPERLING, 2005).

Porém, muitos tratamentos físico-químicos também podem não ser capazes de remover com a eficiência desejada os microrganismos patogênicos presentes em tais ambientes. Várias alternativas de tratamento já foram descritas anteriormente e poderiam ser aplicadas nestas situações.

Entretanto, cabe uma análise mais detalhada sobre a real composição química e da matéria orgânica não biodegradável dos efluentes hospitalares para verificar qual seria a opção mais adequada para as condições específicas de cada localidade, levando-se em consideração que sistemas que empregam processo anaeróbio de tratamento apresentam algumas vantagens, tais como custos reduzidos de implantação, operação e manutenção se comparado aos sistemas que empregam processo aeróbio de tratamento, tornando-os viáveis para serem implementados em estabelecimentos de assistência à saúde.

A concentração elevada de carga tóxica, que poderia ser um fator limitante para a aplicação do sistema anaeróbio no tratamento de efluentes hospitalares, parece não ter tido grande influência na eficiência da remoção de DQO e DBO₅ do sistema avaliado na presente pesquisa.

Entretanto, uma maior eficiência de remoção destes parâmetros e de coliformes poderia ter sido observada se o sistema operasse continuamente, sem interrupções devido às falhas mecânicas. Chelliapan et al (2006) estudaram a viabilidade de um sistema anaeróbio para o tratamento de um efluente contendo altas concentrações de medicamentos e verificaram um bom estado de funcionamento para as condições propostas.

Ainda que se tenha discutido a eficiência deste sistema na remoção de coliformes, esta alternativa de tratamento não deve ser desconsiderada para o tratamento de efluentes hospitalares, pois, mesmo não atingindo concentrações de coliformes desejadas no efluente tratado, o sistema foi capaz de remover 2 unidades logarítmicas em relação à concentração do afluente. Esta redução tem um maior impacto para as regiões onde não há serviços de esgotamento adequado (condição de

grande parte dos municípios brasileiros) e onde os esgotos, sejam eles domésticos ou hospitalares, são lançados *in natura* nos corpos receptores (IBGE, 2000).

A ETE hospitalar em estudo também apresenta a vantagem de ser coberta. Não havia emanção de maus odores e nem o risco de dispersão de aerossóis próximos ao hospital. Também é importante salientar que tal sistema apresenta uma etapa de desinfecção do efluente final, através de cloração, com a adição de pastilhas de hipoclorito de cálcio e que, devido a um acordo estabelecido entre a direção e os técnicos de operação da estação, aquelas não foram introduzidas durante o período de estudo. Provavelmente, as concentrações de cloro eliminariam a maioria dos microrganismos presentes no efluente final.

Mas, seria interessante o incentivo de sistemas que não utilizassem cloro como processo de desinfecção, pois, este composto pode reagir com a matéria orgânica presente, gerando compostos altamente tóxicos e com potencial carcinogênico, como os trihalometanos. Estes compostos podem persistir no ambiente e causar diversos danos à microbiota e à biota do ecossistema, além da possibilidade de provocar danos eventuais à saúde pública.

Porém, o processo de desinfecção de efluentes através de cloração ainda é bastante utilizado e apresenta menores custos e maiores facilidades de aplicação se comparado a outros métodos utilizados com esta finalidade como a ozonização, a radiação ultravioleta ou a filtração em membrana, entre outros, justificando a preponderância de seu uso nas estações de tratamento de esgoto existentes no país.

O estudo de métodos alternativos de desinfecção de efluentes que sejam eficientes e apresentem menores custos de implantação, deve ser incentivado para minimizar os impactos decorrentes do lançamento de substâncias tóxicas e microrganismos patogênicos no ambiente.

4.2 – Resultados da detecção de enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa*

Os meios de cultura utilizados nesta pesquisa foram escolhidos devido à sua especificidade para isolar e identificar os microrganismos de interesse. O meio de Tergitol – 7 com adição de TTC foi escolhido inicialmente para realizar uma contagem diferencial das espécies de coliformes contidas nas amostras.

O ágar tergitol – 7 é um meio seletivo e diferencial para a detecção e enumeração de coliformes em amostras de alimentos e água. A adição de TTC permite o reconhecimento antecipado e a identificação de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*. O Tergitol – 7 inibe os

microrganismos Gram positivos e a fermentação de lactose é visualizada pela alteração na cor do indicador de pH: azul de bromotimol. O TTC é rapidamente reduzido a formazan, um composto insolúvel de cor vermelha pela maioria dos microrganismos, exceto por *E.coli*, *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.* As colônias de *E.coli* são amarelas, com área amarelada, algumas vezes com centro cor de ferrugem e *Enterobacter* e *Klebsiella spp* apresentam colônias amarelo-esverdeadas, geralmente, mucóides. As demais espécies apresentam colônias vermelhas com área azulada.

O meio de EMB é preparado de acordo com a fórmula especificada pela APHA (1998) para a detecção e diferenciação de microrganismos do grupo coliforme. O meio é mais utilizado para o isolamento e a identificação de *E.coli* e *Enterobacter aerogenes*.

O meio de GSP foi proposto por Kielwein em 1971 para a detecção de *Aeromonas spp.* e *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de alimentos e águas residuárias (FLINT et al, 1996).

Entretanto, a detecção das bactérias de interesse através do uso destes meios de cultura foi bastante variável, e o uso do Tergitol – 7 para a contagem dos coliformes não se mostrou muito adequado, como será discutido adiante. Algumas diluições foram testadas para o conhecimento do número de colônias que cresceriam nas placas. Deve-se descrever que a ETE passou por problemas operacionais durante parte do período de coleta de amostras, o que acabou comprometendo o isolamento de muitas colônias, sobretudo do ponto de coleta correspondente ao efluente tratado. Os resultados do número médio de bactérias que cresceram nas placas são correspondentes às datas em que a ETE operou normalmente, pois, quando a mesma não operou em situação normal, os resultados foram muito diversos e os números de colônias que cresceram nos meios de cultura foram muito baixos. Apenas para os resultados do afluente foram considerados todos os dados obtidos para o resultado das médias de UFC nas placas.

Todos os resultados obtidos do crescimento de colônias, independentemente dos dias de coleta, estão inseridos em anexo.

O resultado da contagem total média de colônias que cresceram nos meios de cultura está apresentado na Tabela 15.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 15, a melhor diluição para promover o crescimento e o isolamento de bactérias nos três meios de cultura foi 10^{-1} . O número médio de colônias que cresceram nos meios de cultura foi de 25 bactérias por placa, sendo a concentração mais adequada para o isolamento das colônias.

Tabela 15. Média das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) nos respectivos meios de cultura por pontos de coleta*

Meios de cultura	Entrada	Lodo	UASB	Saída
Tergitol puro	340,8	246	162,25	253,33
Tergitol 10 ⁻¹	21,69	27,33	41,25	2
Tergitol 10 ⁻²	2,39	3,66	1,25	1,5
Tergitol 10 ⁻³	0,41	0	0	0
EMB puro	190,96	138,33	191,33	138,33
EMB 10 ⁻¹	36,64	45	28	3,75
EMB 10 ⁻²	2,16	3,33	2,75	0
EMB 10 ⁻³	0	0	0	0
GSP puro	202,62	208	126,66	240
GSP 10 ⁻¹	22,02	18,33	24,25	7,75
GSP 10 ⁻²	2,51	2,66	1,25	0,75
GSP 10 ⁻³	0	0	0	0

* A média dos resultados são correspondentes aos valores encontrados nas datas de coleta em que a ETE operou normalmente.

A introdução de 10 µL sem diluição nas placas promoveu um crescimento muito acentuado de colônias, sendo que a quantidade média de bactérias que cresceram em todos os meios de cultura por placa foi geralmente maior do que 200 UFC, independentemente do ponto de coleta. O isolamento de colônias ficou comprometido nesta concentração, pois as colônias ficavam muito próximas umas das outras e frequentemente sobrepostas, de modo que muitas colônias poderiam estar contaminadas por mais de um microrganismo, comprometendo o isolamento e a identificação das espécies.

Nas diluições de 10⁻² e 10⁻³ o número médio de bactérias que cresceram nos meios de cultura por placa foi de 2,5 bactérias e praticamente zero bactérias, respectivamente. A quantidade de 2,5 bactérias por placa é muito pequena para estimar a variedade de espécies contidas nas amostras analisadas, podendo subestimar os valores reais de coliformes. A diluição de 10⁻³ sobre a concentração inicial de 10µL de amostra não se mostrou efetiva para a detecção dos microrganismos.

A viabilidade do meio de Tergitol - 7 para quantificar os números de coliformes, mostrou-se pouco adequada, uma vez que, em algumas coletas, outros tipos de microrganismos, como bacilos Gram negativos não fermentadores cresceram neste meio e apresentaram colônias semelhantes àquelas referidas para detectar espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter*, comprometendo a identificação de coliformes presentes nas amostras analisadas. Além disso, espécies de *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas sp.* e *E.coli* apresentaram, em algumas análises,

colônias com o mesmo tipo de coloração vermelha, sendo que espécies de *E.coli* e *Klebsiella pneumoniae* deveriam se diferenciar das outras espécies pela coloração referida.

As espécies de *E.coli* deveriam crescer antes do crescimento de outras colônias nas placas, mas este comportamento não foi observado. Portanto, este meio pôde ser considerado mais adequado para realizar uma triagem inicial da população de enterobactérias presentes nas amostras, sendo pouco eficiente para quantificar com precisão as espécies de coliformes presentes nas amostras de esgoto e lodo de esgoto.

Yáñez et al (2005) analisaram um método alternativo utilizando o agar Tergitol – 7 com a adição de TTC para a identificação e a enumeração de coliformes em amostras de água. Foi proposta uma filtração de 100 mL de amostra em uma membrana de ester celulose, com tamanho de poro 0,45 µm (Millipore) incubada em agar Tergitol – 7. Após o crescimento, as colônias amarelas ou alaranjadas foram contadas como coliformes presuntivos e a membrana foi transferida para o ágar TBX (modificação do agar bile tripton), onde o substrato 5–bromo–4–cloro–3– indol – b –D–glucuronide – BCIG - foi adicionado. Este substrato (BCIG) é clivado pela enzima β–D–glucuronidase (GUD) que é produzida por aproximadamente 95% de cepas de *E.coli*. Após a incubação a 44°C por 2 horas, todas as colônias amarelas ou alaranjadas que apresentaram uma turvação da coloração original para verde foram contadas como *E.coli*.

Os resultados foram expressos por número de coliformes presentes em 100 mL de amostra. O método foi comparado estatisticamente a outros métodos, tais como agar Chromocult e não foi verificada uma diferença significativa entre eles (YÁNEZ et al, 2005). A maior limitação do método é o tempo requerido, que leva pelo menos dois dias para a completa identificação das colônias típicas. Entretanto, o método apresenta como vantagem a simplicidade e os menores custos envolvidos para realizar as análises (YÁNEZ et al, 2005).

Discute-se também a viabilidade do método proposto por Yanez et al (2005) para isolar e quantificar os microrganismos das amostras de esgoto e lodo de esgoto, pois estas amostras possuem uma turbidez elevada, o que pode comprometer a etapa da filtração em membrana.

Outros meios cromogênicos como o agar Chromocult, que também permite o isolamento de colônias ou cromofluorogênicos como o kit comercial “Colillert®” comercializado pelo IDEXX, também são eficientes para a quantificação de coliformes em amostras ambientais. Entretanto, os custos envolvidos na aquisição dos materiais necessários podem restringir o uso destes métodos.

O meio de EMB utilizado nesta pesquisa foi adequado para detectar *E.coli* e espécies de *Klebsiella sp.* e *Enterobacter sp.*, embora muitas colônias de *Klebsiella* e *Enterobacter* não tenham se diferenciado umas das outras, apresentando morfologia semelhante.

Quanto ao meio de GSP poucas espécies de *Pseudomonas aeruginosa* puderam ser isoladas. Espécies de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e algumas bactérias não fermentadoras de glicose frequentemente cresceram neste meio. Além disso, o meio não se mostrou muito diferencial para isolar *Pseudomonas aeruginosa*, pois, muitas bactérias que cresciam neste meio, apresentavam a mesma coloração (ver Figura 12).

Algumas hipóteses podem ser levantadas: a concentração de *Pseudomonas aeruginosa* presentes no tipo de esgoto analisado poderia ser baixa ou poderia estar ocorrendo a inibição destas bactérias no meio de cultura por outras espécies de bactérias presentes na amostra ou por compostos contidos no esgoto hospitalar que poderiam interferir no crescimento destas bactérias.

Chitnis et al (2004) encontraram uma baixa concentração de *Pseudomonas aeruginosa* presentes nos efluentes de um esgoto hospitalar quando comparadas com as concentrações de coliformes e, de acordo com o seu trabalho, o grupo de bactérias predominantes no tipo de esgoto hospitalar foi o entérico (CHITNIS et al, 2004).

Durante todo o período de coletas foram isoladas 220 colônias de bactérias entre enterobactérias e bactérias pertencentes a outros gêneros que não foram do interesse da presente pesquisa. Entretanto, foi possível verificar que muitos tipos de microrganismos que são característicos dos esgotos domésticos, tais como *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Alcaligenes denitrificans*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de bactérias Gram positivas também estão presentes nos efluentes hospitalares.

A distribuição das bactérias identificadas por pontos de coleta está expressa na Tabela 16 e a distribuição do número de colônias totais, de bactérias pertencentes ao gênero das enterobactérias e de *Klebsiella pneumoniae* identificadas por pontos de coleta está apresentada na Tabela 17.

Tabela 16. Bactérias identificadas nos pontos de coleta

Entrada Bactérias (n)	Lodo Bactérias (n)	UASB Bactérias (n)	Saída Bactérias (n)
<i>E.coli</i> (17)	<i>E.coli</i> (3)	<i>E. coli</i> (4)	<i>E. coli</i> (5)
<i>K.pneumoniae</i> (36)	<i>K.pneumoniae</i> (11)	<i>K. pneumoniae</i> (18)	<i>K. pneumoniae</i> (8)
<i>K. oxytoca</i> (1)	<i>Enterobacter sp</i> (2)	<i>Enterobacter sp</i> (2)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)
<i>Serratia sp</i> (1)	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Aeromonas</i>

	<i>cloacae</i> (1)	<i>cloacae</i> (1)	<i>hydrophila</i> (1)
<i>Serratia marcenscens</i> (1)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (2)	<i>K. oxytoca</i> (1)	<i>Aeromonas sp</i> (1)
<i>Serratia rubidaea</i> (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	<i>Enterobacter cloacae</i> (2)
<i>Citrobacter sp</i> (1)	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> (1)	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> (2)	<i>Diplococo Gram positivo</i> (1)
<i>Citrobacter freundii</i> (1)	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (1)	<i>Serratia sp</i> (1)	
<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)	<i>Alcaligenes sp</i> (2)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (2)	
<i>Enterobacter agglomerans</i> (2)	<i>Sphingobacterium sp</i> (1)	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (2)	
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	<i>Shingomonas prucimobilis</i> (1)	<i>Alcaligenes sp</i> (1)	
<i>Enterobacter sp</i> (3)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (4)	<i>Alcaligenes piechaudii</i> (1)	
<i>Enterobacter gergoviae</i> (1)	<i>Chromobacterium violáceo</i> (1)	<i>Aeromonas sp</i> (2)	
<i>Enterobacter sakazakii</i> (1)	Bastonete Gram negativo (2)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (6)	
<i>Pantoea agglomerans</i> (1)	Coco Gram negativo (1)	<i>Aerogenes denitrificans</i> (1)	
<i>Acinetobacter baumannii</i> (1)	BGN não fermentador (6)	<i>Roseomonas sp</i> (2)	
<i>Acinetobacter lwoffii</i> (2)	Coco Gram positivo (1)	BGN não fermentador (20)	
<i>A. xiloridans</i> (1)		Coco Gram positivo (2)	
<i>Shingomonas sp</i> (1)			
<i>Alcaligenes denitrificans</i> (2)			
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (2)			
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> (1)			
<i>Aeromonas hydrophila</i> (5)			
BGN não fermentador (2)			
Bacilo Gram negativo (2)			
Coco Bacilo Gram negativo (2)			
Coco Gram positivo (2)			
Variedade de espécies = 27	Variedade de espécies = 17	Variedade de espécies = 18	Variedade de espécies = 7

Tabela 17. Distribuição do número de colônias identificadas por pontos de coleta

Pontos de coleta	N° total de colônias	N° de enterobactérias	N° de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Entrada	92	66	36
Lodo	38	19	11
UASB	70	26	18
Saída	20	15	8
Total	220	126	73

Através dos resultados foi possível observar que o afluente hospitalar continha uma maior variedade de espécies de bactérias, enquanto o efluente final apresentou uma menor variação, possivelmente porque grande parte das bactérias presentes no esgoto ficou retida nos filtros anaeróbios.

Entretanto, microrganismos tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas spp* e diplococos Gram positivos foram detectados na saída final do efluente, juntamente com outros coliformes, mostrando que estes microrganismos também são persistentes ao processo de tratamento empregado.

Chitnis et al (2004) analisaram a redução da população bacteriana em um sistema de tratamento de esgoto hospitalar e concluíram que *Pseudomonas* e *Staphylococcos* foram mais resistentes ao processo de tratamento sendo que suas concentrações foram mantidas até o estágio final de cloração. O efluente tratado com cloro no último estágio (tanque de tratamento) destruiu a massa bacteriana e as bactérias residuais ($5,1 \times 10^2/\text{mL}$) foram predominantemente de esporos de bacilos aeróbios.

O menor número de bactérias isoladas no efluente final do sistema também é decorrente das condições operacionais da ETE durante parte das coletas realizadas, comprometendo o crescimento e o isolamento de muitas bactérias. Disto decorre que praticamente nenhuma bactéria cresceu nos meios de cultura correspondentes às amostras do efluente final quando a ETE não operou normalmente.

Mesmo sob estas condições, foi interessante observar que a população de bactérias se alterava, sendo que, nestas coletas em que a ETE estava parada, as bactérias predominantes das

amostras correspondentes à saída do reator UASB não eram enterobactérias, mas cocos Gram positivos e Bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose. Isto pode significar que as enterobactérias são mais sensíveis aos processos biológicos de tratamento de esgotos e que o decaimento bacteriano ocorre mais rápido em relação às outras bactérias.

Uma hipótese é que na competição pelo consumo de nutrientes, as enterobactérias podem ser mais vulneráveis. Nas condições em que a ETE estava parada, a fração da matéria orgânica biodegradável já havia sido consumida (Ver resultados de DBO₅ na Tabela 21 em anexo). Como a glicose é a fonte mais utilizada de carbono pelas enterobactérias, a falta deste substrato pode ter contribuído para a morte das bactérias.

Muitas das colônias identificadas foram mantidas em agar estoque para serem utilizadas posteriormente nos testes de antibiograma. Das 73 *Klebsiella pneumoniae* identificadas, 43 foram utilizadas para a análise do antibiograma.

4.3 – Resultados do antibiograma

O estudo da susceptibilidade bacteriana aos diferentes antibióticos disponíveis e utilizados na clínica médica é importante devido à necessidade do conhecimento da eficiência de tais medicamentos no controle das infecções e devido aos altos índices de infecção hospitalar associada com a disseminação e ao aumento na frequência de bactérias resistentes aos antimicrobianos em várias regiões do mundo.

O Ministério da Saúde define infecção hospitalar como aquela adquirida após a admissão do paciente no hospital e cuja manifestação de infecção ocorre durante a internação ou após a alta, podendo ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (VILLAS BÔAS et al, 2004). Ainda que muitos dados sobre o índice geral de infecção hospitalar não sejam frequentemente divulgados no Brasil (TURRINI et al, 2002), estudos isolados em hospitais brasileiros têm detectado altas taxas de infecção hospitalar (GALLES et al, 1997; DE MORAIS et al, 2000; VILLAS BÔAS et al, 2004; SILVA et al, 2006).

Os impactos negativos gerados à saúde pública devido à ocorrência de infecção hospitalar elevada são decorrentes do aumento no tempo de internação, do aumento nos custos de internação e nos maiores índices de mortalidade na população acometida (VILLAS BÔAS et al, 2004). As infecções hospitalares acometem principalmente os pacientes submetidos aos

procedimentos invasivos, tais como cirurgias e são bastante frequentes nas Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs), nos pacientes com o sistema imunológico comprometido ou nos grupos vulneráveis e mais susceptíveis, como idosos, pacientes com diabetes mellitus, HIV ou AIDS e patologia pulmonar, entre outras (DE MORAIS et al, 2000; VILLAS BÔAS et al, 2004; SILVA et al, 2006).

Um estudo realizado em um Hospital Universitário em São Paulo, de 1999 a 2000, mostrou que a taxa de infecção hospitalar encontrada nos pacientes idosos internados foi de 23,6%, um número bastante elevado e a taxa de mortalidade dos pacientes com infecção hospitalar foi mais alta do que a dos pacientes que não apresentaram infecção: 22,9% contra 9,6%, respectivamente (VILLAS BÔAS et al, 2004).

A resistência bacteriana tem emergido como um problema mundialmente importante, fazendo com que muitas classes de antimicrobianos tenham se tornado menos efetivas nos últimos anos (GALLES et al, 1997). A principal causa no aumento de bactérias resistentes a antibióticos está associada com o uso indiscriminado destes medicamentos, sobretudo na cura de doenças comuns, tais como diarreias, que, muitas vezes, poderiam ser tratadas de formas alternativas (DINIZ-SANTOS et al, 2006).

Para controlar estas infecções, os pacientes são submetidos cada vez mais a antimicrobianos mais potentes e estáveis aos mecanismos de resistência bacteriana.

Uma das maiores preocupações atualmente envolve o aumento de bactérias que expressam fenótipos de resistência contra uma grande variedade de antibióticos e estão associadas com enzimas que geralmente hidrolizam tais medicamentos. Estas enzimas são conhecidas como β -lactamases e provocam resistência contra a maioria dos antibióticos β -lactâmicos utilizados contra elas, incluindo as penicilinas e as cefalosporinas.

As β -lactamases constituem um grupo heterogêneo de enzimas produzidas por diferentes microrganismos. A atividade enzimática é variável de acordo com o tipo de β -lactamase produzida. A produção destas enzimas é codificada geneticamente no cromossomo bacteriano e em plasmídios e transposons (TAVARES, 1996).

Os genes de resistência mediados através de plasmídios e transposons (elementos genéticos móveis) são particularmente importantes na disseminação dos genes de resistência entre as espécies, principalmente em ambientes que promovem uma maior pressão seletiva.

Muitas β -lactamases têm sido identificadas atualmente e elas são classificadas de acordo com a origem genética, de acordo com os antibióticos aos quais atuam, de acordo com o seu peso molecular, com a mobilidade eletroforética, com a inibição por diferentes substâncias e com o perfil das proteínas de acordo com o seu potencial isoelétrico (TAVARES, 1996). Estas classes de

enzimas estão presentes nas bactérias Gram negativas e, sobretudo, nas espécies da família das *Enterobacteriaceae*. As enzimas que promovem resistência contra a maioria dos antibióticos β -lactâmicos são conhecidas como β -lactamases de espectro estendido (ou ampliado) – ESBLs.

Atualmente grande parte das infecções hospitalares é provocada por bacilos Gram negativos, especialmente os pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* (TORTORA et al, 2002). A *Klebsiella pneumoniae* tem sido uma das bactérias mais importantes associadas às infecções hospitalares e elas são particularmente muito comuns nas infecções do trato urinário, do trato respiratório, em abscessos do fígado e nas bacteremias primárias (SUN et al, 2006). A detecção destas bactérias no ambiente hospitalar, bem como em amostras ambientais também é importante para avaliar os perfis de resistência bacteriana do local analisado e para identificar as possíveis rotas de contaminação e disseminação destes agentes.

Desta forma, na presente pesquisa, isolados de *Klebsiella pneumoniae* de amostras de esgoto e lodo de esgoto hospitalar foram submetidas aos testes de susceptibilidade antimicrobiana a uma série de antibióticos utilizados contra bactérias Gram negativas e de uso rotineiro na clínica médica. Os resultados do antibiograma, as frequências relativas de bactérias resistentes por antibiótico utilizado, encontradas no esgoto hospitalar, estão expressas na Tabela 18 e na Figura 16.

Para uma análise mais concisa dos resultados, serão consideradas bactérias resistentes aquelas que expressaram o fenótipo de resistência juntamente com aquelas que expressaram o fenótipo de resistência intermediária aos antibióticos testados.

De acordo com os resultados apresentados, as espécies de *Klebsiella pneumoniae* analisadas neste estudo foram mais resistentes ao antibiótico aminoglicosídeo gentamicina (44,18%), seguida pela resistência às cefalosporinas de 2^a e 3^a gerações, cefoxitina (27,9%) e ceftriaxona (27,9%), pelo sulfametoxazol-trimetoprim (25,58%), pela tetraciclina (25,58%), imipenem (13,95%), ceftazidima (11,62%) e amicacina (11,62%).

As maiores frequências de sensibilidade foram encontradas para os antibióticos: cefepime (6,97% de resistência), ciprofloxacina (6,97%) e cloranfenicol (6,97%).

Das bactérias resistentes, 32,5% apresentaram resistência simultânea para dois ou mais antibióticos, sendo consideradas como multirresistentes. A maioria das bactérias multirresistentes apresentaram ESBLs (%) e resistência simultânea, principalmente, contra as cefalosporinas. Um número expressivo do total de bactérias apresentou produção de ESBL, correspondendo a 46,51% do total.

Tabela 18. Frequência de *Klebsiella pneumoniae* resistentes, com resistência intermediária e a somatória da frequência das bactérias resistentes e intermediárias aos antibióticos utilizados

Antibióticos	Frequência (%) de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes (n = 43)	Frequência (%) de <i>Klebsiella pneumoniae</i> intermediárias (n = 43)	Frequência (%) de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes e intermediárias (n = 43)
CRO	6,97% (n = 3)	20,93% (n = 9)	27,90% (n = 12)
CAZ	9,30% (n = 4)	2,32% (n = 1)	11,62% (n = 5)
FEP	2,32% (n = 1)	4,65% (n = 2)	6,97% (n = 3)
IMP	13,95% (n = 6)	0% (n = 0)	13,95% (n = 6)
CN	34,88% (n = 15)	9,30% (n = 4)	44,18% (n = 19)
AK	11,62% (n = 5)	0% (n = 0)	11,62% (n = 5)
CIP	4,65% (n = 2)	2,32% (n = 1)	6,97% (n = 3)
SXT	23,25% (n = 10)	2,32% (n = 1)	25,58% (n = 11)
CLO	4,65% (n = 2)	2,32% (n = 1)	6,97% (n = 3)
TET	4,65% (n = 2)	20,93% (n = 9)	25,58% (n = 11)
FOX	25,58% (n = 11)	2,32% (n = 1)	27,90% (n = 12)
ESBL +	46,51% (n = 20)		
MR	32,5% (n = 14)		

CRO: Ceftriaxona; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepima; IMP: Imipenem; CN: Gentamicina; AK: Amicacina; CIP: Ciprofloxacina; SXT: Sulfametoxazol – Trimetoprim; CLO: Cloranfenicol; TET: Tetraciclina; FOX: Cefoxitina; ESBL: β – Lactamases de Espectro Estendido; MR: Bactérias Multi-resistentes (foram consideradas as bactérias com resistência a dois ou mais antibióticos).

Através dos resultados da pesquisa foi possível observar que um grande número de bactérias apresentou produção de β – lactamases de espectro estendido - ESBL (46,51%). Desde o seu reconhecimento inicial, estas enzimas têm sofrido alterações bioquímicas substanciais e têm sido detectadas em todo o mundo, sendo mais prevalentes entre as espécies de *Escherichia coli* e *Klebsiella sp.* (KOTAPATI et al, 2005).

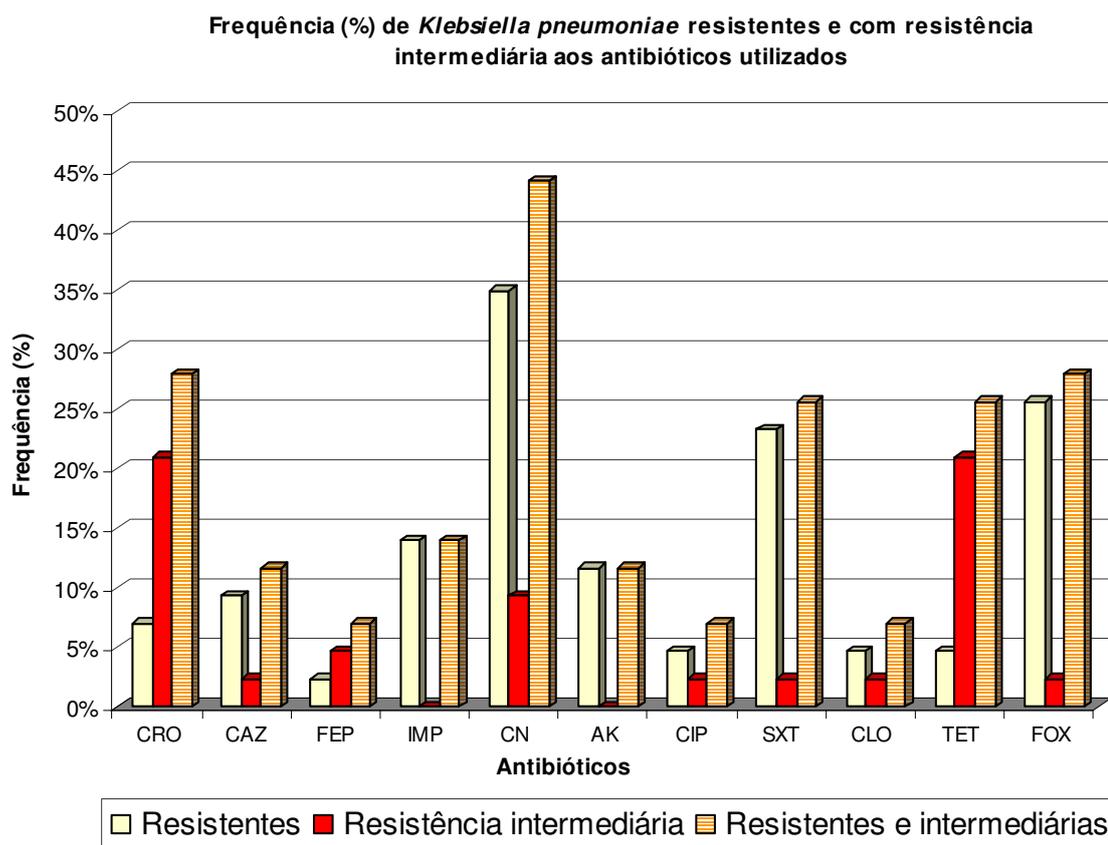


Figura 16. Frequência (%) de *Klebsiella pneumoniae* resistentes e com resistência intermediária aos antibióticos utilizados.

Até 1987 não havia relatórios de ESBLs no Brasil. Em 1988 um estudo brasileiro foi realizado pelo Programa de Pesquisa Antimicrobiano em 20 laboratórios clínicos e em 36 hospitais localizados em diversas regiões do país, onde 855 isolados foram analisados, incluindo 591 enterobactérias. Os dois patógenos que ocorreram com maior frequência foram *E.coli* e *K. pneumoniae*. Destas bactérias, 13,6% de *E.coli* e 42,1% de *K. pneumoniae* foram cepas produtoras de ESBL (MOTA et al, 2003). Mais recentemente, no Recife, Brasil, 30% de *Klebsiella pneumoniae* hospitalares isoladas foram positivas para a produção de ESBL (LOPES et al, 2005). Em Ribeirão Preto, em um hospital universitário, 45,19% de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes foram produtoras de ESBL (BELLÍSSIMO-RODRIGUES et al, 2006).

O guia do CLSI (2005) recomenda que os laboratórios de microbiologia relatem os produtores de ESBLs isolados como resistentes para todas as penicilinas, cefalosporinas e aztreonam, de acordo com os resultados de teste *in vitro*. A presença de produtores de ESBLs

identificados incorretamente produz implicações importantes para a terapia com antibióticos e para o controle das infecções (PATERSON, 2006).

Esta recomendação é importante, pois, assim como foi verificado através deste estudo, algumas bactérias se mostraram sensíveis às cefalosporinas utilizadas, porém, quando submetidas à análise do teste de ESBL, elas se apresentavam produtoras destas enzimas. Muitas bactérias podem não expressar o fenótipo de resistência às cefalosporinas *in vitro*, mas, quando os pacientes com infecção por bactérias produtoras de ESBLs são submetidos ao tratamento por estes antimicrobianos, frequentemente ocorre falha no tratamento.

A resistência apresentada pelo antibiótico gentamicina (aminoglicosídeo) foi bastante elevada (44,18%). A gentamicina é muito utilizada na cura de septicemias, meningoencefalites, infecções urinárias, respiratórias, peritonites, infecções biliares e outros processos causados por bacilos Gram negativos e estafilococos (TAVARES, 1996).

A resistência aos antibióticos aminoglicosídeos pode estar associada com um gene (*arm A*) mediado por um plasmídeo conjugativo e que, portanto, tem um grande potencial para transferência horizontal destes genes. O gene está associado com a produção de uma metiltransferase que produz uma metilação pós-transcricional do RNAr culminando em uma menor afinidade pelos aminoglicosídeos, entre eles a gentamicina e a amicacina (LEE et al, 2006).

A frequência de resistência apresentada para amicacina foi menor (11,62%). Mas, poderia ser esperado que os isolados clínicos resistentes à amicacina fossem raros, porque a amicacina foi desenvolvida para bloquear o acesso a uma variedade de enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos em seus sítios específicos. Na Coreia, as taxas de resistência à amicacina em *K. pneumoniae* aumentaram de 8% em 1997 para 13% em 2003. Em 2004, em um hospital coreano, a taxa de *K. pneumoniae* resistente à amicacina foi de 46%, sugerindo uma possível presença de cepas produtoras de metilase do RNAr 16S (LEE et al, 2006).

Das bactérias analisadas neste estudo, 27,9% apresentaram resistência à cefoxitina. A cefoxitina é uma cefalosporina de segunda geração e caracteriza-se por apresentar espectro de ação mais amplo que o das cefalosporinas de primeira geração. É empregada, sobretudo, em pneumonias e septicemias hospitalares causadas por *E.coli* e *Klebsiella spp.*(TAVARES, 1996).

A cefoxitina também tem a propriedade de induzir a produção de β – lactamases por determinados bacilos Gram negativos. Estas β – lactamases induzidas têm origem cromossômica e resultam da liberação de genes existentes nestas bactérias e cujas enzimas se encontram habitualmente reprimidas por um gene repressor. A cefoxitina, algumas cefalosporinas da 3ª geração e o imipeném determinam a desrepressão genética destes microrganismos induzindo o gene

reprimido a produzir β – lactamases que podem ser ativas sobre as cefalosporinas de 2^a e 3^a gerações (TAVARES, 1996).

Devido o seu potencial de indução de resistência e à resistência adquirida por muitos microrganismos, sua indicação passou a ser menos utilizada na terapêutica das infecções. Entretanto, a droga continua a ser uma alternativa para o tratamento da infecção cirúrgica em cirurgias de colo e reto, nas apendicites e nas cirurgias ginecológicas (TAVARES, 1996).

A frequência de resistência à cefoxitina é muito variável em cada região. De 2116 cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes tratados em um hospital na Nova Escócia, Canadá, apenas 25 (1,18%) do total apresentou fenótipo de resistência para cefoxitina (MELANO et al, 2006). A porcentagem de resistência no Canadá é baixa quando comparada com outros países. No Brasil, entre 1997 e 1998, 20% de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de vários hospitais brasileiros foram resistentes à cefoxitina (SADER et al, 2001).

O aumento de resistência às cefalosporinas (cefoxitina) pode estar associado com mecanismos de resistência como a deficiência na produção de porinas e à superexpressão das bombas de efluxo em *Klebsiella pneumoniae* resistentes à cefoxitina (MELANO et al, 2006).

A resistência de *Klebsiella pneumoniae* às cefalosporinas é geralmente associada à produção de plasmídios que carregam genes produtores de β – lactamases de espectro estendido.

Outro mecanismo de resistência envolvendo os β – lactâmicos é a deficiência na regulação de porinas. Duas das maiores proteínas de membrana (OMPs) tem sido descritas em *Klebsiella pneumoniae*: OmpK 35 e OmpK 36. A produção de β – lactamases associadas com a destruição de OMP pode resultar no aumento de resistência às cefalosporinas e a outros β – lactâmicos, incluindo os carbapenens (MELANO et al, 2006). Na Índia, a resistência a todas as cefalosporinas aumentou consideravelmente entre o período de 2001 a 2004 e as taxas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL aumentaram de 5,3% para 61% entre 1997 e 2004 (GROVER et al, 2006).

A ceftriaxona e a ceftazidima são cefalosporinas de terceira geração e apresentaram frequência de resistência de 27,9% e 11,62% respectivamente. As cefalosporinas de 3^a geração foram originalmente desenvolvidas como β – lactâmicos capazes de acabar com as resistências causadas pelas β – lactamases comuns. Sua potência antimicrobiana é maior que a das gerações anteriores se caracterizando por agirem em baixas concentrações inibitórias mínimas. Quando foram introduzidos, os agentes da 3^a geração como ceftriaxona e ceftazidima, apresentaram-se estáveis na presença de β – lactamases comuns. Entretanto, em poucos anos, os bacilos Gram negativos adquiridos em hospitais, como *Klebsiella pneumoniae* e outras, começaram a produzir

versões mutantes destas β – lactamases que se mostraram resistentes às cefalosporinas de 3ª geração (TAVARES, 1996).

De acordo com o *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS), em 2003 20,6% de todas as *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes de unidades de cuidado intensivo nos EUA, foram resistentes às cefalosporinas de 3ª geração. Isto representou um aumento de 47% comparado às taxas de resistência de 1998 a 2002. Estudos internacionais relatam frequências maiores de *Klebsiella pneumoniae* resistentes nos hospitais (PATERSON, 2006).

Uma das causas do aumento da frequência de resistência às cefalosporinas de 3ª geração está associada com o uso indiscriminado destes antibióticos na cura das infecções.

A resistência contra o cefepime, uma cefalosporina de quarta geração, foi de 6,97%. Conjuntamente com ciprofloxacina e cloranfenicol, foi o que apresentou os melhores níveis para o controle das bactérias analisadas. O cefepime tem mostrado índices de cura em torno de 95% no tratamento de pacientes hospitalizados com infecções respiratórias, urinárias, ginecológicas e cutâneas (TAVARES, 1996).

O cefepime é resistente a muitas β - lactamases. De 23 *K.pneumoniae* isoladas de pacientes internados na Índia, somente 6,2% foram resistentes ao cefepime (GUPTA et al, 2006), taxa bem próxima à encontrada na presente pesquisa. Vários estudos revelam que a presença de ESBL por espécies de *Klebsiella pneumoniae* afetam negativamente o tratamento por cefepime (KOTAPATI et al, 2005). A estratégia que vem sendo adotada para combater a resistência de bactérias produtoras de ESBL é o uso de um β -lactâmico de amplo espectro em conjunto com um inibidor de β -lactamase, por exemplo, o ácido clavulânico, que inibe a função desta enzima (GUPTA et al, 2006).

As taxas de resistência ao cefepime entre os produtores de ESBL são muito variáveis ao redor do mundo: 5,6% no Canadá a 50,4% na América Latina (GROVER et al, 2006).

A resistência encontrada para o imipeném foi de 13,95%. O imipeném é um carbapeném de amplo espectro e ele inibe a síntese da parede celular das bactérias provocando lise osmótica, sendo resistente à degradação por quase todas as β -lactamases, tanto as de origem cromossômica como as de origem plasmidial. Ele é utilizado em pacientes com infecções respiratórias, urinárias, ginecológicas, osteo-articulares e intra-abdominais (TAVARES, 1996).

As frequências de resistência ao imipeném são variáveis, mas, grande parte dos estudos indica que o imipeném é uma droga eficiente no combate às bactérias resistentes. De 23 *Klebsiella pneumoniae* isoladas de hospitais na Índia, somente 0,4% apresentaram resistência contra o imipenem (GUPTA et al, 2006).

Baixas frequências de resistência também foram verificadas contra o ciprofloxacina (6,97%). A resistência às quinolonas geralmente resulta de mutações em genes cromossômicos. Considerando que as mutações que afetam a atividade da DNA girase são pouco frequentes, a resistência dos microrganismos a estas drogas são pouco frequentes na clínica. Entretanto, a resistência pode ser adquirida pelas alterações na permeabilidade das membranas dos microrganismos (TAVARES, 1996).

Menores frequências de resistência também foram encontradas contra o cloranfenicol (6,97%). O cloranfenicol é um derivado do propanodiol, que pode ser sintetizado em laboratório com relativa facilidade o que torna baixo o seu custo. Por isso, ele se tornou um dos antibióticos mais utilizados na clínica diária. Porém, como apresenta efeitos colaterais mais graves e com o surgimento de outros grupos de drogas com a mesma atividade ou superior, a sua utilização vem sendo reduzida (DINIZ-SANTOS et al, 2006). Esta pode ser uma explicação para as menores frequências de resistência verificadas contra o cloranfenicol.

A resistência contra os inibidores da via metabólica dos folatos, o sulfametoxazol-trimetoprim foi razoavelmente elevada (25,58%). Um dos motivos de resistência contra estes medicamentos em *Klebsiella pneumoniae* pode ser relacionado com a mutação na produção de dihidrolato-redutase (uma enzima que é afetada pela ação dos antibióticos) sendo que estas perdem a afinidade pela trimetoprima. Outra forma de resistência adquirida contra esta classe de antimicrobianos inclui a síntese de vias metabólicas alternativas, geralmente pela produção adicional da enzima que seria inativada por tais medicamentos. A resistência às sulfonamidas e à trimetoprima pode ser encontrada em até 25% dos microrganismos isolados de material clínico (TAVARES, 1996), frequência próxima à encontrada na presente pesquisa.

No Brasil, microrganismos resistentes foram isolados de hemocultura de neonatos de uma unidade de tratamento intensivo neonatal, do Hospital Maternidade Alexander Fleming II, no Rio de Janeiro, no período de julho de 1997 a julho de 1999. Um total de 301 microrganismos foram isolados com a predominância de *K. pneumoniae* (22,9%). As *K. pneumoniae* foram altamente susceptíveis à cefoxitina, ao imipeném e ao ciprofloxacina e tiveram susceptibilidade intermediária à tetraciclina e 60,9% das mesmas foram produtoras de ESBL (LOUREIRO et al, 2002).

O SENTRY (Programa Mundial e Longitudinal de Vigilância de Resistência a Antimicrobianos) avaliou as taxas de sensibilidade a antibióticos em bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros. Foram analisadas 525 amostras bacterianas de 11 hospitais brasileiros e os isolados foram submetidos à metodologia da microdiluição em caldo. As cinco espécies mais frequentes foram: *Pseudomonas*

aeruginosa (30,1%), *Staphylococcus aureus* (19,6%), *Acinetobacter spp.* (13%), *Klebsiella spp.* (9,5%) e *Enterobacter spp.* (8,4%). Das *Klebsiella pneumoniae*, 36% indicaram produção de ESBL e os antimicrobianos mais ativos contra elas foram: carbapenens (100% de sensibilidade) e quinolonas (92% de sensibilidade) (SADER et al, 2001).

Os dados de Loureiro (2002) e do SENTRY, em parte, confirmam os resultados da presente pesquisa, em que 86,05% das *K. pneumoniae* isoladas foram susceptíveis ao imipeném e 93,03% foram susceptíveis ao ciprofloxacina. Frequências de resistência intermediária também foram encontradas para tetraciclina (20,93%) e 46,51% do total foram produtoras de ESBLs.

No esgoto hospitalar, uma grande taxa de resistência também foi encontrada para a tetraciclina (25,58%). As tetraciclinas são antibióticos de largo-espectro e são ativas contra um grande número de bactérias Gram negativas e Gram positivas. Elas inibem a síntese de proteínas pelo impedimento da ligação das moléculas aminoacil-RNAt na subunidade ribossomal 30S. Os dois mecanismos mais difundidos da distribuição de resistência à tetraciclina são os efluxos ativos e a proteção do ribossomo. A resistência à tetraciclina é geralmente codificada por plasmídios ou por transposons, os quais são conjugativos, embora alguns genes de resistência também tenham sido encontrados em cromossomos. Vários genes codificam uma proteína externa responsável pelo efluxo de tetraciclina em bactérias Gram negativas, denominados de Tet (GUILLAUME et al, 2000).

Guillaume et al (2000) analisaram a distribuição dos genes de resistência à tetraciclina (Tet A a E) em *Salmonella hadar* isolados de fezes de pacientes na Bélgica e da comunidade microbiana de lodo ativado de esgoto hospitalar e doméstico. Uma alta porcentagem de isolados resistentes à tetraciclina foram isolados do processo de tratamento de lodo ativado de esgoto hospitalar. O gene Tet A e C foram predominantemente detectados, tanto dos isolados clínicos quanto das amostras ambientais, apresentando uma forte correlação positiva entre a genotipagem dos isolados clínicos e da microflora do lodo ativado (GUILLAUME et al, 2000).

A comparação da genotipagem entre os isolados clínicos e aqueles obtidos da amostra de lodo de esgoto hospitalar revela que o mesmo perfil de resistência bacteriana pode ser encontrado na amostra ambiental e nas amostras clínicas, indicando que ambientes que provocam uma maior seleção de microrganismos resistentes, tais como os hospitais, têm maior potencial para disseminar microrganismos resistentes no ambiente, principalmente através das águas residuárias.

A eliminação destas bactérias resistentes no meio ambiente também foi analisada através da distribuição das *Klebsiella pneumoniae* resistentes de acordo com as etapas do processo de tratamento de esgoto hospitalar.

A distribuição de bactérias resistentes e com resistência intermediária encontradas nos respectivos pontos de coleta analisados está apresentada na Tabela 19.

De acordo com os resultados apresentados, o sistema de tratamento em questão não eliminou as bactérias resistentes do meio ambiente. As maiores frequências de resistência encontrada nas bactérias do efluente final foram para os antibióticos: gentamicina (50%), seguidos pela ceftazidima, amicacina e tetraciclina, estes apresentando frequências de 33,33%. Também foi observado que 33,33% das bactérias do efluente final foram produtoras de ESBL. Gentamicina, tetraciclina e amicacina possuem genes de resistência mediados por plasmídios conjugativos, o que deve conferir maior potencial de disseminação dos genes de resistência entre as espécies, principalmente no esgoto, pois a concentração e o contato dos microrganismos são maiores.

O maior problema do lançamento de bactérias resistentes a antibióticos em corpos receptores é a possibilidade da disseminação de genes de resistência para outras espécies. Também foi demonstrado que muitas bactérias resistentes a antibióticos ficam acumuladas no lodo dos processos de tratamento de esgoto e isto pode acarretar problemas futuros dependendo da manipulação e da disposição final deste resíduo.

Apesar de terem sido observadas algumas diferenças nas frequências de resistência aos antimicrobianos encontrados nos isolados dos pontos de coleta correspondentes ao afluente e o efluente final tratado, tais diferenças podem ser atribuídas ao menor número de isolados analisados no ponto de coleta correspondente à saída final do sistema. Além disso, há indício de que o perfil de resistência bacteriana não se altera no decorrer das etapas do processo de tratamento de esgoto (REINTHALER et al, 2003).

Entretanto, mais estudos investigativos são sugeridos para corroborar esta hipótese, pois, é discutida a questão de que o esgoto hospitalar seria um ambiente que exerce uma grande pressão seletiva, contribuindo para a disseminação de bactérias resistentes. Esta característica não seria atribuída somente devido ao maior contato e à concentração destas bactérias presentes neste tipo de efluente, mas, também, porque os efluentes hospitalares podem conter uma alta concentração de antibióticos, proporcionando uma maior seleção. Ainda não são bem conhecidas as interações entre os medicamentos e as bactérias presentes em águas residuárias e nem as taxas de transferência genética entre as espécies nestes ambientes, embora se acredita que isto ocorra com frequência.

Tabela 19. Frequência (%) de *Klebsiella pneumoniae* resistentes e intermediárias aos antibióticos utilizados distribuída por pontos de coleta

Antibióticos	Entrada (n = 15)	Lodo (n = 6)	UASB (n = 16)	Saída (n = 6)
CRO	40% (n=6)	16,66% (n=1)	25% (n=4)	16,66% (n=1)
CAZ	13,33% (n=2)	0% (n=0)	6,25% (n=1)	33,33% (n=2)
FEP	6,66% (n=1)	0% (n=0)	6,25% (n=1)	16,66% (n=1)
IMP	0% (n=0)	33,33% (n=2)	25% (n=4)	0% (n=0)
CN	33,33% (n=5)	66,66% (n=4)	43,75% (n=7)	50% (n=3)
AK	20% (n=3)	0% (n=0)	0% (n=0)	33,33% (n=2)
CIP	6,66% (n=1)	0% (n=0)	6,25% (n=1)	16,66% (n=1)
SXT	20% (n=3)	16,66% (n=1)	37,5% (n=6)	16,66% (n=1)
CLO	6,66% (n=1)	0% (n=0)	6,25% (n=1)	16,66% (n=1)
TET	33,33% (n=5)	16,66% (n=1)	18,75% (n=3)	33,33% (n=2)
FOX	13,33% (n=2)	33,33% (n=2)	43,75% (n=7)	16,66% (n=1)
ESBL +	53,33% (n=8)	50% (n=3)	43,75% (n=7)	33,33% (n=2)

CRO: Ceftriaxona; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepima; IMP: Imipenem; CN: Gentamicina; AK: Amicacina; CIP: Ciprofloxacina; SXT: Sulfametoxazol – Trimetoprim; CLO: Cloranfenicol; TET: Tetraciclina; FOX: Cefoxitina; ESBL: β – Lactamases de Espectro Estendido; MR: Bactérias Multi-resistentes (foram consideradas as bactérias com resistência a dois ou mais antibióticos).

Reinthal et al (2003) também analisaram as frequências de bactérias resistentes aos antibióticos em três sistemas de tratamento de esgoto por processo de lodo ativado na Áustria. Um dos sistemas recebia os esgotos de um hospital e de um posto de saúde. Foi concluído que as maiores taxas de bactérias resistentes aos antibióticos foram encontradas no sistema que recebia esgoto hospitalar. Nos três sistemas analisados, cefepime, cefotaxima e ceftazidima foram 100% efetivas contra as *E.coli* isoladas. Somente no sistema de tratamento de esgoto hospitalar encontrou-se *E.coli* resistentes ao ciprofloxacina (2%). As maiores taxas de resistência contra o cloranfenicol foram de 8%, encontradas no esgoto hospitalar e 24% das bactérias foram resistentes contra a tetraciclina, sendo 57% das bactérias resistentes a este medicamento, encontradas no lodo de esgoto hospitalar. As resistências médias contra o antibiótico sulfametoxazol-trimetoprim foram de 13% (REINTHALER et al, 2003).

Sugerem-se mais estudos acerca deste tema, principalmente para mais obtenção de dados sobre as frequências de resistência bacteriana em efluentes de esgotos hospitalares e as diferenças

de resistência durante as etapas dos processos de tratamento destes efluentes; a viabilidade destes microrganismos no ambiente após serem lançados no corpo receptor e um estudo comparando as taxas de resistência a antibióticos entre esgotos hospitalares e esgotos domésticos para verificar se há uma real diferença entre a proporção destes microrganismos presentes nestes ambientes. O estudo da genotipagem de tais microrganismos também seria interessante para comparar os perfis genéticos de resistência entre cepas provenientes de diversas fontes e, através de dados epidemiológicos, estabelecer a origem de um surto infeccioso.

Através dos resultados da pesquisa foi possível observar que o antimicrobiano menos efetivo no combate às infecções por *Klebsiella pneumoniae* isoladas da ETE do estabelecimento hospitalar estudado tem sido a gentamicina, proporcionando frequências de resistência elevadas. O antibiótico que se mostrou mais efetivo foi o cefepime, uma cefalosporina de quarta geração e cujas bactérias apresentaram uma taxa de susceptibilidade de 93,03%. Taxas de susceptibilidade de 93.03% também foram observadas para o cloranfenicol e ciprofloxacina.

A resistência a antibióticos aminoglicosídeos, como a gentamicina, está frequentemente associada com genes mediados por plasmídeos, que conferem maiores chances de disseminação dos genes resistentes entre as espécies, sobretudo através do processo de conjugação. Este mecanismo de transferência genética é particularmente importante nos efluentes hospitalares, pois, nestes ambientes, a possibilidade de trocas genéticas aumenta devido à maior concentração e contato destes microrganismos. Apesar de não ter sido o objetivo da pesquisa detectar antibióticos no ambiente estudado, dados da literatura indicam que os efluentes hospitalares possuem uma alta concentração destes medicamentos, o que também pode contribuir no processo de seleção.

A alta prevalência de bactérias produtoras de ESBLs confirmam os dados da literatura sobre a emergência do problema de bactérias resistentes à maioria dos antimicrobianos usados atualmente na clínica médica, tanto no ambiente intra-hospitalar, quanto em bactérias presentes em amostras ambientais.

4.4 – Resultados de Vírus da Hepatite A

Além da referida presença de bactérias resistentes a antibióticos, os efluentes hospitalares também contêm outros tipos de microrganismos patogênicos e parte da literatura

especializada sobre o tema considera que o monitoramento de vírus é particularmente importante em tais ambientes.

Combinando informações do monitoramento de vírus em determinados ambientes com os dados epidemiológicos da doença em certas localidades, a detecção de um surto se torna mais eficiente.

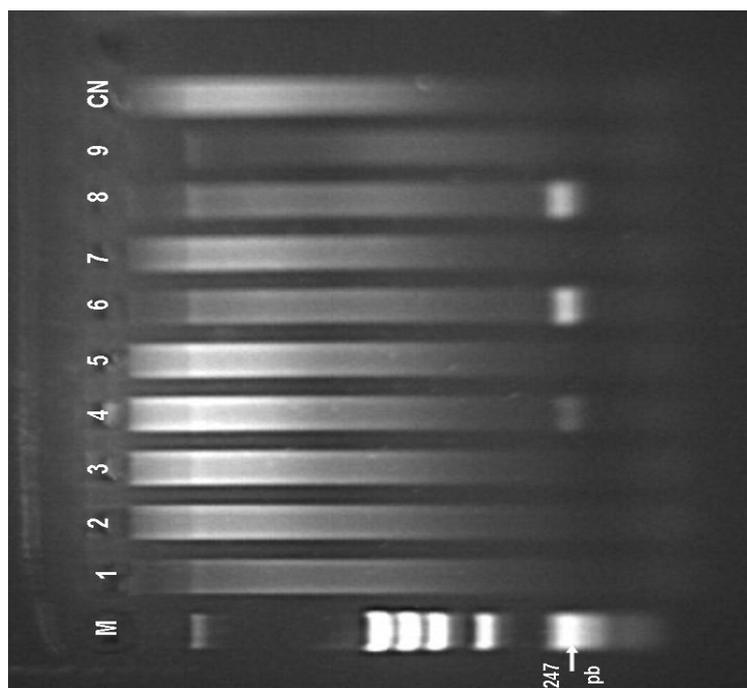
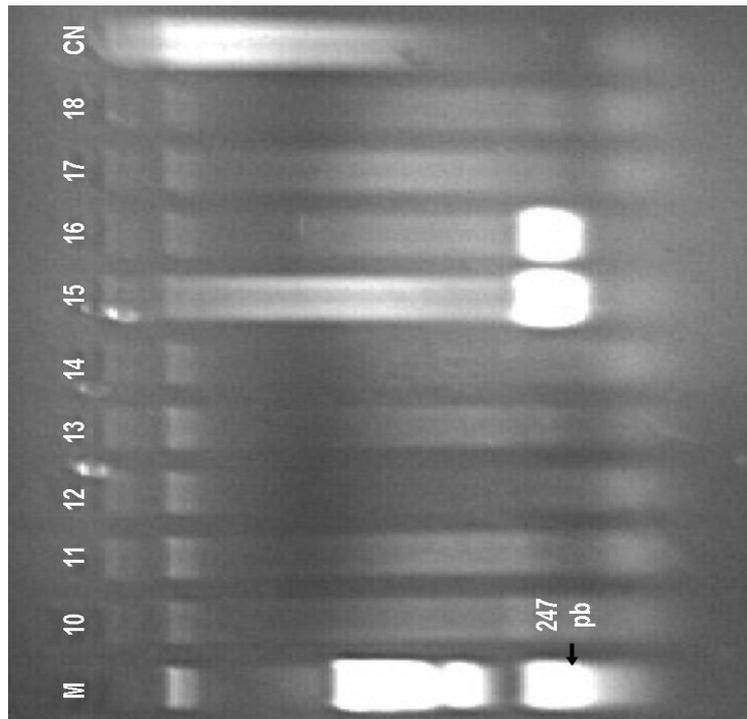
Os vírus são agentes causadores de doenças e sua concentração nos corpos receptores indica um grau crítico de poluição viral das águas e dos perfis epidemiológicos de uma comunidade.

Ainda que a incidência da doença causada pelo vírus da hepatite A venha decrescendo no Brasil, surtos da doença continuam a ocorrer, principalmente nas regiões com níveis socioeconômicos mais baixos e com condições de saneamento precárias. Daí a relevância de monitorar estes agentes, sobretudo, nos seus vários locais de incidência, a fim de prevenir os riscos associados aos surtos epidemiológicos da doença.

A detecção de HAV em amostras ambientais tem sido recentemente realizada através de métodos de biologia molecular, tais como RT-PCR e *real-time* PCR. Estes métodos são altamente sensíveis e permitem detectar os vírus, mesmo estando em baixas concentrações nos ambientes. Algumas metodologias para concentrar estes vírus de amostras ambientais têm sido pesquisadas e comparadas a fim de se estabelecer protocolos específicos e melhorar a acuidade analítica de tais métodos.

A técnica utilizada no presente trabalho para concentrar o HAV foi descrita previamente por Katayama et al (2002) para concentrar HAV e vírus entéricos de amostras de águas marinhas. Como não havia um protocolo específico para concentrar o HAV do lodo de esgoto analisado utilizando a mesma metodologia, foi necessário incluir as diluições destas amostras para que as mesmas pudessem passar pela etapa de concentração dos vírus.

A seguir serão apresentados os resultados correspondentes à análise dos HAV detectados durante as respectivas etapas do processo de tratamento de esgoto hospitalar. As bandas correspondentes ao peso molecular de 247 pb podem ser visualizadas através do gel de eletroforese e as amostras positivas contêm as bandas com este peso molecular (Figura 17).



1 – Entrada 04/10/05; **2** – UASB 04/10/05; **3** – Saída 04/10/05; **4** – Entrada 22/05/06; **5** – Lodo 22/05/06; **6** – UASB 22/05/06; **7** – Saída 22/05/06; **8** – Entrada 05/06/06; **9** – Lodo 05/06/06; **10** – UASB 05/06/06; **11** – Saída 05/06/06; **12** – Entrada 08/05/06; **13** – Lodo 08/05/06; **14** – UASB 08/05/06; **15** – Entrada 14/08/06; **16** – Lodo 14/08/06; **17** – UASB 14/08/06; **18** – Saída 14/08/06; **M**: Marcador Molecular; **CN**: Controle Negativo

Figura 17. Resultados do *Nested* RT-PCR

Tabela 20. Detecção de RNA de HAV através de *Nested* RT-PCR por pontos de coleta da ETE

Datas das coletas	Entrada	Lodo	UASB	Saída
04/10/05	-	NA	-	-
08/05/06	-	-	-	NA
22/05/06	+	-	+	-
05/06/06	+	-	-	-
14/08/06	+	+	-	-
	n+/ n testado (f%)			
	3/5 (60%)	1/4 (25%)	1/5 (20%)	0/4 (0%)

NA: Não avaliado

De acordo com os resultados, 60% das amostras analisadas no afluente hospitalar foram positivas para a detecção de HAV. Uma amostra positiva foi encontrada no lodo de esgoto (25%) e uma amostra positiva foi detectada ao ponto de coleta correspondente à saída do reator UASB (20%). Nenhum RNA de HAV foi detectado nas amostras do efluente final.

Os resultados indicam que os vírus de hepatite A não são completamente eliminados pelo processo de tratamento por reator UASB, e que eles também se concentram no lodo proveniente do processo. O sistema de tratamento constituído pelos filtros anaeróbios parece ser eficiente na remoção de vírus da hepatite A, pois, em todas as coletas em que o RNA de HAV foi detectado no afluente, no lodo ou na saída do reator UASB, a presença dos vírus não foi verificada no efluente final.

Entretanto, nas coletas de amostras correspondentes aos dias 04/10/05 e 22/05/06, a ETE apresentou problemas operacionais e, embora tenha sido detectado RNA de HAV na amostra do dia 22/05/06 no afluente e no efluente do reator UASB, a ausência do vírus no efluente tratado pode ter sofrido a influência do estado de operação do sistema. Ainda que em duas coletas com a ETE funcionando normalmente tenham sido detectados HAV no afluente e no lodo, são recomendados mais estudos que corroborem a eficiência dos filtros anaeróbios na remoção de tais microrganismos.

Embora não seja possível afirmar quantas partículas de vírus ficaram retidas no lodo e qual a eficiência, em termos percentuais, do potencial do reator UASB para reduzir a carga viral, há um indício de que os vírus ficam retidos no lodo de esgoto e que também podem se concentrar

neste resíduo. Nas coletas em que o RNA de vírus não foi detectado no lodo, uma explicação plausível pode ser baseada nas quantidades de lodo que foram utilizadas para concentrar os vírus.

A amostra positiva de HAV detectada no lodo correspondeu à massa de lodo de 7,5 mg presentes em 10 ml de lodo diluídos em 1990 ml de água destilada, indicando que foi uma quantidade mais efetiva para a detecção de HAV.

Quando 2L de lodo (provavelmente a massa de lodo correspondente seria maior do que 3100 mg) e 3100 mg de lodo presentes em 200 mL de lodo diluídos em 1800 mL de água destilada foram filtrados através do sistema de bomba a vácuo, os filtros com poros de 0,45 µm de diâmetro ficaram saturados e a pressão do sistema não foi suficiente para filtrar as amostras.

Quantidades menores (3,7 mg de lodo presentes em 1 ml de lodo diluído em 1999 mL de água destilada) podem ser insuficientes para detectar o HAV deste tipo de amostra. Portanto, 7,5 mg de lodo parece ser uma concentração suficiente para detectar o vírus da hepatite A em amostras de lodo de esgoto através do método de concentração utilizado.

O problema relacionado à presença de microrganismos patogênicos presentes no lodo de esgoto envolve os riscos associados à manipulação ou ao seu descarte inadequado, implicando em sérios problemas de saúde pública e a futuros impactos ambientais, principalmente porque os vírus são muito resistentes às condições desfavoráveis do meio.

Além dos altos níveis de resistência dos vírus em ambientes específicos, devem-se levar em consideração as concentrações destes agentes e a dose infecciosa necessária para causar uma doença.

De acordo com o relatório da OMS (Organização Mundial da Saúde – 1979 *apud* BLOCK e SCHWARTZBROD, 1989), muitas infecções humanas podem ser provocadas por uma unidade viral, diferentemente da dose infecciosa bacteriana mínima, que geralmente é superior a 10^6 bactérias.

Desta forma, ainda que pequenas concentrações de vírus sejam encontradas nas águas, é importante que se faça um monitoramento detalhado das possíveis rotas de contaminação e de transmissão destes agentes patogênicos, tendo em vista que doses muito pequenas são capazes de provocar uma infecção.

Os resultados também mostram que a metodologia de adsorção-eluição previamente utilizada por Katayama (2002) para concentrar vírus entéricos e HAV de águas marinhas, seguido pela detecção através de *Nested* RT-PCR, pode ser usada para identificar o HAV em amostras de esgoto e lodo de esgoto e avaliar o potencial de sistemas de tratamento de esgoto na remoção de vírus RNA, mais especificamente vírus da hepatite A. A adequação deste método

para identificar HAV em amostras ambientais também têm sido descritas por outros pesquisadores, como Villar et al (2006).

Villar et al (2006) compararam o método de Katayama (2002) com outro método de concentração descrito por Jothikumar et al (1993), ambos empregando membranas carregadas negativamente para a adsorção e a eluição das partículas virais, para monitorar a contaminação de HAV em amostras de água de torneira, água de rio, água mineral e em águas costeiras. RT-PCR (qualitativo) e Real-Time PCR (quantitativo) foram usados para detectar e quantificar RNA de HAV nas amostras de água concentrada.

O método descrito por Katayama (2002) foi mais adequado para concentrar o HAV de água mineral. O HAV inoculado experimentalmente foi detectado nas amostras de água de rio por ambos os métodos e na água costeira por nenhum método, possivelmente porque esta amostra deve conter inibidores da reação de PCR. Usando ambos os métodos de concentração, foi possível detectar HAV com o PCR qualitativo em amostras de água, apresentando uma sensibilidade para detectar até 2310 genomas/ mL (VILLAR et al, 2006).

Embora Villar et al (2006) não tenham detectado HAV nas amostras de águas costeiras, possivelmente devido à presença de inibidores para a reação de PCR, o mesmo resultado não foi apresentado pela presente pesquisa, onde o HAV pôde ser detectado de uma amostra com grandes concentrações de matéria orgânica, inorgânica e íons presentes. Porém, não se podem afirmar com segurança quantas partículas virais poderiam estar presentes nas amostras de esgoto e lodo de esgoto analisada. Outros métodos quantitativos, como o real-time PCR, apresenta maior sensibilidade e é capaz de detectar poucos genomas presentes em uma amostra.

Rose et al (2006) analisaram as concentrações de vírus da hepatite A e enterovírus dos canais de Veneza, na Itália e próximo à praia de Lido através de Real-Time RT-PCR. Dos canais de Veneza, 78% das amostras foram positivas para HAV e enterovírus, com níveis alcançando de 75 a 730 e 3 a 1614 cópias de genoma/ L, respectivamente.

Na praia de Lido nenhum HAV foi detectado, mas os enterovírus foram detectados em todas as amostras da praia de Lido, em níveis alcançando de 2 a 71 genomas/ L. Além disso, houve uma correlação estatisticamente significativa entre a densidade de coliformes termotolerantes e os níveis de HAV ($p = 0,0002$), e a correlação entre coliformes termotolerantes e níveis de enterovírus não foi significativa ($p > 0,05$) (ROSE et al, 2006).

Ainda que a correlação entre as concentrações de coliformes e de vírus da hepatite A presentes em águas tenha sido positiva pelos estudos de Rose et al (2006), mais investigações são sugeridas para comprovar estes resultados e conferir ao HAV o potencial como indicador viral da contaminação microbiológica destes tipos de amostras.

Quanto ao método de extração de RNA, o kit utilizado na presente pesquisa parece ser um dos mais adequados para extrair RNA de HAV de amostras de esgoto e lodo de esgoto.

Burgener et al (2003) compararam diferentes métodos de extração de RNA viral de amostras concentradas com volume de 1 a 2 mL (BURGENER et al, 2003). O kit QIAmp Viral RNA Mini Kit foi comparado a outros três métodos de extração de RNA viral. Os kits QIAmp e Nuclisens mostraram-se os mais sensíveis para a extração de RNA em amostras de água (BURGENER et al, 2003). Entretanto, foi observado que em amostras com turbidez mais elevada o passo envolvendo a concentração através do kit *Centricon* YM – 100 poderia ficar comprometida. O método do *Centricon* QIAmp poderia ser usado somente para a extração do RNA viral em amostras mais puras, como de água potável ou de rio (BURGENER et al, 2003).

Já o kit Centriprep YM – 50 utilizado na presente pesquisa foi adequado para concentrar os vírus, mesmo considerando que as amostras de esgoto e lodo de esgoto possuem alta turbidez.

Embora o método de concentração e de extração de RNA tenham sido eficazes para a detecção de HAV em amostras de esgoto e lodo de esgoto, alguns possíveis inibidores da amostra para a reação de PCR podem não ter sido completamente removidos e puderam ser percebidos através do gel de eletroforese pela presença de manchas brancas no perfil de bandas.

Mas, isto não comprometeu a análise e a identificação dos HAV, podendo-se considerar as metodologias de adsorção-eluição, concentração e *Nested* RT-PCR adequada para detectar vírus da hepatite A em amostras de esgoto e lodo de esgoto.

5 - CONCLUSÃO

Através dos resultados da pesquisa foi possível concluir que as concentrações de coliformes totais e termotolerantes encontrados no afluente hospitalar não diferiram das concentrações comumente presentes em esgotos domésticos, indicando que substâncias com potencial genotóxico não tiveram maior efeito na redução do número destes microrganismos antes de passarem pelo processo de tratamento.

As concentrações elevadas de coliformes presentes no lodo de esgoto confirmam a hipótese de que os microrganismos permanecem fortemente aderidos na massa residual sólida. O reator UASB não foi eficiente na remoção de coliformes totais, mas, reduziu 1 unidade logarítmica de coliformes termotolerantes. Entretanto, esta eficiência de remoção foi inferior às características de desempenho típicas deste sistema.

Os filtros anaeróbios foram capazes de reduzir em média 2 unidades logarítmicas com relação à população de coliformes inicial e a eficiência global média do sistema na remoção de coliformes totais foi de 98,78% e de coliformes termotolerantes de 98,25%. O número de coliformes do efluente final foi elevado, da ordem de 10^6 NMP/ 100 mL, e estas concentrações estão acima dos padrões de coliformes permitidos para um corpo receptor de classe II, de acordo com a Resolução CONAMA 357/2005.

Apesar do sistema não ter removido estes microrganismos como desejado, a ETE foi eficiente na remoção dos parâmetros físico-químicos, embora a concentração de carga orgânica lançada no sistema tenha sido reduzida em relação às concentrações propostas nos cálculos do projeto da estação.

Embora altas concentrações de coliformes tenham sido encontradas no efluente tratado, os resultados estão de acordo com outros dados da literatura sobre eficiência de sistemas anaeróbios na remoção de tais microrganismos.

Com relação à adequação dos meios de cultura utilizados para detectar e isolar os microrganismos de interesse, tais como *Pseudomonas aeruginosa* e outras espécies de coliformes como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp.* e *E.coli*, foi concluído que o meio de cultura de Tergitol – 7 não se mostrou adequado para quantificar os coliformes presentes nas amostras de esgoto e lodo de esgoto. Entretanto, seu uso é interessante para realizar uma triagem inicial dos coliformes presuntivos contidos nestas amostras.

O meio de EMB foi adequado para isolar espécies de *E.coli*, *Klebsiella sp.* e *Enterobacter sp.*, embora, em muitas análises, tenham crescido bactérias de outras famílias com morfologia semelhantes àquelas das enterobactérias. Poucas espécies de *Pseudomonas aeruginosa* foram identificadas através do meio de GSP, possivelmente devido à menor concentração deste grupo bacteriano em relação às outras espécies presentes neste ambiente

estudado ou devido à inibição de crescimento no meio de cultura por outras espécies bacterianas.

Os resultados mostram que o esgoto hospitalar é uma amostra bastante complexa e apresenta uma diversidade muito grande de microrganismos, o que faz com que mesmo os meios de cultura consagrados para detectar e isolar microrganismos específicos em amostras de água percam sua seletividade e especificidade quando aplicados para a detecção em amostras de esgoto e lodo de esgoto.

A diluição de 10^{-1} das amostras de esgoto e lodo de esgoto foi a mais eficiente para promover o isolamento e a seleção das bactérias presentes nos meios de cultura e em todos os pontos de coleta foram identificadas bactérias de vários gêneros, mas as espécies predominantemente isoladas foram as enterobactérias. Bactérias de outros gêneros como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Shingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Aeromonas* entre outras, puderam ser isoladas através dos meios de cultura utilizados, demonstrando que elas também estão presentes nos efluentes hospitalares.

Espécies de *Aeromonas sp.*, bactérias Gram positivas e *Pseudomonas aeruginosa* foram encontradas no efluente tratado juntamente com outros coliformes, indicando que elas também são resistentes ao processo de tratamento utilizado.

Nos efluentes hospitalares analisados, altas frequências de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos antibióticos foram detectadas. O antibiótico menos efetivo no controle das *Klebsiella pneumoniae* isoladas foi a gentamicina (44,18% de resistência), seguida pelas cefalosporinas de segunda e terceira gerações (cefoxitina e ceftriaxona, com 27,9% de resistência), sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina (25,58% de resistência), imipeném (13,95%) e ceftazidima e amicacina (11,62%). Os antibióticos mais efetivos foram cefepime, ciprofloxacina e cloranfenicol, com taxas de susceptibilidade bacteriana de 93,03%.

As altas frequências de resistência antimicrobiana verificada contra as cefalosporinas estão muito associadas com a emergência da difusão de bactérias que produzem β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), aos quais lhes conferem altas taxas de resistência contra a maioria dos antibióticos β -lactâmicos, entre eles as penicilinas e cefalosporinas. Estes resultados são confirmados pelos altos índices de bactérias produtoras destas enzimas: 46,51% das bactérias isoladas foram produtoras de ESBLs e muitas das quais apresentaram resistência contra as cefalosporinas.

De todas as bactérias analisadas, 32,5% apresentaram multirresistência contra dois ou mais antibióticos simultaneamente.

O sistema de tratamento de esgoto também não foi capaz de eliminar as bactérias resistentes e no efluente final tratado 50% das bactérias isoladas foram resistentes contra

gentamicina, 33,33% resistentes contra ceftazidima, amicacina, tetraciclina e produtoras de ESBLs.

Também foi possível verificar que muitas *Klebsiella pneumoniae* detectadas no lodo de esgoto apresentaram resistência antimicrobiana. Das bactérias analisadas, 66,66% apresentaram resistência contra a gentamicina, 33,33% apresentaram resistência contra o imipeném e à cefoxitina, 16,66% foram resistentes contra ceftriaxona, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina e 50% apresentaram produção de ESBLs.

Os resultados da presente pesquisa corroboram a emergência do problema da difusão de bactérias resistentes a antibióticos, não só no ambiente hospitalar, mas também que as mesmas estão presentes em altas proporções em ambientes específicos, tais como em efluentes hospitalares.

Quanto ao HAV, este pôde ser detectado das amostras de lodo na quantidade de massa de 7,5 mg (comparada com as concentrações de sólidos totais da amostra), indicando que esta seja uma quantidade suficiente para detectar os vírus deste tipo de amostra e foi concluído que a técnica referida é adequada para a concentração de HAV em amostras de lodo.

Também foi possível concluir que, dos HAV detectados nas etapas do processo de tratamento de esgoto, 60% estavam presentes no afluente, 25% no lodo e 20% no efluente do reator UASB. Nenhum RNA de HAV foi detectado no efluente final tratado, indicando que os filtros anaeróbios podem ser eficientes na remoção de vírus da hepatite A. Entretanto, é importante esclarecer que em duas coletas de amostras, a ETE apresentou falhas mecânicas e isto pode ter contribuído para que nenhum HAV fosse detectado nos efluentes finais nas respectivas coletas referidas.

A detecção de HAV nos efluentes do reator UASB indica que este processo de tratamento não é capaz de eliminar os vírus e que parte destes microrganismos se concentra no lodo formado dentro do reator.

Através dos resultados obtidos foi possível concluir que as metodologias de concentração e de biologia molecular por *Nested* RT-PCR empregadas foram adequadas para detectar HAV de amostras de esgoto e lodo de esgoto.

O estudo também indica que o controle da contaminação ambiental é importante para minorar os problemas que podem afetar a saúde pública, caso os microrganismos patogênicos ou as substâncias altamente tóxicas não sejam eliminadas do nosso meio.

Desta forma, esta pesquisa contribuiu para difundir os conhecimentos acerca de sistemas de tratamento de esgoto que possam reduzir ou eliminar estes agentes patogênicos do meio ambiente, além de verificar que os efluentes hospitalares são fontes importantes de

contaminação microbiológica dos corpos hídricos. O estudo ganha relevância, sobretudo, para regiões com condições de saneamento precárias, cujos esgotos, independentemente dos locais de origem, são lançados *in natura* nos corpos receptores, condição frequentemente verificada no Brasil.

Embora tenha sido dado um enfoque para a questão da poluição microbiológica, não se desconsidera o potencial do referido sistema estudado na remoção de carga orgânica e, mesmo não alcançando uma eficiência desejada na remoção de coliformes, ele foi capaz de reduzir 2 unidades logarítmicas em relação à concentração destes microrganismos do afluente. Além disso, há um indício de que o referido sistema seja eficiente na remoção de vírus da hepatite A.

Em virtude das condições de saneamento básico verificadas em grande parte do Brasil, esta redução de patógenos já representa um avanço para o controle da poluição microbiológica dos corpos hídricos no país.

6 - RECOMENDAÇÕES

Durante a fase de levantamento bibliográfico referente às características de efluentes hospitalares conjuntamente com os resultados obtidos na presente pesquisa, foi possível suscitar algumas questões que podem ser esclarecidas mediante mais estudos.

Foi verificado que poucas pesquisas são realizadas no Brasil com relação a um estudo mais sistemático sobre a caracterização e a periculosidade destes tipos de efluentes e qual seria o real impacto que o lançamento dos mesmos poderia provocar no ambiente ou à saúde pública, caso não sejam devidamente tratados.

Com a expectativa de continuidade deste trabalho, algumas recomendações são sugeridas para corroborar alguns resultados obtidos pela presente pesquisa e para fornecer conhecimentos adicionais sobre a problemática que envolve a saúde pública.

A primeira questão reside no fato de que muitos dados da literatura indicam que os efluentes hospitalares conteriam concentrações maiores de bactérias resistentes aos antibióticos se comparados com efluentes provenientes de outras fontes, tais como os efluentes domésticos. Entretanto, ainda faltam resultados mais consistentes que confirmem esta hipótese. Os efluentes domésticos também podem conter concentrações elevadas de bactérias resistentes aos antibióticos e, por esta razão, recomenda-se que estudos comparando as concentrações de bactérias resistentes a antibióticos entre efluentes hospitalares e domésticos sejam realizados.

Outra questão se refere à viabilidade de microrganismos patogênicos, mais especificamente de bactérias resistentes a antibióticos, em determinados ambientes e após serem lançados em um corpo receptor. Alguns fatores podem interferir na sobrevivência destes microrganismos no meio aquático, como, por exemplo, a salinidade (MEIRELLES-PEREIRA et al, 2002). Os riscos de contaminação dependem da sobrevivência dos microrganismos em tais ambientes e, por isso, recomenda-se mais estudos sobre a viabilidade de bactérias resistentes a antibióticos em outros ambientes, tais como rios ou águas marinhas.

Alguns estudos também indicam que a proporção de resistência bacteriana não se altera no decurso do processo de tratamento de esgoto e que as mesmas frequências relativas de resistência são encontradas nas bactérias presentes nos afluentes e nos efluentes de um sistema de tratamento (REINTHALER et al, 2003). Entretanto, os efluentes hospitalares contêm uma concentração elevada de medicamentos, tais como antibióticos, e que poderiam exercer uma pressão seletiva contribuindo para o aumento da frequência de bactérias resistentes a antibióticos durante as etapas de um processo de tratamento de esgoto. Sendo assim, também são sugeridos mais estudos que confirmem esta hipótese.

O estudo da genotipagem de cepas bacterianas encontradas em diversos ambientes também é interessante para tentar estabelecer a origem de um surto infeccioso ou as rotas de disseminação destes agentes.

Com relação à eficiência do referido sistema na remoção de vírus patogênicos, mais especificamente de HAV, são recomendados mais estudos para corroborar os resultados da eficiência dos filtros anaeróbios no processo de remoção destes agentes. Também se recomenda uma análise quantitativa de HAV presentes nas etapas deste processo de tratamento para que se conheça a eficiência do mesmo, em termos percentuais, do potencial do sistema para remover estes microrganismos patogênicos.

A aplicabilidade do método utilizado nesta pesquisa para concentrar HAV de amostras de lodo também pode ser mais explorada, procurando desenvolver uma metodologia que apresente uma maior acuidade analítica, além de um protocolo adequado para detecção destes vírus presentes em tais tipos de amostras.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada n. 306, de 07 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 dez. 2004.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Clínica* (Manual-Módulo V). 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>
Último acesso em 10 de março de 2006.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard Methods for the Examination Water and Wastewater*. 20^aed. Washington: American Public Health Association. 1998.

BAGGI, F., DEMARTA, A., PEDUZZI, R. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. *Research Microbiology*. 152: 743 – 751. 2001.

BALCIOGLU, I.A; OTKER, M. Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by O₃ and O₃/H₂O₂ processes. *Chemosphere*. 50: 85 – 95. 2003.

BELLÍSSIMO-RODRIGUES, F., GOMES, A.C.F., PASSOS, A.D.C., ACHCAR, J.A., PERDONÁ, G.S.C., MARTINEZ, R. Clinical outcome and risk factors related to extend-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella spp.* Infection among hospitalized patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 101, n° 4. Rio de Janeiro. June. 2006.

BLOCK, J.C; SCHWARTZBROD, L. *Viruses in Water Systems*. VCH Publishers. New York. 1989.

BURGENER, M., CANDRIAN, U., GILGEN, M. Comparative evaluation of four large-volume RNA extraction kits in the isolation of viral RNA from water samples. *Journal Virological Methods*. 108: 165-170. 2003.

BROWN, K.D., KULIS, J., THONSON, B., CHAPMAN, T.H., MAWHINNEY, D.B. Occurrence of antibiotics in hospital, residencial, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environmental*. 2005.

CASAS, N., SUÑÉN, E. Detection of enteroviruses, hepatitis A virus and rotaviruses in sewage by means of an immunomagnetic capture reverse transcription – PCR assay. *Microbiological Research*. 157: 169 – 175. 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Hepatitis A: Prevalence/ CDC Viral Hepatitis – Feb. 2007. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/a/prevalence.htm>.

CHERNICHARO, C.A.L. Reatores Anaeróbios. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Vol.5. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 1997.

CLEMENS, S.A.C., FONSECA, J.C., AZEVEDO, T., CAVALCANTI, A.M., SILVEIRA, T.R., CASTILLO, M.C. Hepatitis A and Hepatitis B seroprevalence in four centers in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 33(1): 1- 10. 2000.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. M100 – S15. Vol. 25. N°1. January 2005.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências. [Resolução de 17/03/2005].

CHELLIAPAN, S., WILBY, T., SALLIS, P.J. Performance of Up-Flow Anaerobic Stage Reactor (UASR) in the Treatment of Pharmaceutical Wastewater Containing Macrolide Antibiotics. *Water Research*. 40: 507 – 516. 2006.

CHITNIS, V., CHITNIS, S., VAIDYA, K., RAVIKANT, S., PATIL, S., CHITNIS, D.S. Bacterial Population Changes in Hospital Effluent Treatment Plant in Central India. *Water Research*. 38: 441 – 447. 2004.

CONSTANZO, S.D., MURBY, J., BATES, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environmental. *Marine Pollution Bulletin*. 51: 218 – 223. 2005.

DE MORAIS, B.A., CRAVO, C.A.N., LOUREIRO, M.M., SOLARI, C.A., ASENSI, M.D. Epidemiological analysis of bacterial strains involved in hospital infection in a University Hospital from Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. Vol. 42, n° 4. São Paulo. July/Aug. 2000.

DE PAULA, V.S; BAPTISTA, M.L; LAMPE, E; NIEL, C., GASPAR, A.M.C. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Virol.* 66: 22 – 27. 2002.

DINIZ-SANTOS, D.R., SILVA, L.R., SILVA, N. Antibiotics for the empirical treatment of acute infectious diarrhea in children. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. vol.10, n° 3. Salvador. June. 2006.

EMMANUEL, E., PERRODIN, Y., KECK,G., BLANCHARD, J.M., VERMANDE, P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *Journal Hazardous Materials*. A117: 1 – 11. 2005.

EMMANUEL^b, E., HANNA, K., BAZIN, C., KECK, G., CLÉMENT, B., PERRODIN, Y. Fate of glutaraldehyde in hospital wastewater and combined effects of glutaraldehyde and surfactants on aquatic organisms. *Environmental International*. 31: 399 – 406. 2005.

FERREIRA, C.T., SILVEIRA, T.R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. Vol 7, n° 4. São Paulo. Dec. 2004.

FLINT, S., HARTLEY, N. A modified selective medium for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* species that cause spoilage of milk and dairy products. *Int. Dairy Journal*. 6: 223 – 230. 1996.

FOCACIA, R; VERONESI, R. Hepatites Virais. Tratado de Infectologia. Ed. Atheneu, São Paulo, 1997.

GALES, A.C., PIGNATARI, A.C., JONES, R.N., BARETTA, M., SADER, H.S. Avaliação da atividade in vitro dos novos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, cefalosporinas e carbapenens contra 569 amostras clínicas de bactérias gram-negativas. *Revista da Associação Médica Brasileira*. Vol. 43, nº 2. São Paulo. Apr./ June. 1997.

GALLERT, C., FUND, K., WINTER, J. Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1-7. 2005.

GAUTAM, A.K., KUMAR, S., SABUMON, P.C. Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. *Journal of Environmental Management*. 2006.

GILGEN, M., GERMANN, D., LÜTHY, J., HÜBNER, Ph. Three – step isolation method for sensitive detection of enteroviruses, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. *International Journal Food Microbiology*. 37: 189 – 199. 1997.

GROVER, S.S; SHARMA, M; CHATTOPADHYA, D; KAPOOR, H; PASHA, S.T; SINGH, G. Phenotic and genotypic detection of ESBL mediated cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: Emergence of high resistance against cefepime, the fourth generation cephalosporin. *Journal of Infection*. 2006.

GUILLAUME, G., VERBRUGGE, D., CHASSEUR-LIBOTTE, M.L., MOENS, W., COLLARD, J.M. PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A – E) in *Salmonella entérica* serotype *Hadar* and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. *FEMS Microbiology Ecology*. 32: 77 – 85. 2000.

GUEDES, E.V.R., SPERLING, M.V. Avaliação Comparativa entre Águas Residuárias de Serviços de Saúde e Águas Residuárias Urbanas. In: Anais do 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Mato Grosso do Sul: ABES, Setembro. 2005.

GUPTA, V., DATTA, P., AGNIHOTRI, N., CHANDER, J. Comparative in vitro activities of seven new β – lactams, alone and in combination with β – lactamase inhibitors, against clinical isolates resistant to third generation cephalosporins. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. vol. 10, n° 1. 2006.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico – PNSB. 2000. Disponível em: [http:// www. Ibge.gov.br](http://www.Ibge.gov.br) Último acesso em 10 de março de 2006.

KATAYAMA, H., SHIMASAKI, A., OHGAKI, S. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detect of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. v 68, n° 3. Mar. 2002. p. 1033 – 1039.

KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., GRIFFIN, D.E., MARTIN, M.A., ROIZMAN, B., LAMB, R.A. Fields – Virology. Fourth edition: vol 1. Ed Lippincott Willians & Wilkins: Philadelphia (EUA). 2001.

KOTAPATI, S., KUTI, J.L., NIGHTINGALE, C.H. Clinical implications of extended spectrum β – lactamase (ESBL) producing *Klebsiella* species and *Escherichia coli* on cefepime effectiveness. *Journal of Infection*. 51: 211 – 217. 2005.

KUMMERER, K. Drugs in the Environment: Emission of Drugs. Diagnostic Aids and Disinfectants into Wastewater by Hospitals in Relation to Other Sources – a Review. *Chemosphere*. 45: 957 – 969. 2001.

KUMMERER, K., AL-AHMAD, A., MERSCH-SUNDERMANN, V. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere*. 40: 701 – 710. 2000.

LEE, H., YONG, D., YUM, J.H., ROH, K.H., LEE, K., YAMANE, K., ARAKAWA, Y., CHONG, Y. Dissemination of 16S rRNA methylase – mediated highly amikacin – resistant of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2006.

LOPES, A.C.S; RODRIGUES, J.F; MORAIS JÚNIOR, M.A. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. *Microbiological Research*. 160: 37 – 46. 2005.

LOUREIRO, M.M; MORAES, B.A; QUADRA, M.R.R; PINHEIRO, G.S; ASENSI, M.D. Study of multi-drug resistant microorganisms isolated from blood cultures of hospitalized newborns in Rio de Janeiro city, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.33, nº1, São Paulo, Jan. 2002.

MEIRELLES-PEREIRA, F., PEREIRA, A.M.S., SILVA, M.C.G., GONÇALVES, V.D., BRUM, P.R., CASTRO, E.A.R., PEREIRA, A.A., PEREIRA, J.A.A. Ecological Aspects of the Antimicrobial Resistance in Bacteria of Importance to Human Infections. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33: 287 – 293. 2002.

MELANO, R.G., DAVIDSON, R.J., MUSGRAVE, H.L., FORWARD, K.R. Cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from Nova Scotia, Canadá. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2006.

MELLO JUNIOR, H.A.A. Eficiência dos Filtros Anaeróbios Cynamon no Tratamento de Esgotos. Tese de dissertação apresentada à FIOCRUZ/ENSP como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em Ciências (M.Sc.), 1999. 61 p.

METCALF & EDDY. Wastewater Engineering: treatment and reuse. 4th ed: Mc Graw – Hill, New York. 2003.

MOTTA, R.N., OLIVEIRA, M.M., MAGALHÃES, P.S.F., DIAS, A.M., ARAGÃO, L.P., FORTI, A.C., CARVALHO, C.B.M. Plasmid – mediated extended – spectrum β – lactamase-producing strains of *Enterobacteriaceae* isolated from diabetes foot infections in a Brazilian diabetic center. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. vol.7 nº 2. 2003.

NASSER, A.M., OMAN, S.D. Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. *Water Research*. Vol. 33, nº 7, p. 1748 – 1752. 1999.

PAULO, P.L et al. Avaliação da Eficiência de um Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente Tratando Esgoto Doméstico e Hospitalar. In: Anais do 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Mato Grosso do Sul: ABES, setembro. 2005.

PATERSON, D.L. Resistance in Gram-Negative Bacteria: *Enterobacteriaceae*. *The American Journal of Medicine*. vol.119 (6A) S20 – S28. 2006.

PEREIRA, F.E.L., GONÇALVES, C.S. Hepatite A. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. vol. 36, nº 3. Maio/junho. 2003.

PRADO, T; CORAUCCI FILHO, B. Desinfecção do Lodo de Esgoto por Radiação Solar: Estudo do Comportamento de Coliformes e Patógenos. In: Anais do Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP. Campinas, 2003.

REINTHALER, F.F., POSCH, J., FEIERL, G., WUST, G., HASS, D., RUCKENBAUER, G., MASCHER, F., MARTH, E. Antibiotic Resistance of *E.coli* in Sewage and Sludge. *Water Research*. 37: 1685 – 1690. 2003.

ROSE, M.A; DHAR, A.K; BROOKS, H.A; ZECCHINI, F; GERSBERG, R.M. Quantitation of hepatitis A virus and enterovirus levels in the lagoon canals and Lido beach of Venice, Italy, using real-time RT-PCR. *Water Research*. 40: 2387 – 2396. 2006.

SADER, H.S; MENDES, R.E; GALES, A.C; JONES, R.N; PFALLER, M.A; ZOCCOLI, C; SAMPAIO, J. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros – Resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. *Jornal de Pneumologia*. V.27, nº 2. São Paulo, Mar/apr. 2001.

SCHWARTZ, T., KOHNEN, W., JANSEN, B., OBST, U. Detection of Antibiotic-Resistant Bacteria and their Resistance Genes in Wastewater, Surface Water, and Drinking Water Biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*. 43: 325 – 335. 2003.

SILVA, N., OLIVEIRA, M., BANDEIRA, A.C., BRITES, C. Risk factors for infection by extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Salvador, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. Vol. 10, nº 3. Salvador. June. 2006.

SILVEIRA, I.C.T., MONTEGGIA, L.O. Desinfecção e Avaliação da Toxicidade de Efluente de Origem Doméstica e Hospitalar com Hipoclorito de Sódio e Ozônio. In: Anais do 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Mato Grosso do Sul: ABES, setembro. 2005.

SOARES, S.R.A., BERNARDES, R.S., CORDEIRO NETTO, O.M. Relações entre Saneamento, Saúde Pública e Meio Ambiente: Elementos para Formulação de um Modelo de Planejamento em Saneamento. *Cadernos de Saúde Pública*. Vol. 18, nº6. Rio de Janeiro. Nov/dez. 2002.

SUN, H.Y., CHEN, S.Y., CHANG, S.C., PAN, S.C., SU, C.P., CHEN, Y.C. Community – onset *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: influence of health care exposure on antimicrobial susceptibility. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 55: 135 – 141. 2006.

TAVARES, W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos. 2ª edição. São Paulo. Ed. Atheneu, 1996. 792 p.

TORTORA, G.J., FUNK, B.R., CASE, C.L. Microbiologia. 6ª edição. Ed. Artmed. São Paulo. 2002.

TOZE, S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research*. Vol. 33, nº 17, 3545 – 3556. 1999.

TYRRELL, S.A., RIPPEY, S.C., WATKINS, W.D. Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chlorine and ozone. *Water Research*. Vol.29, nº 11, p. 2483 – 2490. 1995.

TURRINI, R.N.T; SANTO, A.H. Infecção hospitalar e causas múltiplas de morte. *Jornal de Pediatria*. V. 78, nº 6. Porto Alegre. Nov/Dec. 2002.

VAIDYA, S.R., CHITAMBAR, S.D., ARANKALLE, V.A. Polymerase Chain Reaction - Based Prevalence of Hepatitis A, Hepatitis E and TT Viruses in Sewage from an Endemic Area. *Journal of Hepatology*. 37: 131 – 136. 2002.

VILLAS BÔAS, P.J.F., RUIZ, T. Ocorrência de infecção hospitalar em idosos internados em hospital universitário. *Revista de Saúde Pública*. Vol.38, nº 3. São Paulo. June. 2004.

VILLAR, L.M; DE PAULA, V.S; GASPAR, A.M.C. Seasonal Variation of Hepatitis A Vírus Infection in the City of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. vol. 44, n° 5. São Paulo. Oct. 2002.

VILLAR ^b, L.M., DA COSTA, M.C.E., DE PAULA, V.S., GASPAR, A.M.C. Hepatitis A outbreak in a public school in Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97: 301 – 307. 2002.

VILLAR, L.M; DE PAULA, V.S; DINIZ-MENDES, L; LAMPE, E; GASPAR, A.M.C. Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples. *Journal Virological Methods*. 2006.

VON SPERLING, M. Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos. Vol.1, 3^aed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA); Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. 2005. 452 p.

WEN, X., DING, H., HUANG, X., LIU, R. Treatment of hospital wastewater using a submerged membrane bioreactor. *Process Biochemistry*. (39): 1427 – 1431. 2004.

YÁÑEZ, M.A., VALOR, C., CATALÁN, V. A simple and cost-effective method for the quantification of total coliforms and *Escherichia coli* in potable water. *Journal of Microbiological Methods*. 2005.

8 - ANEXOS

RESULTADOS DE DBO₅

As análises de DBO₅ foram realizadas no laboratório da UERJ. Não foi feita inoculação de semente.

Os pontos analisados foram: entrada, saída do reator UASB e saída final.

Os resultados estão expressos nas Tabelas abaixo.

Tabela 21. DBO₅ (mg/L) nos respectivos pontos de coleta e nas datas de coleta

Data das coletas	Entrada	UASB	Saída
04/10/05	51,8	0	0
22/05/06	30	6	3
05/06/06*	50	18	12
26/06/06	16	3,5	1
17/07/06*	24	8	2
14/08/06*	30	7	1
28/08/06*	28	11	0,29
12/09/06	36	12	1
25/09/06	15	3,5	0,40
07/11/06	20	4	1,5
08/11/06	45	4	2
29/11/06*	16	11	6
Médias	30,15	11	4,25

As datas das coletas em que a ETE operou normalmente. As médias dos valores obtidos para a saída do reator UASB e da saída final correspondem a estas datas.

RESULTADOS DE DQO

Tabela 22. Concentração de DQO (mg/L) nos respectivos pontos e datas de coleta

Data das coletas	Entrada	UASB	Saída
04/10/05	75,9	55,2	20,7
22/05/06	185,2	50,8	14,5
05/06/06*	209,1	69,7	31,0
26/06/06	117,6	39,2	23,5
17/07/06*	156,8	78,4	23,5
14/08/06*	158,1	71,1	47,4
28/08/06*	94,8	55,3	15,8
12/09/06	116,2	46,5	23,2
25/09/06	68,8	30,6	15,3
07/11/06	183,2	38,2	22,9
08/11/06	374	22,9	7,6
29/11/06*	161,5	84,6	53,8
Médias	158,43	71,82	34,3

* Estas datas correspondem ao período em que a ETE estava funcionando normalmente. As médias dos valores obtidos para a saída do reator UASB e da saída final correspondem a estas datas.

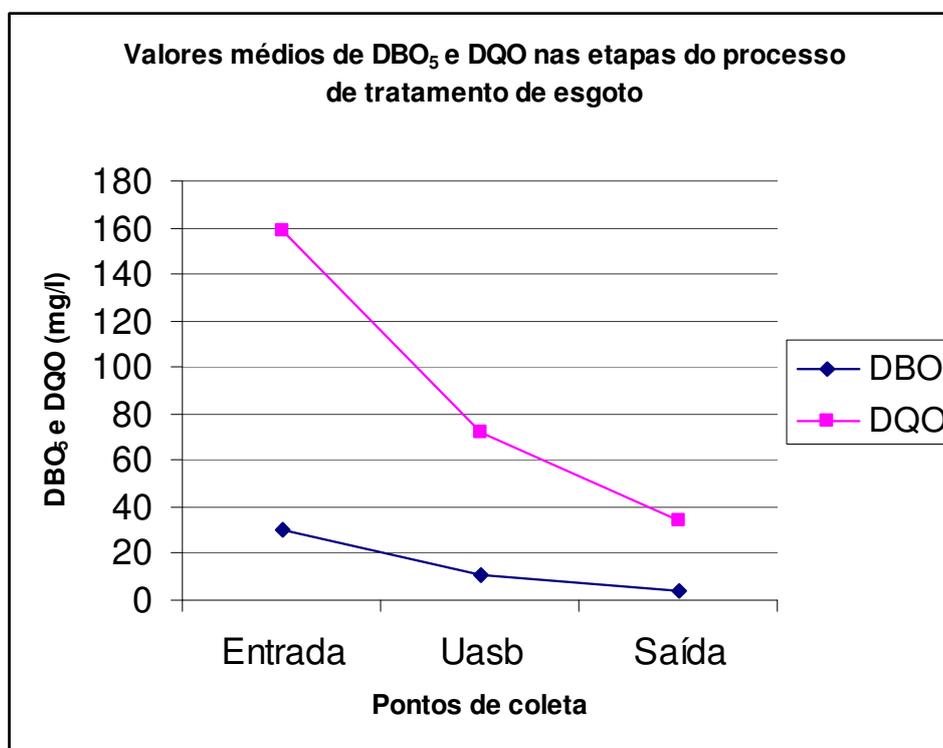


Tabela 23. SÓLIDOS SUSPENSOS TOTAIS DO LODO (SST)

Datas das coletas	Concentração de SST (mg/ L)
04/10/05	782
22/05/06	15565
05/06/06*	3788
26/06/06	1030,5
17/07/06*	1654,5
14/08/06*	759
28/08/06*	704,5
12/09/06	1395
25/09/06	943,5
Média	1726,5

* Dias das coletas em que a ETE operou normalmente

Tabela 24. DETERMINAÇÃO DE AMÔNIA [N-NH₃] (mg/L)

Data das coletas	Entrada	UASB	Saída
04/10/05	10,92	23,24	5,09
22/05/06	10,18	8,16	0,09
05/06/06*	12,86	8,42	7,20
26/06/06	16,56	20,33	0,26
17/07/06*	7,96	7,86	0,88
14/08/06*	5,12	8,82	0,09
28/08/06*	29,89	53,72	0,52
12/09/06	18,57	27,04	0,14
25/09/06	9,23	16,45	0,12
07/11/06	13,39	12,45	0,26
08/11/06	13,83	12,81	10,21
29/11/06*	14,34	10,13	13,61
Médias	13,57	17,79	4,46

* Dias das coletas em que a ETE operou normalmente. Os resultados das médias correspondentes aos pontos do reator UASB e da saída foram calculados a partir destes dados.

pH e TURBIDEZ

O pH e a turbidez foram monitorados, quando possível, nos pontos de coleta correspondentes à entrada, saída do reator UASB e saída final. A turbidez foi medida no próprio local de coleta e o pH no laboratório da UERJ, logo após a coleta. O pH foi medido através de PHmetro Digimed, modelo DM21 e a turbidez através de um turbidímetro 2100P Turbidimeter – Hexis, da Hach.

Os dados gerais estão expressos na Tabela 7.5.

Tabela 25. Resultados de pH e Turbidez (UNT)

Data da coleta	Vazão (l/s)	pH			Turbidez (UNT)		
		Entrada	UASB	Saída	Entrada	UASB	Saída
04/10/05	-	6,9	7,1	7,2			
22/05/06	-	7,0	7,0	7,1	-	-	-
05/06/06*	-	7,1	7,1	7,0	-	-	-
26/06/06	-	7,0	7,2	7,1	-	-	-
17/07/06*	2,85	7,0	6,8	6,2	38,8	28,3	6,61
14/08/06*	2,20	7,1	7,1	6,5	81,3	13,6	3,88
28/08/06*	2,30	6,8	7,0	6,1	35,5	2,02	1,12
12/09/06	2,25	7,0	7,8	7,1	49,6	5,82	3,20
25/09/06	2,25	7	7,5	7	54,5	6,17	2,65
07/11/06	-	6,7	7,2	6,5	89,7	6,3	4,1
08/11/06	-	7	7,4	7,3	-	-	-
29/11/06*	-	6,9	6,8	6,9	9,75	9,75	9,75
Médias	2,37	6,95	6,96	6,54	44,9	13,41	5,34

Datas de coleta em que a ETE funcionava normalmente. As médias obtidas para os parâmetros analisados nos pontos do reator UASB e da saída final correspondem aos valores obtidos nestas datas.

Tabela 26. Parâmetros físico-químicos obtidos da ETE hospitalar

Parâmetros	Unidade	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Nº de dados
Vazão	L. s ⁻¹	2,20	2,85	2,37	0,27	5
SST (lodo)	mg. L ⁻¹	704,5	3788	1726,5	1441,7	4
pH afluente		6,7	7,1	6,95	0,11	12
pH UASB		6,8	7,1	6,96	0,15	5
pH efluente		6,1	7	6,54	0,40	5
Turbidez afluente	UNT	9,75	89,7	44,9	28,3	7
Turbidez UASB	UNT	2,02	28,3	13,41	11,02	4
Turbidez efluente	UNT	1,12	9,75	5,34	3,69	4
Amônia afluente	mg.L ⁻¹	5,12	29,89	13,57	6,33	12
Amônia UASB	mg.L ⁻¹	7,86	53,72	17,79	20	5
Amônia efluente	mg.L ⁻¹	0,09	13,61	4,46	7,18	5
DBO ₅ afluente	mg.L ⁻¹	15	51,8	30,15	13,11	12
DBO ₅ UASB	mg.L ⁻¹	7	18	11	4,3	5
DBO ₅ efluente	mg.L ⁻¹	0,29	12	4,25	4,85	5
DQO afluente	mg.L ⁻¹	68,8	209,1	158,43	81,3	12
DQO UASB	mg.L ⁻¹	55,3	84,6	71,82	11	5
DQO efluente	mg.L ⁻¹	15,8	53,8	34,3	15,98	5

Obs: os resultados correspondentes à saída do reator UASB e da saída final foram obtidos das coletas em que ETE operava normalmente.

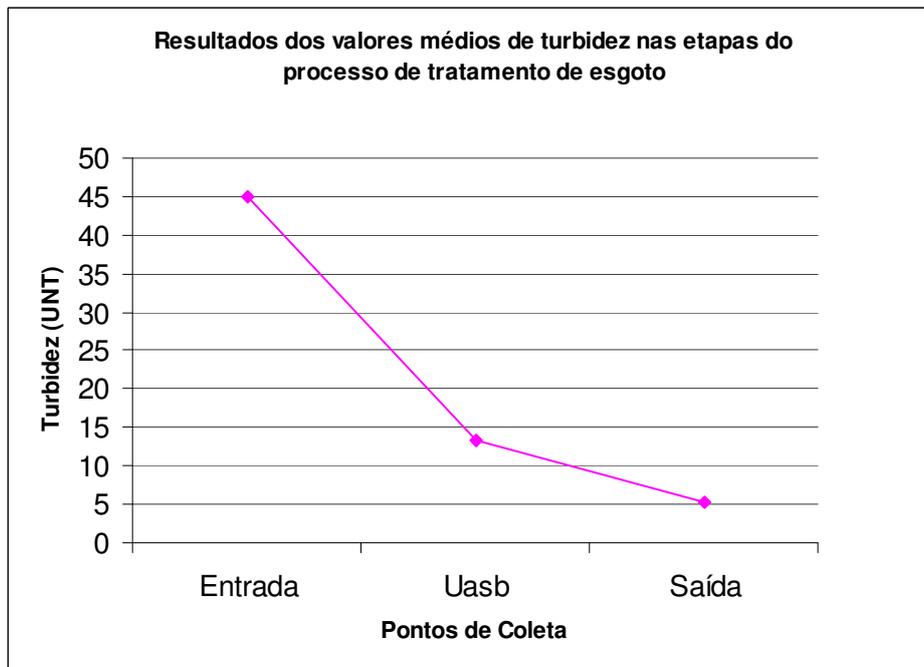
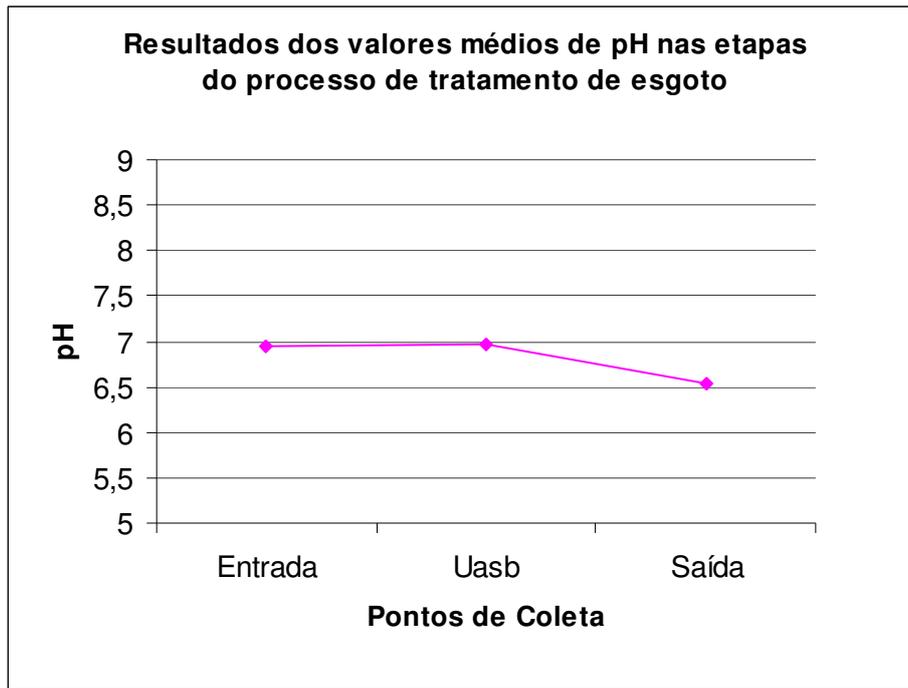


Tabela 27. Contagem total de unidades formadoras de colônias (UFC) nos respectivos pontos de coleta e por meios de cultura utilizados

Data das coletas	Meios de cultura	Entrada	Lodo	UASB	Saída	
22/05/06	Tergitol puro	280	248	32	0	
	Tergitol 10 ⁻¹	8	240	4	0	
	Tergitol 10 ⁻²	4	0	0	0	
	Tergitol 10 ⁻³	1	1	0	0	
	EMB puro	110	Incontável	36	0	
	EMB 10 ⁻¹	0	1	1	0	
	EMB 10 ⁻²	0	0	0	0	
	EMB 10 ⁻³	0	0	0	0	
	GSP puro	Incontável	Incontável	Incontável	0	
	GSP 10 ⁻¹	0	0	5	0	
	GSP 10 ⁻²	0	0	0	0	
	GSP 10 ⁻³	0	0	0	0	
			Entrada	Lodo	UASB	Saída
	05/06/06*	Tergitol puro	400	400	350	400
Tergitol 10 ⁻¹		60	70	150	8	
Tergitol 10 ⁻²		6	10	2	6	
Tergitol 10 ⁻³		0	0	0	0	
EMB puro		240	300	300	400	
EMB 10 ⁻¹		50	100	100	6	
EMB 10 ⁻²		7	10	0	0	
EMB 10 ⁻³		0	0	0	0	
GSP puro		240	400	200	200	
GSP 10 ⁻¹		50	30	80	18	
GSP 10 ⁻²		7	8	2	3	
GSP 10 ⁻³		0	0	0	0	
		Entrada	Lodo	UASB	Saída	
26/06/06		Tergitol puro	260	2	24	0
	Tergitol 10 ⁻¹	48	0	0	0	
	Tergitol 10 ⁻²	5	0	0	0	
	Tergitol 10 ⁻³	0	0	0	0	
	EMB puro	180	4	Incontável	0	
	EMB 10 ⁻¹	36	0	0	0	
	EMB 10 ⁻²	3	0	0	0	
	EMB 10 ⁻³	0	0	0	0	
	GSP puro	Incontável	0	Incontável	0	
	GSP 10 ⁻¹	19	0	0	0	
	GSP 10 ⁻²	7	0	0	0	
	GSP 10 ⁻³	0	0	0	0	
			Entrada	Lodo	UASB	Saída
		Tergitol puro	416	88	58	360
Tergitol 10 ⁻¹		40	12	10	0	
Tergitol 10 ⁻²		4	1	0	0	
Tergitol 10 ⁻³		NA	NA	NA	NA	

17/07/06*	EMB puro	448	85	164	15	
	EMB 10 ⁻¹	72	35	5	0	
	EMB 10 ⁻²	0	0	1	0	
	EMB 10 ⁻³	NA	NA	NA	NA	
	GSP puro	Incontável	Incontável	140	120	
	GSP 10 ⁻¹	114	25	4	2	
	GSP 10 ⁻²	2	0	1	0	
	GSP 10 ⁻³	NA	NA	NA	NA	
		Entrada	Lodo	UASB	Saída	
28/08/06*	Tergitol puro	240	250	130	0	
	Tergitol 10 ⁻¹	14	0	4	0	
	Tergitol 10 ⁻²	2	0	0	0	
	Tergitol 10 ⁻³	NA	NA	NA	NA	
	EMB puro	110	30	110	0	
	EMB 10 ⁻¹	17	0	2	0	
	EMB 10 ⁻²	2	0	0	0	
	EMB 10 ⁻³	NA	NA	NA	NA	
	GSP puro	100	16	40	0	
	GSP 10 ⁻¹	22	0	3	0	
	GSP 10 ⁻²	6	0	0	0	
	GSP 10 ⁻³	NA	NA	NA	NA	
			Entrada	Lodo	UASB	Saída
	12/09/06	Tergitol puro	431	69	200	0
		Tergitol 10 ⁻¹	6	21	15	0
		Tergitol 10 ⁻²	1	0	9	0
Tergitol 10 ⁻³		NA	NA	NA	NA	
EMB puro		52	18	283	0	
EMB 10 ⁻¹		40	0	16	0	
EMB 10 ⁻²		4	0	4	0	
EMB 10 ⁻³		NA	NA	NA	NA	
GSP puro		27	23	92	0	
GSP 10 ⁻¹		5	1	13	0	
GSP 10 ⁻²		0	1	4	0	
GSP 10 ⁻³		NA	NA	NA	NA	
		Entrada	Lodo	UASB	Saída	
25/09/06		Tergitol puro	380	2	5	0
		Tergitol 10 ⁻¹	7	0	0	0
		Tergitol 10 ⁻²	0	0	1	0
	Tergitol 10 ⁻³	NA	NA	NA	NA	
	EMB puro	340	0	6	0	
	EMB 10 ⁻¹	60	14	0	0	
	EMB 10 ⁻²	0	0	0	0	
	EMB 10 ⁻³	NA	NA	NA	NA	
	GSP puro	400	56	364	0	
	GSP 10 ⁻¹	15	0	0	0	
	GSP 10 ⁻²	0	0	0	0	
	GSP 10 ⁻³	NA	NA	NA	NA	

	Entrada	Lodo	UASB	Saída	
07/11/06	Tergitol puro	NA	NA	7	0
	Tergitol 10 ⁻¹	NA	NA	NA	0
	Tergitol 10 ⁻²	NA	NA	NA	NA
	Tergitol 10 ⁻³	NA	NA	NA	NA
	EMB puro	NA	NA	5	0
	EMB 10 ⁻¹	NA	NA	1	0
	EMB 10 ⁻²	NA	NA	NA	NA
	EMB 10 ⁻³	NA	NA	NA	NA
	GSP puro	NA	NA	2	0
	GSP 10 ⁻¹	NA	NA	2	0
	GSP 10 ⁻²	NA	NA	NA	NA
	GSP 10 ⁻³	NA	NA	NA	NA
	08/11/06	Tergitol puro	NA	NA	5
Tergitol 10 ⁻¹		NA	NA	0	0
Tergitol 10 ⁻²		NA	NA	NA	NA
Tergitol 10 ⁻³		NA	NA	NA	NA
EMB puro		NA	NA	1	0
EMB 10 ⁻¹		NA	NA	0	0
EMB 10 ⁻²		NA	NA		
EMB 10 ⁻³		NA	NA		
GSP puro		NA	NA	1	0
GSP 10 ⁻¹		NA	NA	0	0
GSP 10 ⁻²		NA	NA	NA	NA
GSP 10 ⁻³		NA	NA	NA	NA
29/11/06*		Tergitol puro	NA	NA	5
	Tergitol 10 ⁻¹	NA	NA	6	0
	Tergitol 10 ⁻²	NA	NA	2	0
	Tergitol 10 ⁻³	NA	NA	NA	NA
	EMB puro	NA	NA	Incontável	Incontável
	EMB 10 ⁻¹	NA	NA	5	9
	EMB 10 ⁻²	NA	NA	10	0
	EMB 10 ⁻³	NA	NA	NA	NA
	GSP puro	NA	NA	Incontável	Incontável
	GSP 10 ⁻¹	NA	NA	10	11
	GSP 10 ⁻²	NA	NA	2	0
	GSP 10 ⁻³	NA	NA	NA	NA

NA:NãoAvaliado

Tabela 28. Contagem da média total do número de colônias por tipo de meio de cultura e funcionamento da ETE durante o período de coleta de amostras

Meios de cultura	Entrada		Lodo	
	ETE normal	ETE parada	ETE normal	ETE parada
Tergitol puro	343,85	337,75	246	80,25
Tergitol 10 ⁻¹	26,14	17,25	27,33	65,25
Tergitol 10 ⁻²	2,28	2,5	3,66	0
Tergitol 10 ⁻³	0,33	0,5	0	0,5
EMB puro	211,42	170,5	138,33	7,33
EMB 10 ⁻¹	39,28	34	45	3,75
EMB 10 ⁻²	2,57	1,75	3,33	0
EMB 10 ⁻³	0	0	0	0
GSP puro	191,75	213,5	208	26,33
GSP 10 ⁻¹	34,3	9,75	18,33	0,25
GSP 10 ⁻²	3,28	1,75	2,66	0,25
GSP 10 ⁻³	0	0	0	0

Tabela 29. Contagem da média total do número de colônias por tipo de meio de cultura e funcionamento da ETE durante o período de coleta de amostras

Meios de cultura	UASB		Saída	
	ETE normal	ETE parada	ETE normal	ETE parada
Tergitol puro	162,25	45,5	253,33	0
Tergitol 10 ⁻¹	41,25	3,8	2	0
Tergitol 10 ⁻²	1,25	2,5	1,5	0
Tergitol 10 ⁻³	0	0	0	0
EMB puro	191,33	66,2	138,33	0
EMB 10 ⁻¹	28	3	3,75	0
EMB 10 ⁻²	2,75	1	0	0
EMB 10 ⁻³	0	0	0	0
GSP puro	126,66	114,75	240	0
GSP 10 ⁻¹	24,25	3,33	7,75	0
GSP 10 ⁻²	1,25	1	0,75	0
GSP 10 ⁻³	0	0	0	0

