

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

SARA ANGELINO MARTINS

**PESQUISA DE VÍRUS ENTÉRICOS E INDICADORES
BACTERIANOS DE POLUIÇÃO FECAL NA ÁGUA E NO
SEDIMENTO EM ÁREA DE MANGUEZAL DA BAÍA DE VITÓRIA
(ES)**

VITÓRIA
2013

SARA ANGELINO MARTINS

**PESQUISA DE VÍRUS ENTÉRICOS E INDICADORES
BACTERIANOS DE POLUIÇÃO FECAL NA ÁGUA E NO
SEDIMENTO EM ÁREA DE MANGUEZAL DA BAÍA DE VITÓRIA
(ES)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental, na área de Saneamento.

Orientador: Prof^a Dr^a Regina de Pinho Keller

VITÓRIA

2013

SARA ANGELINO MARTINS

**PESQUISA DE VÍRUS ENTÉRICOS E INDICADORES
BACTERIANOS DE POLUIÇÃO FECAL NA ÁGUA E NO
SEDIMENTO EM ÁREA DE MANGUEZAL DA BAÍA DE VITÓRIA
(ES)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental na área de Saneamento.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Regina de Pinho Keller
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Sérgio Túlio A. Cassini
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

Prof. Dr. Túlio Machado Fumian
Fundação Oswaldo Cruz
Examinador Externo

Aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus

Aos meus pais pelo incansável e incondicional apoio nesta minha trajetória

A tia Sônia pelo incentivo, amor e carinho

A minha Orientadora Dr^a. Regina de Pinho Keller pela confiança, apoio, dedicação, paciência e pelo exemplo como professora, orientadora e pesquisadora

Ao professor Dr. Sérgio Túlio pelo apoio e contribuições em diversos momentos para este trabalho e por participar da banca de avaliação

Ao professor Dr. Túlio Fumian por participar da banca de avaliação e pela disposição em contribuir para este trabalho

A professora Dr^a. Vânia de Mello pelos ensinamentos durante a visita a Universidade Federal do Ceará

Aos colegas da Lembiotech (Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia) em especial a Luína Benevides pela convivência agradável e pelo aprendizado que me proporcionou entre conversas e ensinamentos

Agradeço a Professora Dr^a. Mariza Miagostovich e à equipe do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ pelos ensinamentos

A Juliana Justino pelo apoio no decorrer do trabalho

Agradeço a todos os amigos do Labsan, em especial Paulo Wagner, Paulo César, Jairo, Márcia, Elaine e Cristiane Veronesi pelo apoio, ensinamentos, conversas e divertidos almoços no RU.

A secretária do PPGEA Rose pelo apoio e paciência

Agradeço aos meus queridos amigos, Karolina Scarpati Rodrigo Pratte, Susanne Mariane e Yohanna Gomes pela ajuda, apoio, discussões, dificuldades e alegrias ao longo destes dois anos de trabalho e pela amizade neste período tão enriquecedor da minha vida

Aos meus amigos e companheiros do Labsan Andréia, Bruna, Moisés, Ademir, Lorena, Karoline Barros, Waldiléia, Rodrigo Oss, Lívia, Mirella, Georgete, Lúcia, Gabriel Hector e Renata Chagas

Ao Renné e sua família pelos ensinamentos e pelas divertidas coletas durante todos os meses de trabalho

Ao Marcus Covre pelo apoio e discussões

Ao Toninho pela ajuda e apoio

Aos colegas do laboratório de hidráulica e monitoramento ambiental - LABHIDRO

Agradeço aos familiares pelo apoio e palavras de encorajamento

Aos meus queridos amigos Herbert Rausch e Roberta Machado pela convivência e amizade.

A CAPES, pelo apoio financeiro, sem o qual esse trabalho não teria sido realizado.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, ajudaram na execução deste trabalho.

**“A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.**

Albert Einstein

RESUMO

A região da Ilha das Caieiras, na cidade de Vitória (ES) situa-se dentro de uma região estuarina na Baía de Vitória e encontra-se próxima a uma extensa área de manguezal. A população residente mantém relação de grande dependência com os recursos naturais oferecidos (ostras, mariscos) que são utilizados como fonte de subsistência e lazer. O manguezal da Ilha das Caieiras recebe esgoto *in natura* proveniente das áreas adjacentes, contaminando a água e os mariscos ali existentes. Além disso, os microrganismos que são lançados juntamente com o esgoto no ambiente costeiro podem ser acumulados no sedimento. O presente trabalho teve por objetivo pesquisar vírus entéricos e bactérias indicadoras de poluição fecal no sedimento e na água em três pontos do estuário (P1, P2 e P3) na área de manguezal, ao longo de 15 meses de monitoramento. Foram avaliadas um total de 45 amostras para presença de coliformes termotolerantes (CT), enterococos e vírus entéricos (adenovírus – HAdV; rotavírus – RVA; e norovírus – NoV GII), utilizando-se a Nested-PCR. Também foram avaliados parâmetros físico-químicos da água próxima ao ponto de coleta do sedimento. As análises microbiológicas do sedimento apresentaram respectivamente as seguintes médias geométricas para enterococos: $1,5 \times 10^3$, $1,5 \times 10^3$ e $1,1 \times 10^3$ UFC/100g, coliformes termotolerantes: $4,9 \times 10^2$, $2,6 \times 10^2$, $5,1 \times 10^2$. Nas amostras de água os resultados encontrados para enterococos foram: $7,6 \times 10^1$, $5,0 \times 10^1$ e $1,1 \times 10^2$ e coliformes termotolerantes $2,2 \times 10^2$, $1,3 \times 10^2$, $3,0 \times 10^2$. As análises de vírus entéricos nas amostras de água apresentaram frequências de 20% para RV, 13% para AdV e 8,8% para NoV GII e nas amostras de sedimento somente NoV GII(4,5%) foi encontrado. A presença viral e bacteriológica nas amostras indica que esta região encontra-se sob impacto antropogênico, e que o sedimento proveniente do manguezal da Ilha das Caieiras pode atuar como reservatório de substâncias poluentes que ao serem liberadas para a coluna d'água podem causar doenças gastrointestinais às pessoas que utilizam essa área como fonte de subsistência e lazer.

Palavras-chave: Manguezal, Sedimento, Água, Vírus Entéricos, Coliformes termotolerantes, Nested-PCR.

ABSTRACT

The region of the Ilha das Caieiras, in Vitória (ES) is located within an estuarine region in Vitoria Bay and is close to an extensive mangrove area. The resident population ratio remains highly dependent relationship on natural resources offered (oysters, clams) therefore used as a source of subsistence and recreation. The mangrove of Ilha das Caieiras receives sewage from adjacent areas, contaminating water and shellfish therein. In addition, microorganisms that are cast together with the sewage in the coastal environment can be accumulated in the sediment. This objective of this work was to investigate enteric viruses and bacterial indicators of fecal pollution in the sediment and water at three points of this estuary (P1, P2 and P3) mangrove area over 15 months of monitoring. We evaluated a total of 45 samples for the presence of thermotolerant coliform (TC), enterococci and enteric viruses (adenovirus - HAdV; rotavirus - RVA, and norovirus - NoV GII, using a nested PCR. We also evaluated the physico-chemical parameters of the water collection point next to the sediment. Microbiological analyzes of the sediment were respectively geometric mean for enterococci: 1.5×10^3 , 1.5×10^3 and 1.1×10^3 UFC/100g, thermotolerantes coliforms: 4.9×10^3 , 2.6×10^2 and 5.1×10^2 . In water samples the results for enterococci were: 7.6×10^1 , 5.0×10^1 and 1.1×10^2 and themortolerants coliforms: 2.2×10^2 , 1.3×10^2 , and 3.0×10^2 . Analyses of enteric viruses in water samples showed frequencies of 20% for RV, 13% for AdV and 8.8% for NoV GII and sediment samples only NoV GII (4.5%) was found. The presence of the viral and bacteriological samples indicates that this region is under anthropogenic impact, and that the sediment from the mangrove of Ilha das Caieiras can act as a reservoir of pollutants that are released to the water column can cause gastrointestinal diseases the people who use this area as a source of livelihood and recreation.

Keywords: Mangrove, Sediment, Water, Enteric Viruses, Coliforms themotolerant, Nested-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização do sistema estuarino composto pela Baía de Vitória e pela Baía do Espírito Santo.....	22
Figura 2: Organização dos componentes orgânicos e inorgânicos do solo.....	24
Figura 3: Mapa faciológico dos sedimentos superficiais da Baía de Vitória.....	26
Figura 4: Rotas de transmissão de vírus entéricos.....	30
Figura 5: Esquema de uma partícula de adenovírus e micrografia eletrônica mostrando os vírus formando agrupamento.....	32
Figura 6: Visualização tridimensional da partícula de rotavírus e a localização de proteínas.....	33
Figura 7: Esquema de uma partícula de norovírus	36
Figura 8: Vista dos pontos de coleta de água e sedimento no sistema estuarino da Baía de Vitória	44
Figura 9: Pontos de coleta de amostra na Baía de Vitória.....	45
Figura 10: Fluxograma das etapas realizadas na detecção e quantificação de coliformes termotolerantes nas amostras de água do estuário e no sedimento.....	50
Figura 11: Fluxograma das etapas realizadas na detecção e quantificação de enterococos nas amostras de água do estuário e no sedimento.....	51
Figura 12: Fluxograma das etapas realizadas na detecção e quantificação de vírus entéricos nas amostras de água e sedimento do estuário.....	58
Figura 13: Monitoramento do pH da água intersticial do sedimento do estuário no dia de coleta, nos três pontos do estuário de outubro/2011 a dezembro/2012.....	61
Figura 14: Monitoramento do pH da água do estuário no dia de coleta, nos três pontos do estuário de outubro/2011 a dezembro/2012.....	62
Figura 15: Monitoramento da temperatura do sedimento do estuário, nos três pontos do estuário de outubro/2011 a dezembro/2012.....	62
Figura 16: Monitoramento da temperatura da água do estuário, nos três pontos do estuário de outubro/2011 a dezembro/2012.....	63
Figura 17: Monitoramento da condutividade no dia de coleta, nos três pontos do estuário de outubro/2011 a dezembro/2012.....	63

Figura 18: Monitoramento da salinidade da água intersticial do sedimento no dia de coleta, nos três pontos do estuário de outubro/2011 a dezembro/2012.....	64
Figura 19: Monitoramento da salinidade da água no dia de coleta, nos três pontos do estuário de outubro/2011 a dezembro/2012.....	64
Figura 20: Monitoramento do oxigênio dissolvido na água do estuário no dia de coleta, nos três pontos do estuário de outubro/2011 a dezembro/2012.....	65
Figura 21: Monitoramento dos sólidos dissolvidos totais no dia de coleta nos três pontos do estuário de outubro/2011 a dezembro/2012.....	65
Figura 22: Monitoramento dos sólidos voláteis no dia de coleta nos três pontos do estuário de outubro/2011 a dezembro/2012.....	66
Figura 23: Monitoramento da turbidez no dia de coleta nos três pontos do estuário de outubro/2011 a dezembro/2012.....	66
Figura 24: As médias dos pontos de coliformes termotolerantes (NMP) de outubro de 2011 a dezembro de 2012 nos três pontos de coleta de água e sedimento.....	70
Figura 25: As médias dos pontos de coleta de enterococcos (NMP) de outubro de 2011 a dezembro de 2012 nos três pontos de coleta de água e sedimento.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Detecção de vírus entéricos em amostras de água observada por diferentes autores.....	38
Tabela 2: Normas relativas ao limites microbiológicos para avaliação de águas recreacionais	42
Tabela 3: Pontos de amostragem.....	44
Tabela 4: Concentrações finais dos reagentes da PCR convencional em cada reação.....	54
Tabela 5: Programa para reações da 1ª PCR de AdV, RV e NoV.....	55
Tabela 6: Programa para reações de nested-PCR de AdV, RV e Nov.....	55
Tabela 7: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para PCR e nested-PCR.....	56
Tabela 8: Tamanho dos fragmentos esperados em números de pares de bases (pb) amplificados por reações de nested-PCR	57
Tabela 9: Estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos da água analisados durante os 15 meses de monitoramento	68
Tabela 10: Distribuição granulométrica as amostras de sedimento.....	69
Tabela 11: Resultado da estatística descritiva das análises de coliformes termotolerantes e enterococos das amostras de água e sedimento do estuário da Baía de Vitória	71
Tabela 12: Ocorrência de vírus detectados durante o período de monitoramento para amostras de água por análise de PCR qualitativa.....	73
Tabela 13: Ocorrência de vírus detectados durante o período de monitoramento para amostras de sedimento por análise de PCR qualitativa.....	73
Tabela 14: Frequência de genoma de AdV, RV e NoV por nested-PCR em água e sedimento durante 15 meses de monitoramento.....	74

LISTA DE SIGLAS

AdV - Adenovírus

cDNA – DNA complementar

CEE - Comunidade Econômica Européia

CESAN - Companhia Espírito Santense de Saneamento

cm – centímetro

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CT - Coliformes Termotolerantes

DEA – Departamento de Engenharia Ambiental

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucléico (Deoxyribonucleic Acid)

DNTP - Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

E. coli - Escherichia coli

ES - Espírito Santo

g - Grama

GPS – Sistema de Posicionamento Global

Ha - Hectare

Hg – Mercúrio

°C – grau Celsius

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INCAPER - Instituto Capixaba de Pesquisa, assistência técnica e extensão Rural.

kb – quilobase

Kg –quilograma

Km - quilômetro

L - Litro

LABSAN - Laboratório de Saneamento

LABHIDRO - Laboratório de hidráulica e monitoramento ambiental

LEMBIOTECH - Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia

M – Molar

mg – miligrama

min - minuto

mL - mililitro

mM - milimolar
MS – Ministério da Saúde
mS/cm - milisiemens por centímetro
 μL – microlitro
 μm – micrometro
 μM - micromolar
 μg – micrograma
n - número de amostras
nm - nanômetro
NMP - Número Mais Provável
NSP - Non Structural Protein
NoV - Norovírus
OMS - Organização Mundial da Saúde
ORF - Open Reading Frame
P1 – Ponto 1
P2 – Ponto 2
P3 – Ponto 3
pb – par de base
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
pH - Potencial Hidrogeniônico
PMV – Prefeitura Municipal de Vitória
PNSB - Pesquisa Nacional de Saneamento
RNA - *Ribonucleic Acid*
RT-PCR – *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*
RV - Rotavírus
s - segundo
SDT - Sólidos Dissolvidos Totais
t - Tonelada
TE – Tris/EDTA
TBE – Tris/Borato/EDTA
U - Unidade
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UFES - Universidade Federal do Espírito Santo
USEPA - United States Environmental Protection Agency

UV – Ultravioleta

V - Volt

VP - Viral Protein

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Saneamento básico no Brasil e seu impacto sobre a região costeira.....	20
3.2 O sistema estuarino e manguezal da Baía de Vitória.....	21
3.3 Micro-organismos e sua interação com o sedimento.....	24
3.4 Microrganismos Indicadores de contaminação fecal: Coliformes termotolerantes e <i>Enterococos</i>	27
3.5 Vírus Entéricos.....	29
3.5.1 Características Gerais.....	29
3.5.1.1 Adenovírus Humanos.....	31
3.5.1.1.1 Classificação e estrutura.....	31
3.5.1.1.2 Patogênese.....	32
3.5.1.2 Rotavírus.....	33
3.5.1.2.1 Classificação e estrutura.....	33
3.5.1.2.2 Patogênese.....	34
3.5.1.3 Norovírus.....	35
3.5.1.3.1 Classificação e estrutura.....	35
3.5.1.3.2 Patogênese.....	36
3.6. Métodos para detecção de partículas virais em matrizes ambientais.....	36
3.7 Legislação referente ao monitoramento de vírus entéricos na água e no sedimento.....	40
3.7.1 Água.....	40
3.7.2 Sedimento.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Descrição da Área de Estudo.....	43
4.2 Coleta das amostras.....	43

4.3 Armazenamento e transporte das amostras.....	46
4.4 Análises laboratoriais.....	46
4.4.1 Análises Físico-químicas das amostras de água.....	46
4.4.1.2 Análise granumométrica.....	47
4.4.2 Análises Microbiológicas das amostras de água e sedimento.....	47
4.4.2.1 Coliformes termotolerantes.....	47
4.4.2.2 Enterococos.....	48
4.4.3 Análises virais.....	52
4.4.3.1 Concentração das amostras de sedimento.....	52
4.4.3.2 Extração dos ácidos nucleicos.....	53
4.4.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	53
4.4.3.4 Amplificação do DNA pela PCR convencional e Nested PCR.....	54
4.4.3.5 Visualização dos produtos da Nested-PCR em gel de agarose.....	56
4.5 Controle de qualidade das análises bacteriologias, físico-químicas e virológicas.....	59
4.6 Análise estatística.....	59
5. RESULTADOS	61
5.1 Análises Físico-Químicas	61
5.2 Análises Bacteriológicas.....	70
5.3 Detecção viral.....	72
6. DISCUSSÃO	75
6.1 Avaliação dos fatores físico-químicos com respeito à presença de microrganismos indicadores em água e sedimento.....	75
6.2 Detecção de coliformes termotolerantes e enterococos nas amostras de água e sedimento do estuário.....	78
6.3 Detecção viral nas amostras de água e sedimento do estuário.....	82
7. CONCLUSÕES	89
8. RECOMENDAÇÕES	90
9. REFERÊNCIAS	91

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o ambiente costeiro vem sofrendo um considerável processo de degradação ambiental, gerado pela crescente pressão sobre os recursos naturais e pela capacidade limitada desses ecossistemas absorverem os impactos resultantes. A crescente ocupação das regiões costeiras e a formação de grandes centros urbanos têm gerado impactos ambientais decorrentes do despejo de esgoto, principalmente sem tratamento que contém organismos patogênicos.

A região da Ilha das Caieiras, na cidade de Vitória (ES) situa-se dentro de uma região estuarina na Baía de Vitória e encontra-se próxima a uma extensa área de manguezal. A população residente mantém relação de grande dependência com os recursos naturais oferecidos, pois, a utilizam como fonte de subsistência e lazer sendo que as atividades pesqueiras de caça e coleta de mariscos se destacam como a principal fonte de renda de muitas famílias da região já que existem restaurantes especializados em frutos do mar, atraindo pessoas de toda a Grande Vitória.

O manguezal da Ilha das Caieiras recebe esgoto *in natura* proveniente das áreas adjacentes, contaminando a água e os mariscos ali existentes, além disso, os microrganismos que são lançados juntamente com o esgoto no ambiente costeiro podem ser acumulados no sedimento. O sedimento tem se tornado uma das grandes preocupações ambientais, pois, pode atuar como um reservatório de elementos químicos, entretanto, também podem ser armazenados nesta matriz agentes patogênicos. Os vírus, por exemplo, quando associados à matéria particulada em suspensão ou nas matrizes sólidas dos sedimentos, tendem a permanecer viáveis por mais tempo do que se estivessem dispersos na água. Neste contexto, a avaliação da contaminação oriunda das atividades humanas sobre o sedimento torna-se fundamental para monitorar impactos sobre o ambiente. Assim, este trabalho visou pesquisar na água e no sedimento da área de manguezal do sistema estuarino da Baía de Vitória, bactérias indicadoras de poluição fecal pela técnica de membrana filtrante e vírus causadores de gastroenterites pela técnica molecular de nested-PCR.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Pesquisar vírus entéricos e bactérias indicadoras de contaminação fecal na água e no sedimento em área de manguezal da Baía de Vitória (ES).

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a presença de indicadores de poluição fecal (coliformes termotolerantes e enterococos) na água e no sedimento utilizando o método da membrana filtrante.
- Detectar vírus entéricos (adenovírus, rotavírus e norovírus) nas amostras de água e sedimento pelo método da PCR convencional.
- Correlacionar os parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, sólidos dissolvidos, oxigênio dissolvido, turbidez, salinidade, temperatura, sólidos voláteis, granulometria e pluviosidade) com a presença de vírus entéricos e indicadores microbiológicos na água e no sedimento.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Saneamento básico no Brasil e seu impacto sobre a região costeira

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), saneamento é o controle de todos os fatores do meio físico do homem, que exercem ou podem exercer efeitos nocivos sobre o bem estar físico, mental e social. A falta de saneamento básico leva ao surgimento de doenças de veiculação hídrica que são responsáveis por 4% das mortes anuais no mundo (FUNASA, 2004).

Apesar do aumento do número de pessoas com acesso à água e esgoto, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000), atualmente mais de 1,1 bilhão de pessoas em todo o mundo não têm acesso ao fornecimento de água tratada e estima-se que 2,4 bilhões de indivíduos não possuem acesso a serviços de saneamento adequado. No Brasil, dados obtidos pela pesquisa nacional de saneamento (PNSB) realizada pelo IBGE (2010) em 2008, demonstram que 55,2% dos municípios brasileiros tem serviço sanitário por rede coletora e apenas 28,5% dos municípios fazem tratamento de esgoto.

Nas últimas décadas, o crescimento populacional desordenado tem resultado num aumento dos problemas associados ao déficit de saneamento principalmente em regiões costeiras onde está concentrada a maior parte da população brasileira que faz uso dos recursos naturais desta área para subsistência e lazer. A construção de casas em áreas de alta sensibilidade ambiental tais como dunas e estuários, a falta de saneamento básico, junto com as atividades urbanas, degradam os ambientes naturais através do lançamento de esgoto domésticos poluição orgânica, e a consequente deposição de sedimentos e deterioração dos habitats naturais (GEO, 2002; RUFINO, 2002).

Uma das consequências geradas pelas condições inadequadas de saneamento é a morte de milhões de pessoas a cada ano de doenças diarreicas e, desses, 90% são crianças menores de um ano, principalmente em países em desenvolvimento. 88% das doenças diarreicas são atribuídas ao suprimento de águas de fontes inseguras, esgotamento sanitário e higiene inadequada (WHO, 2004).

A oferta de saneamento básico é fundamental em termos de qualidade de vida, pois sua ausência acarreta poluição dos recursos hídricos, principalmente nos ecossistemas costeiros trazendo prejuízo à saúde da população, principalmente o aumento da mortalidade infantil em decorrência do aumento de doenças, como a diarreia (IBGE, 2010).

A falta de esgotamento sanitário adequado nos ecossistemas de manguezais nas áreas costeiras é um problema já que no Brasil, 1/3 da população habita essa região e quase metade a menos de 200 quilômetros da costa (MMA, 2007). O Brasil possui cerca de 25.000km² de manguezais, sendo encontrados desde o Amapá (4°30'N) até Santa Catarina (28°53'S) ao longo de 92% da linha de costa, ou seja, aproximadamente 6.800 km, margeando estuários, lagunas e enseadas (SCHERER *et al.*, 2009).

3.2 O sistema estuarino e o manguezal da Baía de Vitória

O manguezal é um ecossistema costeiro característico de regiões tropicais e subtropicais e sujeito ao regime das marés. Ocorre em regiões litorâneas abrigadas como estuários, baías e lagunas, e apresenta condições propícias para alimentação, proteção e reprodução para muitas espécies animais, sendo considerado importante transformador de nutrientes em matéria orgânica e gerador de bens e serviços (SHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1995).

Os manguezais são encontrados em regiões tropicais e subtropicais do planeta, cobrindo uma área 18.107.700 ha dos quais 18,7% estão nas Américas (SPALDING; BLASCO; FIELD, 1997). No Brasil, os manguezais ocorrem em 92% da linha de costa, perfazendo 6.800 km de forma quase contínua, iniciando no extremo norte no Oiapoque, no Estado do Amapá, e se estendendo até Santa Catarina (SCHAEFFER-NOVELLI; CINTRON, 1990; SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

No Espírito Santo, os manguezais aparecem desde o extremo norte até o extremo sul do Estado, com grande concentração na Baía de Vitória (CARMO *et al.*, 1994).

A Baía de Vitória (figura 1) está localizada entre os municípios de Vitória, Vila Velha, Cariacica e Serra e entre as coordenadas 20°15'S – 40°22'W e 20°20'S – 40°16'W. O Canal da Passagem e a Baía do Espírito Santo interligam-se com a Baía de Vitória perfazendo o contorno da Ilha de Vitória (RIGO, 2004).

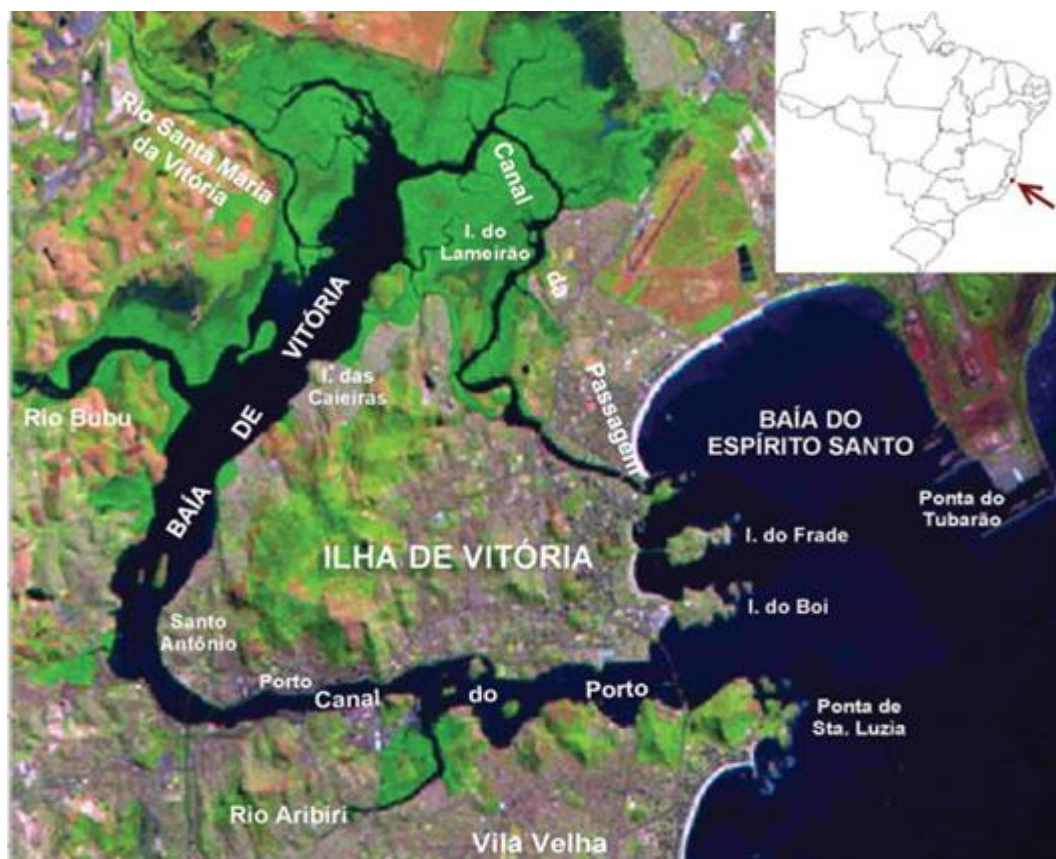


Figura 1: Localização do sistema estuarino composto pela Baía de Vitória e pela Baía do Espírito Santo. Fonte: VERONEZ *et al.*, 2009

A Baía de Vitória situa-se dentro de uma região estuarina compreendida por um conjunto de tributários de médio porte (rio Santa Maria da Vitória) e de pequeno porte (rios Bubu, Itanguá, Marinho e Aribiri) que, combinados com o aporte marinho, propiciaram a criação de ambientes típicos, como o manguezal, ocupando no passado quase todo o entorno da ilha.

Este ecossistema é afetado por condições físico-químicas interligadas, como correntes de água, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido e principalmente pela influência antrópica, como lançamento de efluentes, invasões, aterros,

disposição de lixo urbano e exploração predatória de seus recursos naturais (SHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1995).

Em relação à flora, há relatos de ocorrência de quatro gêneros dominantes no Brasil, sendo eles *Rhizophora*, *Avicennia*, *Laguncularia* e *Conocarpus*. Esses gêneros se distribuem ao longo do manguezal sob influência da salinidade e frequência das inundações, sendo necessárias adaptações morfológicas e fisiológicas para a estabilização e desenvolvimento do mangue (SCHAEFFER-NOVELLI; CINTRON, 1990). O mangue de Vitória é constituído, predominantemente por *R. mangle*, *L. racemosa* e *A. schaueleriana*, (CARMO, 1987).

Rhizophora (mangue vermelho) é dos gêneros menos tolerantes à presença de sal, desenvolvendo-se melhor em regiões onde a água intersticial apresenta concentrações menores que 50‰; *Avicennia* (mangue preto, siribeira, siriúba) é dos gêneros mais tolerantes, sobrevivendo em locais aonde a água intersticial chega de 65 a 90‰ de sal na água; o gênero *Laguncularia* (mangue tinteira) apresenta tolerância intermediária quando comparado aos anteriores (FERNANDES & PERIA, 1995).

A fauna local é representada por espécies de valor econômico, destacando-se os moluscos bivalves, como as ostras, crustáceos, como os caranguejos e siris, além de peixes em número elevado quando considerados os resultados das capturas em regiões estuarinas e costeiras (SHAEFFER-NOVELLI, 1987).

O sistema estuarino da Ilha de Vitória tem sofrido ao longo de várias décadas uma forte degradação ambiental, por ocupação populacional de seu entorno, aterros, implantação de indústrias, atividades portuárias e, principalmente, devido ao lançamento de esgotos, a maioria deles *in natura*. Além do município de Vitória, a Baía de Vitória recebe também contribuições antrópicas de outros três municípios circunvizinhos Vila Velha, Cariacica e Serra (JESUS, 2004).

O despejo de esgotos sanitários é uma das formas mais comuns de poluição das áreas costeiras e a população que reside nas áreas adjacentes que estão contaminadas é afetada, já que muitos indivíduos utilizam este ambiente como sua

fonte de subsistência e lazer. Além disso, os contaminantes lançados juntamente com o esgoto podem acumular-se no sedimento, incluindo bactérias e vírus patogênicos, que acarretam em risco à saúde (LEES, 2000; MUNIAN-MUJIKÁ; GIRONES; LUCENA, 2000).

3.3 Microrganismos e sua interação com o sedimento

Os sedimentos são sistemas formados de componentes vivos e não vivos (figura 2). Os componentes vivos abrangem raízes de plantas, bem como populações de microrganismos e animais. A porção não viva inclui água, matéria orgânica, fragmentos de rocha de tamanhos variados, desde partículas grandes como a areia até os menores como a argila (VORONEY, 2007).

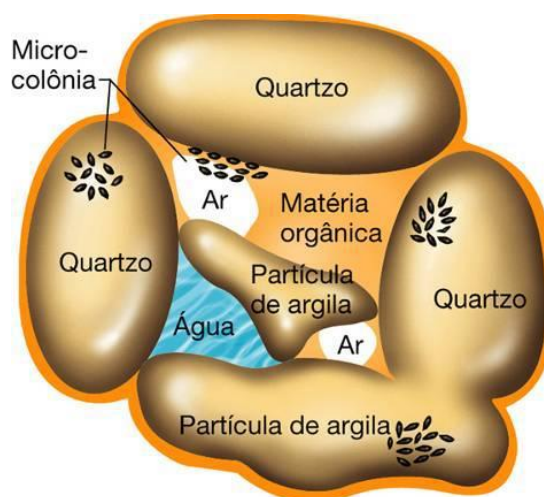


Figura 2: Organização dos componentes orgânicos e inorgânicos do solo (adaptado de PURVES *et al.*, 2002)

A estrutura dos solos modifica-se com a profundidade, revelando um perfil de solo. Três horizontes principais (A, B e C) são reconhecidos em um perfil de solo típico. O horizonte A é a camada superior do solo de onde podem ser retirados nutrientes minerais por lixiviação. A maior parte da matéria orgânica do solo localiza-se no horizonte A, onde está a maioria dos organismos vivos. O horizonte B ou subsolo é a zona de infiltração e de acumulação dos materiais provenientes do horizonte superior, o horizonte C é a rocha mãe original, da qual deriva o solo (VORONEY,

2007). Nos manguezais não há um perfil de solo típico, podendo apresentar perfis diversos (ALONGI, 2009).

Os sedimentos estuarinos possuem características variáveis devidos às suas diferentes origens, geralmente, têm muita matéria orgânica e alto conteúdo de sal, são pouco consistentes e possuem cor cinza escuro (FERNANDES & PERIA, 1995). Os sedimentos da Baía de Vitória, em geral, são compostos de areia lamosa e lama, com presença de conchas e carapaças de organismos associados às frações mais grossas e/ou cascalhosas, porém no estudo realizado por D'Agostini (2005), na Baía de Vitória, o sedimento foi classificado como: lama, lama arenosa, areia lamosa, areia fina a muito fina, areia média e areia muito grossa a grossa (Figura 3).

Segundo estudo feito por D'Agostini (2005), a região que se encontra na desembocadura do rio Santa Maria da Vitória apresenta predominantemente areia lamosa e areia pouco cascalhosa que pode ser explicada pela presença de moluscos bivalves que vivem enterrados em sedimentos lamosos e devido ao fluxo do próprio rio. Este aumento na granulometria deve-se, principalmente, a maior competência deste rio, considerado de médio porte, em transportar sedimentos de maior granulometria. A região no delta do rio Bubu, este, que é considerado de pequeno porte, transporta sedimentos finos devido a sua baixa hidrodinâmica.

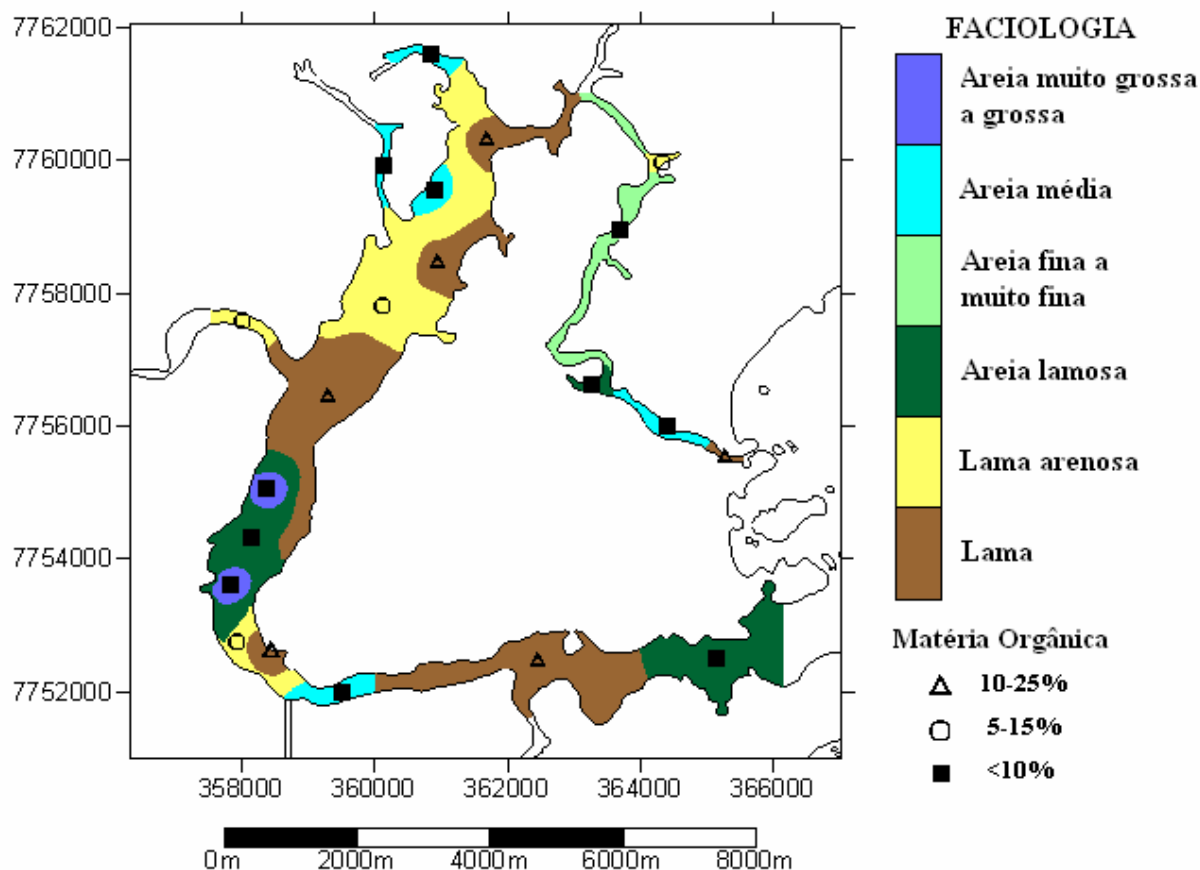


Figura 3 - Mapa faciológico dos sedimentos superficiais da Baía de Vitória/ES

Fonte: D'AGOSTINI, 2005.

Os sedimentos têm sido considerados como um compartimento de acumulação de espécies poluentes a partir da coluna d'água, devido às altas capacidades de adsorção e acumulação associadas, onde as concentrações tornam-se várias ordens de grandeza maiores do que nas águas correspondentes, possibilitando o uso dos mesmos como um bom indicador de poluição ambiental, tanto atual como remota (através da estratificação), possibilitando ainda o conhecimento das principais fontes de poluição dentro de um determinado sistema aquático. Contudo, diversos processos bióticos e abióticos podem remobilizar tais espécies, constituindo-se em fontes de poluição secundárias, afetando a qualidade da água e originando bioacumulação. Em consequência, a contaminação de sedimentos é um importante problema ambiental em todo mundo (JESUS *et al.*, 2004).

O contato com o sedimento seja direta ou indiretamente através de alimentos ou água e ar pode contribuir para a propagação de doenças já que o sedimento é um reservatório de poluentes (SANTAMARIA; TORANZOS, 2003).

A presença de patógenos microbianos em águas poluídas representa um fator de risco considerável para a saúde pública em geral, levando a surtos de doenças de veiculação hídrica e uma alta incidência de morbidade e mortalidade, principalmente em países em desenvolvimento. Os principais patógenos que comumente ocorrem na água e no esgoto são os vírus, as bactérias, os protozoários e os helmintos, sendo que a maioria destes patógenos entéricos é excretada junto ao material fecal, contaminando o meio ambiente (SUBEKTI *et al.*, 2002; TOZE, 1999).

As bactérias do grupo coliformes termotolerantes e enterococos fecais são largamente utilizados como indicadores de contaminação fecal da água por humanos e outros animais homeotermos (BORDALO, 1993).

3.4 Microrganismos Indicadores de contaminação fecal: Coliformes termotolerantes e *Enterococos*

Os bioindicadores são espécies ou grupos de espécies, nas quais a presença, quantidade e distribuição apontam os níveis dos impactos ambientais em um ecossistema aquático possibilitando assim uma avaliação dos efeitos ecológicos causados por múltiplas fontes de poluição (CALLISTO; GONÇALVES; MORENO 2005).

Para um microrganismo ser considerado um bioindicador ideal, são necessários algumas características, como: ter como habitat exclusivo o trato intestinal do homem e de outros animais; ocorrer em número elevado nas fezes; estar presente quando houver a presença de um possível microrganismo patogênico; apresentar alta resistência ao ambiente aquático; serem estáveis; ser detectado através de técnicas rápidas, simples e precisas (PRESCOTT, *et al.*, 1996; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

A presença de microrganismos patogênicos na água geralmente é decorrente da poluição por fezes humanas e de animais, provenientes de águas residuárias urbanas e rurais (GONZALEZ; TAYLOR; ALFARO,1982). Considerando que a maioria dos agentes patogênicos de veiculação hídrica tem em comum sua origem nas fezes de indivíduos doentes, uma condição para a avaliação da qualidade microbiológica da água é o exame de indicadores de contaminação fecal (AMARAL *et al.*, 2003). Os microrganismos indicadores mais utilizados são os coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e os enterococos (ORTEGA *et al.*, 2009).

Coliformes termotolerantes são bactérias caracterizadas pela presença da enzima β -galactosidase e pela capacidade de fermentar a lactose com produção de gás no prazo de 24 horas a 44,5°C. *Escherichia coli* e algumas linhagens de *Klebsiella* e *Enterobacter* apresentam esta característica de termotolerância, porém, somente *E. coli* tem como habitat primário o intestino humano e de animais (CONAMA, 2005).

Coliformes termotolerantes como a *Escherichia coli* têm sido utilizados como indicadores da qualidade sanitária dos alimentos, sedimentos e águas destinadas ao consumo humano, agricultura, indústria e recreação (PITTA, 2002; LANDGRAF, 2005).

Outro grupo utilizado como indicador de contaminação são os enterococos. Essas bactérias do grupo dos estreptococos fecais pertencentes ao gênero *Enterococcus*, caracterizam-se pela alta tolerância às condições adversas, como capacidade de sobreviverem na presença de sal, em pH 9,6 e em ampla faixa de temperatura, de 10°C a 45°C. A maioria das espécies de enterococos é de origem fecal humana, embora possam ser isolados de fezes de animais (CONAMA N° 274, 2000). Destacam-se por indicarem contaminação ambiental devido a sua resistência ambiental, além disso, sua presença evidencia inadequação das práticas sanitárias (LANDGRAF, 2005). Além disso, Enterococos têm sido isolados de águas recreacionais e a presença destes microrganismos sugere riscos à saúde por meio do contato corporal, ingestão ou inalação, e têm sido propostos como indicadores de qualidade para as águas complementares aos coliformes (CLESCERI; GREENBERG; EATON, 1998).

Os parâmetros bacterianos nem sempre indicam a presença de patógenos no ambiente, sendo, portanto, a detecção de vírus no ambiente recomendada, pois as bactérias indicadoras, normalmente utilizadas para esta finalidade, nem sempre podem ser relacionadas com a presença dos vírus, que também são mais persistentes e estáveis do que bactérias (PINA *et al.*, 1998; LEES, 2000).

Um estudo realizado na Ilha das Caieiras, situada na Baía de Vitória por Justino (2009), foi observado altos índices de contaminação por coliformes termotolerantes em diferentes pontos do estuário. Além disso, foram encontrados em alguns pontos de coleta do estuário três diferentes vírus entéricos: adenovírus, rotavírus e norovírus.

Vírus entéricos podem estar presentes naturalmente no ambiente aquático sendo mais comumente introduzidos através de atividades humanas, escoamento urbano e no caso de estuários lançamento de esgotos (FONG & LIPP, 2005). Uma vez introduzidos em águas costeiras, os vírus entéricos tendem a associar-se a matéria particulada e acumular na camada superior do sedimento marinho, assim, tornando-se mais concentrado no sedimento que na coluna d'água. (GERBA, *et al.*; 1977; SOBSEY *et al.*; 1980).

3.5 Vírus Entéricos

3.5.1 Características Gerais

São denominados vírus entéricos todos os grupos de vírus que estão presentes no trato gastrointestinal humano e que, após transmissão por via fecal-oral, podem causar infecções ou enfermidades em indivíduos susceptíveis (WYN-JONES & SELLWOOD, 2001).

Há aproximadamente 150 tipos de vírus entéricos humanos conhecidos que entram em contato com o corpo humano pela via oral, multiplicam no trato gastrointestinal e são excretados em grande número nas fezes de indivíduos infectados (sintomáticos e assintomáticos) alcançando números em torno de 10^5 - 10^{13} partículas virais por gramas de fezes (FONG & LIPP, 2005; BOSCH *et al.*, 2008).

A presença de vírus no esgoto está diretamente relacionada aos vírus que são excretados pela população no momento. Uma vez liberados e introduzidos no meio ambiente os vírus podem contaminar sistemas de fornecimento de água, águas recreacionais, águas estuarinas, alimentos, como moluscos bivalves, crustáceos, frutas e vegetais, além de solos e fômites (Figura 4) (RAO & MELNICK, 1986; FONG; LIPP, 2005).

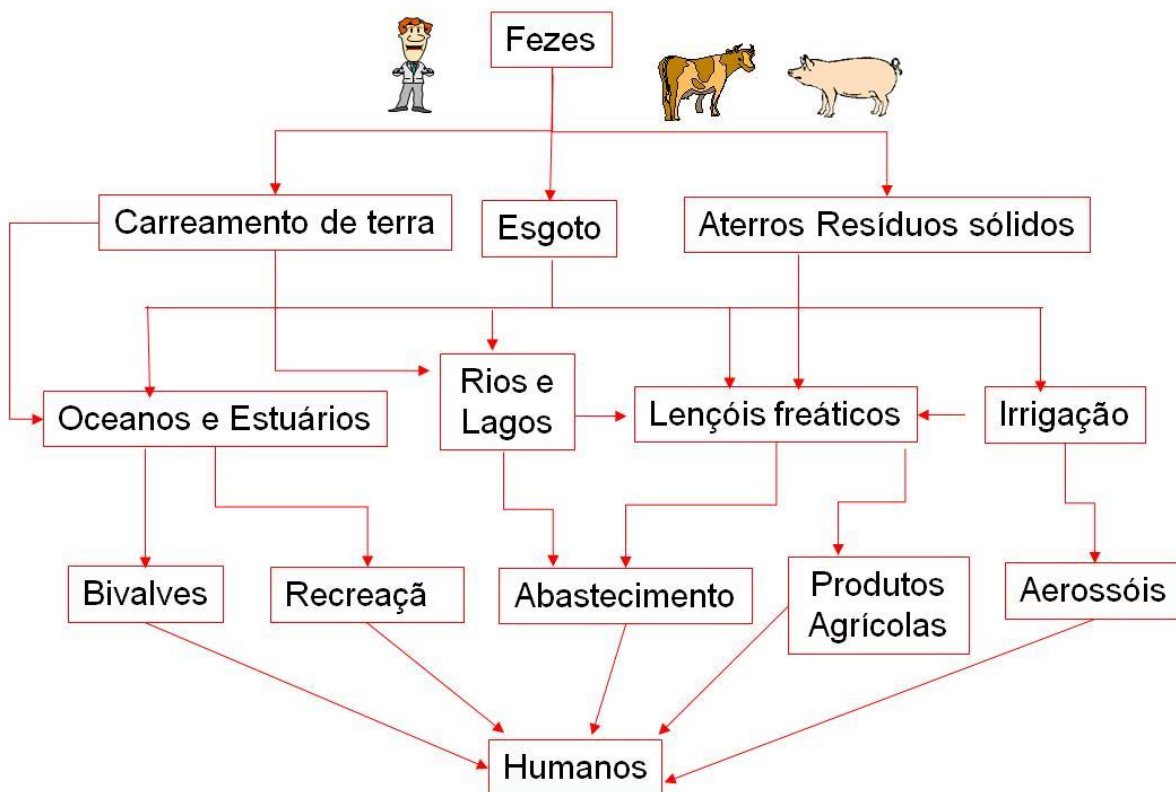


Figura 4: Rotas de transmissão de vírus entéricos. Fonte: METCALF *et al.*;1995.

Os vírus entéricos são resistentes no ambiente o que favorece sua transmissão por contato pessoa a pessoa, a rota zoonótica ou transmissão por algum objeto (KOOPMANS *et al.*, 2002; BOSCH *et al.*, 2008).

A estabilidade dos vírus depende de alguns fatores ambientais como temperatura, radiação solar, adsorção, pH, matéria orgânica e microbiota. A adsorção de vírus no sedimento possibilita o prolongamento da infectividade dos vírus no ambiente (REYNOLDS & PEPPER, 2000; AZADPOUR-KEELEY *et al.*, 2003). São

encontrados durante todas as estações do ano e não são removidos pelos tratamentos de água e esgoto atuais (BOSCH, 1998).

Os vírus entéricos encontram-se largamente disseminados no mundo e são responsáveis por diversas doenças que afetam o ser humano, tais como gastroenterites, meningites, miocardites e hepatites infecciosas sendo os mais importantes os norovírus, rotavírus, adenovírus, astrovírus, enterovírus e os vírus da hepatite A e E que são transmitidos por diferentes vias ao homem (LEES, 2000). A seguir, serão apresentadas as principais características dos vírus adenovírus, rotavírus e norovírus.

3.5.1.1 Adenovírus Humanos

3.5.1.1.1 Classificação e estrutura

De acordo com o comitê internacional de taxinomia viral ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses), os adenovírus pertencem à família *Adenoviridae* que é dividida em quatro gêneros: *Mastadenovirus*, constituído por vírus que infectam mamíferos; *Aviadenovirus*, constituído por vírus que infectam somente aves; *Siadenovirus*, que infectam aves, anfíbios e peixes e *Atadenovirus*, constituído por vírus que infectam ruminantes, aves e marsupiais (DAVISON *et al.*, 2003).

Os adenovírus humanos (HAdV) pertencem ao gênero *Mastadenovirus* e são conhecidos 51 sorotipos, distribuídos em seis espécies (de A a F) de acordo com suas características antigênicas, morfológicas e moleculares (ICTVdB, 2006).

Os HAdVs têm habilidade de infectar uma vasta gama de tecidos sendo identificados como agentes etiológicos de diversas patologias como por exemplo: síndromes respiratórias, ceratoconjuntivites, infecções entéricas e renais (CARTER, 2005).

Os adenovírus são vírus não envelopados, de simetria icosaédrica com 70 a 100 de diâmetro, o genoma é composto por fita dupla de DNA, são constituídos por 11 proteínas, denominadas polipetídeos II, III, IIIa, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X e TP. Destas 11 proteínas, 7 estão presentes no capsídeo viral (II, III, IV, IIIa, VIII e IX) e 4 associadas a molécula de DNA, dupla fita, no core viral (V, VII, X, TP) (Figura 5). O

capsídeo é constituído de 252 capsômeros, sendo 240 do tipo *hexon* (polipeptídeo II) que formam as 20 faces triangulares do icosaedro e 12 do tipo *penton* (polipeptídeo III) que formam os vértices do icosaedro (VELLINGA *et al.*, 2005).

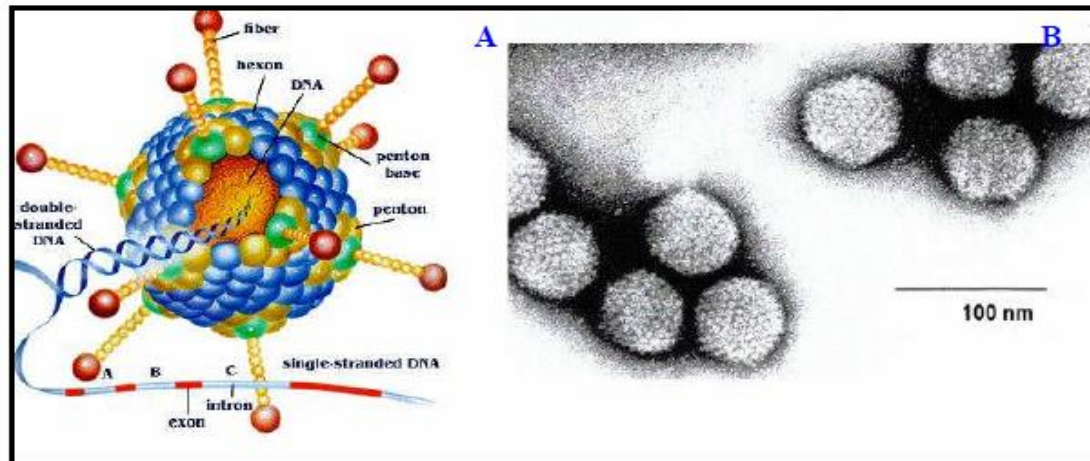


Figura 5: Esquema de uma partícula de adenovírus (A) e micrografia eletrônica mostrando os vírus formando agrupamentos (B).

3.5.1.1.2 Patogênese

Os adenovírus humanos estão associados a diferentes doenças, em adultos e crianças, como: doenças respiratórias, gastroentéricas, urinária e oculares. Esses vírus têm sido associados a infecções generalizadas em pacientes imunocomprometidos como transplantados (KOJAOGHLANIAN *et al.*, 2003; GONÇALVES & DE VRIES, 2006). São transmitidos por contato direto pessoa a pessoa, por via respiratória ou via fecal-oral, através do contato com água ou alimentos contaminados. Várias espécies de adenovírus podem ser excretadas nas fezes, porém apenas os sorotipos da espécie F, HAdv-40 e HAdv-41, são responsáveis pelos casos de gastroenterite aguda causadas por adenovírus (HORWITZ, 1996; JIANG, 2006).

Os adenovírus humanos são a terceira maior causa de gastroenterite infantil após rotavírus e norovírus (ITURRIZA-GOMARA *et al.*, 2004). Muitas amostras positivas de AdV têm sido encontradas em crianças assintomáticas, demonstrando que durante surtos e epidemias, as crianças acabam servindo de reservatório, liberando

o vírus e transmitindo a doença, embora não a desenvolvam (GOMES, 2011). Acometem pessoas de todas as idades sendo mais frequentes em crianças menores de 4 anos de idade, sendo que o período de incubação pode durar de 3 a 10 dias e dentre os sintomas estão a febre, diarreia, vômito e dor abdominal (ROBINSON, ECHAVARRIA, 2007).

3.5.1.2 Rotavírus

3.5.1.1.1 Classificação e estrutura

Os rotavírus pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, são vírus não envelopados, com diâmetro de aproximadamente 70 a 80nm com capsídeo de simetria icosaédrica e genoma dividido em 11 segmentos de RNA dupla fita. As proteínas sintetizadas são de dois tipos: as estruturais (VP) que compõem o vírus, e as não estruturais (NSP), sintetizadas dentro das células infectadas (GLASS, 2006).

Estruturalmente a partícula dos RV é formada por um capsídeo externo, capsídeo intermediário e capsídeo interno. O capsídeo interno é constituído pelas proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3, associadas ao RNA dupla fita do RV. O capsídeo intermediário é formado pela VP6 e o capsídeo externo pelas VP7 e VP4 (figura 6) (JAYARAM *et al.*, 2004; SHAW, 2006).

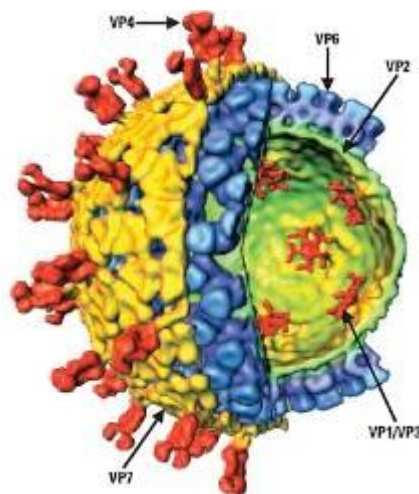


Figura 6: Visualização tridimensional da partícula de rotavírus e a localização de proteínas. Fonte: <<http://www.iavireport.org/Issues/Issue10-5/Figure2.jpg>>

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV International Comitê on Taxonomy of Viruses), os RV possuem 7 grupos designados como A, B, C, D, E, F e G. Os humanos são infetados principalmente pelos grupos A, B e C, de modo que o grupo A é significativamente o mais patogênico (GRAFF, *et al.*, 2007). Grupos D-G têm sido encontrados somente em animais e pássaros (PALOMBO; BISHOP, 2011). Os RV-A possuem maior importância para saúde pública, pois são a causa majoritária de diarreia aguda e morte em crianças de todo mundo (ARNOLD & PATTON, 2009).

3.5.1.1.2 Patogênese

O rotavírus é considerado o mais importante agente etiológico de diarreia grave na infância, no mundo. Estima-se que, a cada ano, ocorram 125 milhões de quadros diarreicos associados a esses vírus, do que resultam, 418.000 a 520.000 óbitos, 85% dos quais nas regiões menos desenvolvidas do planeta (MCANN, *et al.*, 2000).

Os rotavírus são importantes agentes causadores de diarreia severa no mundo principalmente em crianças sendo sua transmissão fecal-oral (alta excreção nas fezes), por água ou alimentos, por contato pessoa a pessoa e objetos contaminados. (PARASHAR *et al.*, 2006). Infecções assintomáticas têm sido relatadas, geralmente associadas a indivíduos que vivem em comunidades fechadas como creches, escolas, casas de repouso e hospitais funcionando como possíveis locais de infecção (LINHARES *et al.*, 1981). A sazonalidade das infecções, estendendo-se desde o outono até a primavera, é observada nos países de clima temperado. Nas regiões tropicais as infecções ocorrem o ano todo.

O período de incubação dos RV é relativamente curto, varia de um a três dias com início abrupto, vômitos em mais de 50% dos casos, febre alta e diarreia profusa, culminando em grande parte dos casos com desidratação. O elevado potencial disseminador e a grande variedade de cepas circulantes do rotavírus, favorecidos por fatores como o clima, conglomerados urbanos de alta densidade populacional, convivência em creches e outros ambientes fechados, mostram que, além das medidas tradicionais de higiene e de saneamento básico para sua prevenção, o

desenvolvimento de vacinas anti RVA para prevenção de gastroenterite grave. (LOURENÇO *et al.*, 1985; LEES, 2000).

Em Julho de 2009, a Organização Mundial da Saúde (WHO) recomendou a introdução de vacinas de rotavírus no programa nacional de imunização em todos os países ao redor do mundo. A introdução da vacina em alguns países da América Latina, América do Norte, Europa e Austrália reduziu significativamente o número de casos de diarreia e de morte nestes países.

3.5.1.3 Norovírus

3.5.1.3.1 Classificação e estrutura

A partícula viral de norovírus também denominada como *Norwalk vírus* foi descoberta em amostras fecais humanas em um surto de gastroenterite na cidade de Norwalk, Ohio. São vírus não envelopados, pequenos de aproximadamente 27-40 nm de diâmetro, fita simples, de polaridade positiva e esféricos de simetria icosaédrica (Figura 7) (ATMAR, 2010).

O genoma consiste de fita simples de RNA organizada em 3 ORFs (ORF 1-3) no qual ORF1 codifica proteínas não estruturais, ORF2 codifica a principal proteína estrutural (VP1) e a ORF3 codifica uma proteína estrutural pequena do capsídeo associada à estabilidade de VP1 menos abundante, VP2. (ATMAR; ESTES, 2006; KARST, 2010).

Com base na organização do genoma, os norovírus pertencem a família *Caliciviridae*, gênero *Norovirus*. São classificados em 5 genogrupos (GI-GV), baseados na diversidade da sequência dos aminoácidos da VP1, que constitui a proteína estrutural mais abundante do capsídeo. Estes genogrupos já foram identificados em diversos hospedeiros, entre eles suínos (GII), bovinos (GIII), caninos e felinos (GIV) e murinos (GV). Em humanos, apenas os genogrupos GI, GII e GIV foram identificados como capazes de causar infecção (CDC, 2011).

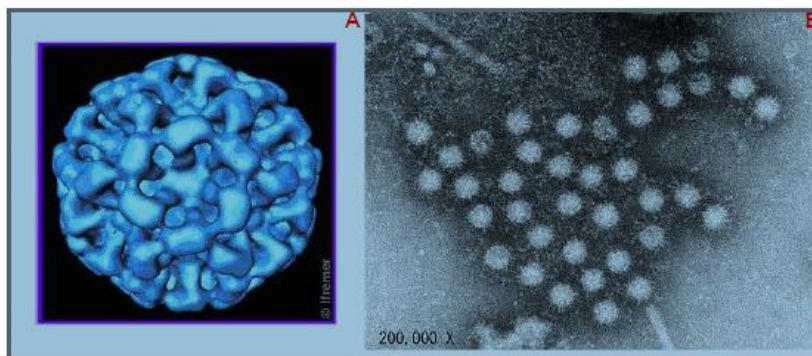


Figura 7: Esquema de uma partícula de norovírus (A) e micografia eletrônica (B).

Fontes: <http://www.pyroenergen.com/articles/images/norwalk-virus.jpg>

3.5.1.3.2 Patogênese

O norovírus é o principal agente responsável por surtos de gastroenterites virais agudas e diarreia esporádica em todo o mundo, vírus debilitante que causa surtos repentinos de gastroenterites que geralmente é auto-limitada e os sintomas desaparecem em quatro a seis dias acometendo crianças e adultos. O norovírus, quando presente na célula hospedeira provoca lesões na mucosa do intestino delgado. Infecções assintomáticas são frequentes e podem contribuir com a disseminação da infecção (KOOPMANS; DUIZIER, 2004). O período de incubação varia entre 24 a 48 horas e geralmente a gastroenterite é auto-limitada e os sintomas são resolvidos em quatro a seis dias (MATTNER *et al.*, 2006; HARRIS *et al.*, 2008).

Os norovirus são contagiosos, podendo ocorrer em casos esporádicos ou em grandes surtos de diarreia aguda em enfermarias, hospitais, escolas, universidades, acampamentos, cruzeiros, hotéis e restaurantes (GALLIMORE *et al.*, 2005; KUMAZAKI, USUKU; NOGUSHI, 2007).

3.6. MÉTODOS DE PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS EM MATRIZES AMBIENTAIS

O controle da contaminação de vírus no ambiente é um processo complexo, pois estes se encontram dispersos em grandes volumes de água, adsorvidos a biosólidos ou em outros tipos de amostras ambientais. Além da baixa concentração, a

qualidade da amostra ambiental a ser analisada também é um fator negativo devido à frequente presença de inibidores de reações enzimáticas.

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares a partir da década de 80 foi possível uma melhor detecção de patógenos virais não apenas nas fezes, mas também circundantes no meio ambiente já que muitos estão em concentrações abaixo dos limites das outras técnicas (AZARDPOUR; FAULKNER; CHEN, 2003).

A detecção dos vírus em amostras ambientais depende de métodos que sejam capazes de detectar pequenas quantidades de partículas virais em diferentes matrizes ambientais. Um eficiente método de concentração deve apresentar os seguintes critérios: ser uma técnica simples, possuir alta taxa de recuperação de partículas virais, produzir um concentrado de pequeno volume e não ser muito caro (BOSH, 1998). A tabela 1 mostra alguns estudos realizados após o desenvolvimento das técnicas moleculares para a detecção de patógenos virais na água.

Tabela 1: Detecção de vírus entéricos em amostras de água observada por diferentes autores.

PINA et al. (1998) Espanha	Água fluvial	AdV em 65% das amostras
CHAPRON <i>et al.</i> (2000) Espanha	Água de superfície	AdV em 48,3% das amostras
KATAYAMA et al.(2002) Japão	Água marinha	NoV em 25% das amostras
JIANG & CHU (2004) Estados Unidos	Água fluvial	AdV em 52% das amostras analisadas.
KITTIGUL et al. (2005) Tailândia	Água fluvial	RV em 20% das amostras
MIAGOSTOVICH et al.(2008) Brasil	Água fluvial	AdV em 30,8% das amostras, RV em 44,2% e NoV em 5,8%.
JUSTINO et al.(2009) Brasil	Água estuarina	AdV em 76,2% das amostras, RV em 88,1% e NoV GII em 4,8%.
HAMZA et al. (2009) Alemanha	Água fluvial	97,5% de amostras positivas para AdV, 90% para RV e 31,7% para NoV.
LOSS et al.(2012) Brasil	Água estuarina	AdV em 8,33% das amostras, RV em 23,61% e NoV GII em 25%.
STAGGEMEIER et al.(2012) Brasil	Água fluvial	AdV em 87,3% das amostras, RV em 25,5%

Já a detecção de vírus em amostras de sedimento iniciou-se na década de 70, pois o sedimento tem sido apontado como um reservatório de patógenos (ALM *et al.*, 2003) onde diferentes patógenos virais tem sido detectados, como os EV (GERBA *et al.*, 1977), vírus da hepatite A (LE GUYADER *et al.*, 1994) e rotavírus (GREEN & LEWIS *et al.*, 1999). A agregação de partículas virais nas matrizes de solo depende da espécie de vírus, pH, salinidade, e humidade (GERBA *et al.*, 1988), e tem sido sugerido que as diferenças na carga da superfície das partículas virais têm

um papel importante na adsorção do vírus a sólidos (GERBA *et al.*, 1984; NASSER *et al.*, 2002).

A utilização de técnicas moleculares, particularmente o da reação em cadeia da polimerase (PCR), tem permitido novos avanços na detecção e controle de vírus entéricos no meio ambiente. No entanto, uma desvantagem é a suscetibilidade do ensaio aos inibidores (cátions, ácidos húmicos e metais) comumente encontrados em ambientes aquáticos (FONG & LIPP, 2005). Além disso, a PCR convencional não permite a distinção entre partículas virais viáveis de partículas não infecciosas nas amostras analisadas somente a cultura em células (TAVARES *et al.*, 2005).

Algumas variações da técnica de PCR qualitativa têm sido empregadas para detectar vírus em análises ambientais e clínicas. A *nested* PCR é uma das mais empregadas para detecção de vírus entéricos em amostras ambientais, aumentando a sensibilidade da reação, por introduzir uma etapa extra de amplificação gênica (PUIG *et al.*, 1994; RIGOTTO *et al.*, 2005). Os métodos de quantificação de viral, tal como PCR quantitativo ou em tempo real, têm sido cada vez mais utilizados. Esta técnica possui alta sensibilidade para a detecção rápida e quantificação precisa de microrganismos patogênicos em amostras clínicas e ambientais (ALBINANA-GIMENEZ *et al.*, 2009; BROOKS; GERSBERG; DHAR, 2005).

Métodos de concentração e detecção de vírus em amostras ambientais ainda apresentam muitas divergências, sendo assim, é de grande importância que o aperfeiçoamento das técnicas continue sendo desenvolvido de modo que permita a detecção adequada de patógenos virais. Cada vez mais se almeja um protocolo que seja simples, eficiente, acessível e que esteja em conformidade com a legislação específica para ser utilizado na rotina da análise virológica ambiental.

3.7 Legislação referente ao monitoramento de vírus entéricos na água e no sedimento

3.7.1 Água

As águas de ecossistemas costeiros necessitam de regulamentação, pois são alvos de degradação ambiental, principalmente pelo lançamento de resíduos líquidos e sólidos diretamente ou indiretamente pelos rios contaminados que ali deságuam. Assim, visando garantir a qualidade da água desses ambientes para os diversos usos pela população, foi instituída no Brasil a resolução CONAMA 430/2011, antiga resolução 357/2005 do Ministério do Meio Ambiente (MMA), que 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. De acordo com a resolução ambiental, pode-se utilizar a *E. coli* em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão competente.

Considerando as águas que são destinadas à recreação, a resolução CONAMA 274/2000 dispõe sobre a qualidade requerida para balneabilidade (recreação de contato primário). Nesta resolução, a água tem sua condição avaliada nas categorias própria e imprópria. As águas consideradas próprias poderão ser subdivididas nas categorias: Excelente, Muito Boa e satisfatória quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver, no máximo, os valores estabelecidos pela legislação para coliformes termotolerantes, *E. coli* ou enterococos, sendo que quando for utilizado mais de um indicador microbiológico, as águas terão as suas condições avaliadas de acordo com o critério mais restritivo (BRASIL, 2000). As águas serão classificadas como impróprias, quando, entre outras determinações, o valor obtido na última amostragem for superior aos valores estabelecidos, sendo recomendada a pesquisa de organismos patogênicos.

A legislação brasileira sobre qualidade da água destinada ao consumo humano apresenta a Portaria Federal do Ministério da Saúde nº 2914 de 2011 que substituiu a Portaria Federal do Ministério da Saúde nº 518 de 2004, que dispõe sobre os

procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, manteve a recomendação no Art. 29º da inclusão do monitoramento de vírus entéricos no(s) ponto(s) de captação de água proveniente(s) de manancial(is) superficial(is) de abastecimento, com o objetivo de subsidiar estudos de avaliação de risco microbiológico, porém não define parâmetros aplicáveis a estes patógenos. Já a resolução nº357 do CONAMA nem os cita em suas regulamentações (LUZ, *et al.*, 2012).

As autoridades governamentais européias incluíram nos padrões microbiológicos utilizados na avaliação da qualidade da água a pesquisa de EV como indicadores virológicos, além dos indicadores bacterianos (MEHNERT *et al.*, 2001). Nos EUA em 1996, a USEPA estabeleceu um programa amplo de monitoramento para protozoários patogênicos e vírus em todos os sistemas que abasteciam comunidades com mais de 100000 habitantes (USEPA, 1996).

Na Europa, a Diretiva 2006/7/CE, estabelece as concentrações bacteriológicas permitidas para águas de recreação de contato primário (CEE, 2006). A norma européia, assim como a legislação brasileira, estabelece classes de qualidade da água e adota mais de um parâmetro para cada uma delas (tabela 1). Os valores para as contagens microbiológicas baseiam-se no conjunto de dados recolhidos sobre a qualidade das águas balneares para o último período de avaliação, devendo consistir sempre em, pelo menos, 16 amostras.

Já a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA-*United States Environmental Protection Agency*) recomenda usar *Escherichia coli* e *Enterococci* para avaliar a qualidade da água de água doce e salina, respectivamente (USEPA, 2003). O limite estabelecido pela norma americana para águas marinhas (tabela 1), baseia-se na média geométrica de um número de amostras estatisticamente suficiente, geralmente não menos do que 5 amostras igualmente espaçadas por um período de 30 dias.

Resumo dos parâmetros microbiológicos e dos valores adotados pelas legislações citadas anteriormente pode ser visualizada na tabela 1.

Tabela 1: Normas relativas aos limites microbiológicos para avaliação de águas recreacionais.

Normas	Especificações		
	CT	<i>E.coli</i> /100ml	Enterococos/100ml
CONAMA 357/2005	< 1000 (p80)	< 1000 (p80)	NA
CONAMA 274/2000	p (80) Excelente < 250 Muito Boa < 500 Satisfatória < 1000 Imprópria < 2500	p (80) < 200 < 400 < 800 < 2000	p (80) < 25 < 50 < 100 < 400
USEPA 1986	NA	NA	NA
Diretiva 2006/7/CE	Excelente < 250 Bom < 500 (p90) Suficiente < 500 (p95)	NA	NA

CT- coliformes termotolerantes; NA – Não aplicável; p – percentil

No Brasil, a portaria do Ministério da Saúde nº 2914/2011, estabeleceu que o monitoramento viral em águas ambientais devesse ser realizado em casos de surtos de doença diarreica aguda ou outro agravo de transmissão fecal-oral, entretanto, há uma recomendação no Art. 29º para a inclusão de monitoramento de vírus entéricos nos pontos de captação de água provenientes de mananciais superficiais de abastecimento, com o objetivo de subsidiar estudos de avaliação de risco microbiológico.

3.7.2 Sedimento

Atualmente não existe legislação brasileira que leve em conta o monitoramento bacteriológico e nem virológico de sedimentos de regiões entre-marés. Entretanto, considerando que estas áreas são intensivamente utilizadas para trabalho (cultivos de ostras, atividades de pesca, pintura de barcos, entre outros) e lazer, há uma necessidade do monitoramento contínuo da região e adequação da legislação 274/2000 do CONAMA inserindo análises microbiológicas em sedimentos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Descrição da área de estudo

O estudo foi realizado no estuário adjacente à Ilha das Caieiras bairro pertencente à região da grande São Pedro que se situa a noroeste da Baía de Vitória (ES). (PREFEITURA DE VITÓRIA, 2012).

De acordo com a Prefeitura Municipal de Vitória, a Ilha das Caieiras faz parte do complexo demográfico da “Grande São Pedro” que compreende 10 bairros (Comdusa, Conquista, Ilha das Caieiras, Nova Palestina, Redenção, Resistência, São José, Santo André, São Pedro e Santos Reis), numa área aproximada de 3.600.782 m² e com aproximadamente 33.746 habitantes (IBGE 2010). Além disso, essa região recebe grande aporte de esgoto doméstico *in natura*, sendo que nessa região encontram-se as desembocaduras de importantes rios da Baía de Vitória: Rio Bubu, Rio Santa Maria e Canal dos Escravos.

4.2 Coleta das amostras

As coletas das amostras foram realizadas em três pontos do manguezal (figura 8). O primeiro ponto de coleta (P1), corresponde a uma área de manguezal próxima a foz do rio Santa Maria da Vitória. O segundo ponto (P2) localiza-se em uma pequena ilha situada entre as desembocaduras dos rios Santa Maria da Vitória ao norte, e o Rio Bubu ao sul. O terceiro ponto (P3) corresponde a uma área de manguezal situada na desembocadura do rio Bubu.

O acesso aos locais de coleta foi realizado utilizando-se um barco a motor e contou com o auxílio de um pescador da região. Os pontos de coleta foram georreferenciados utilizando GPS MAP 76 (tabela 2).

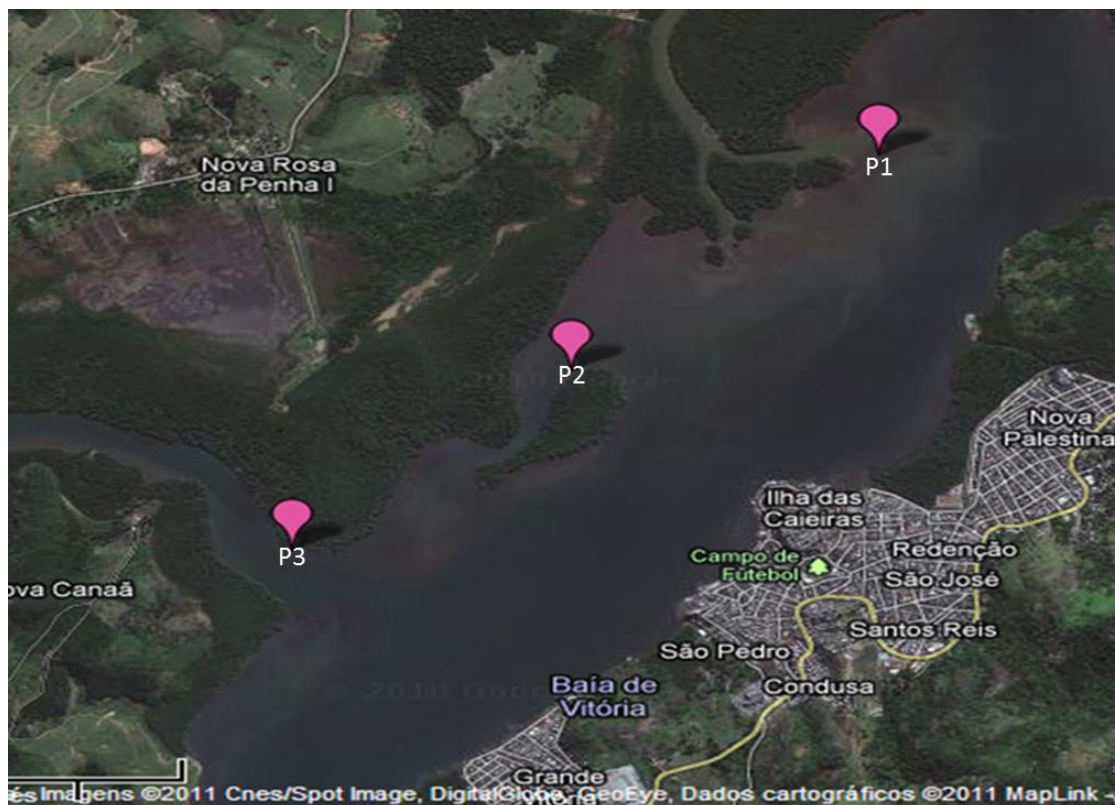


Figura 8: Pontos de coleta de amostra na Baía de Vitória.

Tabela 2: Pontos de amostragem

Amostras	Descrição	Coordenadas
P1	Manguezal próximo a foz do rio Santa Maria da Vitória	S20°15'641 W40°19'960
P2	Manguezal presente na ilha situada entre os rios Santa Maria da Vitória e Bubu	S20°16'262 W40°20'632
P3	Manguezal situado nas proximidades da foz do Rio Bubu	S20°16'782 W40°21'237

Nos três pontos de coleta (P1, P2 e P3) foram coletadas amostras de água e sedimento do estuário. As amostras de água foram coletadas em frascos de vidro estéreis (2 L de cada ponto) para as análises físico-químicas, bacteriológicas e moleculares. O sedimento foi coletado em potes de plástico estéreis.

Em relação às amostras de sedimento, este foi coletado mensalmente numa profundidade de até 10 cm, com auxílio de um core (Figura 9), de acordo com o seguinte procedimento: um quadrado de 2 m de lado foi demarcado e foram coletadas amostras dos vértices e de um ponto central, perfazendo cinco amostras. A parte superior do sedimento de cada uma das cinco amostras coletadas foi homogeneizada de maneira uniforme compondo assim, uma amostra composta final de aproximadamente 300g.



Figura 9: Vista dos pontos de coleta de água e sedimento (P1, P2 e P3) no sistema estuarino da Baía de Vitória e da ferramenta utilizada para coleta de sedimento (core).

As coletas foram realizadas mensalmente num período de 15 meses entre os meses de Outubro/11 - Dezembro/12. As coletas foram feitas no período matutino, com a maré de aproximadamente 0,3 m enchente, previamente consultada na tábua de maré obtida no Banco Nacional de Dados Oceanográficos (BNDO). Essa altura foi suficiente para permitir a coleta das amostras de sedimento, que em maré mais alta eram cobertos pelas águas do estuário.

4.3 Armazenamento e transporte das amostras

Após ser coletadas, as amostras de água e sedimento foram armazenadas em caixa térmica protegidas da luz e sob refrigeração, e transportadas para o Laboratório de Saneamento Ambiental (LABSAN), para posterior análise físico-química, bacteriológica e molecular. As amostras de água que não foram processadas no momento em que chegaram ao laboratório foram mantidas em refrigerador a 4°C. As amostras de sedimento que não foram processadas imediatamente após a coleta foram armazenadas em refrigerador a 4°C para posterior análise bacteriológica e em freezer - 80°C até a realização das análises moleculares.

4.4 Análises Laboratoriais

As análises foram realizadas no Laboratório de Saneamento (LABSAN), Departamento de Engenharia Ambiental (DEA), na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

4.4.1 Análises Físico-Químicas das amostras de água

As análises físico-químicas realizadas na água coletada próxima ao local de coleta do sedimento foram às seguintes: pH, turbidez, condutividade, sólidos dissolvidos, oxigênio dissolvido, salinidade, temperatura, sólidos voláteis e granulometria.

As medições de pH tanto da água quanto da água intersticial do sedimento (a água intersticial do sedimento foi obtida após a centrifugação do sedimento durante 2 minutos) foram realizadas pelo método eletrométrico utilizando o pHmetro de

bancada (DM-22, eletrodo Digmed), as medições de condutividade elétrica foram realizadas pelo método potenciométrico utilizando Condutímetro (Jenco electronics, 1671). As análises de turbidez foram realizadas pelo método nefelométrico com turbidímetro microprocessado (Alfakit). As análises de salinidade foram realizadas com um Salinômetro (Bioprix). Todas essas medições, incluindo as dos Sólidos Dissolvidos Totais (SDT) foram realizadas de acordo com as recomendações do Standard Methods for Water and Wastewater (APHA; AWA; WEF, 2005). A determinação do teor de sólidos voláteis do sedimento coletado foi realizada conforme a NBR 13600 da ABNT (1996), que se refere à determinação do teor de matéria orgânica por queima a 440°C. As medições da concentração de oxigênio dissolvido foram realizadas segundo Winkler (1888) e as de temperatura foram realizadas em campo com o auxílio de um termômetro (Incoterm).

4.4.1.2 Análise Granulométrica

As amostras de sedimento após secagem em estufa a 60°C foram pesadas (100g) e lavadas em peneira de abertura de malha de 0,062 mm para a separação da fração silte-argila da areia. A seguir, a areia retida na peneira foi retirada e posta em frascos para secagem em estufa a 60°C. A fração areia foi submetida à agitação mecânica durante 20 minutos em um conjunto de peneiras sobrepostas de decrescente abertura de malha (4,75 a 0,062 mm) de acordo com a escala de tamanho de Wentworth (1922). As frações retidas em cada peneira foram pesadas e armazenadas. Esse procedimento foi realizado pelo laboratório de Hidráulica e Monitoramento Ambiental (LABHIDRO) na Universidade Federal do Espírito Santo.

4.4.2 Análises microbiológicas das amostras de água e sedimento

4.4.2.1 Coliformes termotolerantes

A detecção e quantificação de coliformes termotolerantes foram realizadas através da metodologia da membrana filtrante conforme estabelecido pelo APHA (2005) para análise em águas e sedimento.

a) Sedimento

Dez gramas do sedimento fresco foram homogeneizados em 90 ml de água fosfatada (diluição 10^{-1}) durante 30 min e sedimentadas por 5 min. Após essa primeira diluição, foi feita uma diluição seriada (10^{-2} ; 10^{-3} e 10^{-4}) utilizando 10 mL das amostras diluídas em 90 mL de água de diluição (ISO 16140, 2003). Apenas as diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram utilizadas para filtração. As análises foram feitas em duplicata.

b) Água

O volume inicial (100 ml) foi diluído (água fosfatada) em série (10^{-1} ; 10^{-2} e 10^{-3}) até a diluição 10^{-3} utilizando 10 mL das amostras diluídas em 90 mL de água de diluição para detecção de coliformes termotolerantes.

As amostras foram homogeneizadas e filtradas com o uso de uma bomba a vácuo. A filtração foi realizada com uma membrana de nitrocelulose, quadriculada, diâmetro 47nm e porosidade de 0,45 μ m (marca Unifil). Após a filtração, a membrana contendo a amostra foi transferida para placas de cultura (49x13 mm) contendo meio m-FC. As placas foram incubadas a 44,5 °C por 24h.

Os resultados foram considerados positivos para coliformes termotolerantes quando houve o crescimento de colônias azuis sobre as membranas após este período de incubação. O resultado foi expresso em Unidade Formadora de Colônia por 100 mL de volume filtrado para amostras de água, ou por 100g de sedimento (UFC/100mL ou UFC/100g).

4.4.2.2 Enterococos

A detecção e quantificação de Enterococos no sedimento e na água foram realizadas através da metodologia de membrana filtrante conforme o estabelecido pelo (APHA 2005). O procedimento de homogeneização e diluição das amostras de água e de sedimento foi igual aquele utilizado para detecção e quantificação de coliformes termotolerantes.

O volume inicial (100 ml) foi diluído (água fosfatada) em série (10^{-1} ; 10^{-2} e 10^{-3}) até a diluição 10^{-3} utilizando 10 mL das amostras diluídas em 90 mL de água de diluição para detecção de enterococos. O volume final de cem mililitros da amostra foi homogeneizado e filtrado com o uso de uma bomba a vácuo. A filtração foi realizada com uma membrana de nitrocelulose, quadriculada, diâmetro 47 nm e porosidade de 0,45 μm (marca Unifil). As bactérias a serem detectadas ficaram retidas na superfície da membrana, a qual foi transferida para uma placa de Petri (49 x 13 mm), contendo o meio de cultura seletivo e diferencial (Ágar mE). As placas foram incubadas a 44,5 °C por 48 h. Após o período de incubação foram visualizadas colônias com características típicas (coloração rosa a vermelho escura). Após esse período, as membranas que apresentaram colônias típicas foram transferidas para um meio diferencial (Ágar EIA) e incubada a 44,5 °C por 20 min.

Os resultados foram considerados positivos para Enterococos quando observou-se o crescimento de colônias típicas na parte inferior da membrana (um precipitado preto ou marrom avermelhado). A partir da contagem destas colônias, calculou-se a densidade de Enterococos presentes na amostra. O resultado foi expresso em Unidade Formadora de Colônia por 100 mL de volume filtrado para amostras de água, ou por 100g de sedimento (UFC/100mL ou UFC/100g).

O procedimento para a análise bacteriológica das amostras de água e sedimento do estuário pode ser observado nos fluxogramas a seguir (figura 10 e 11).

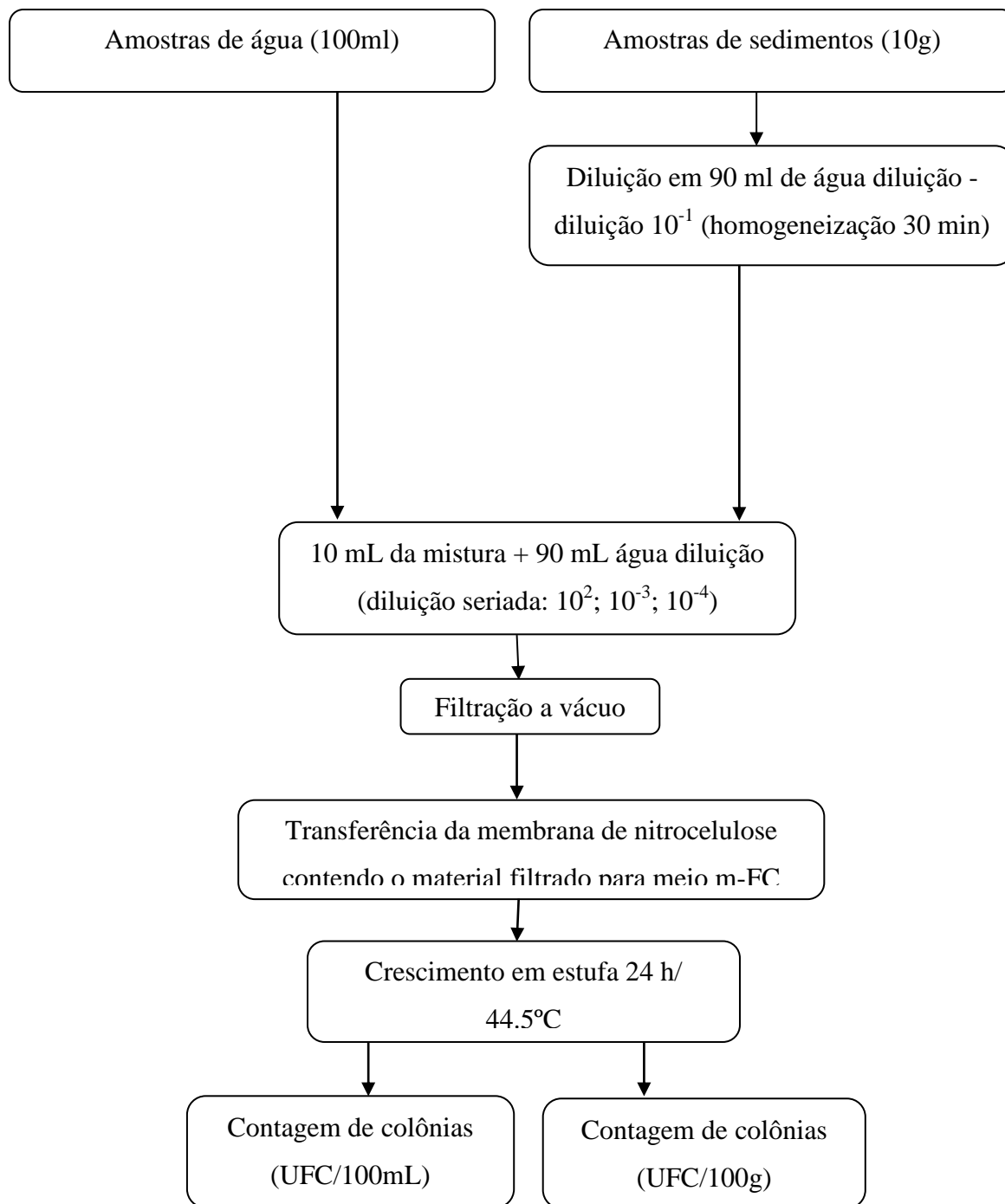


Figura 10: Fluxograma das principais etapas realizadas na detecção e quantificação de coliformes termotolerantes nas amostras de água do estuário e no sedimento.

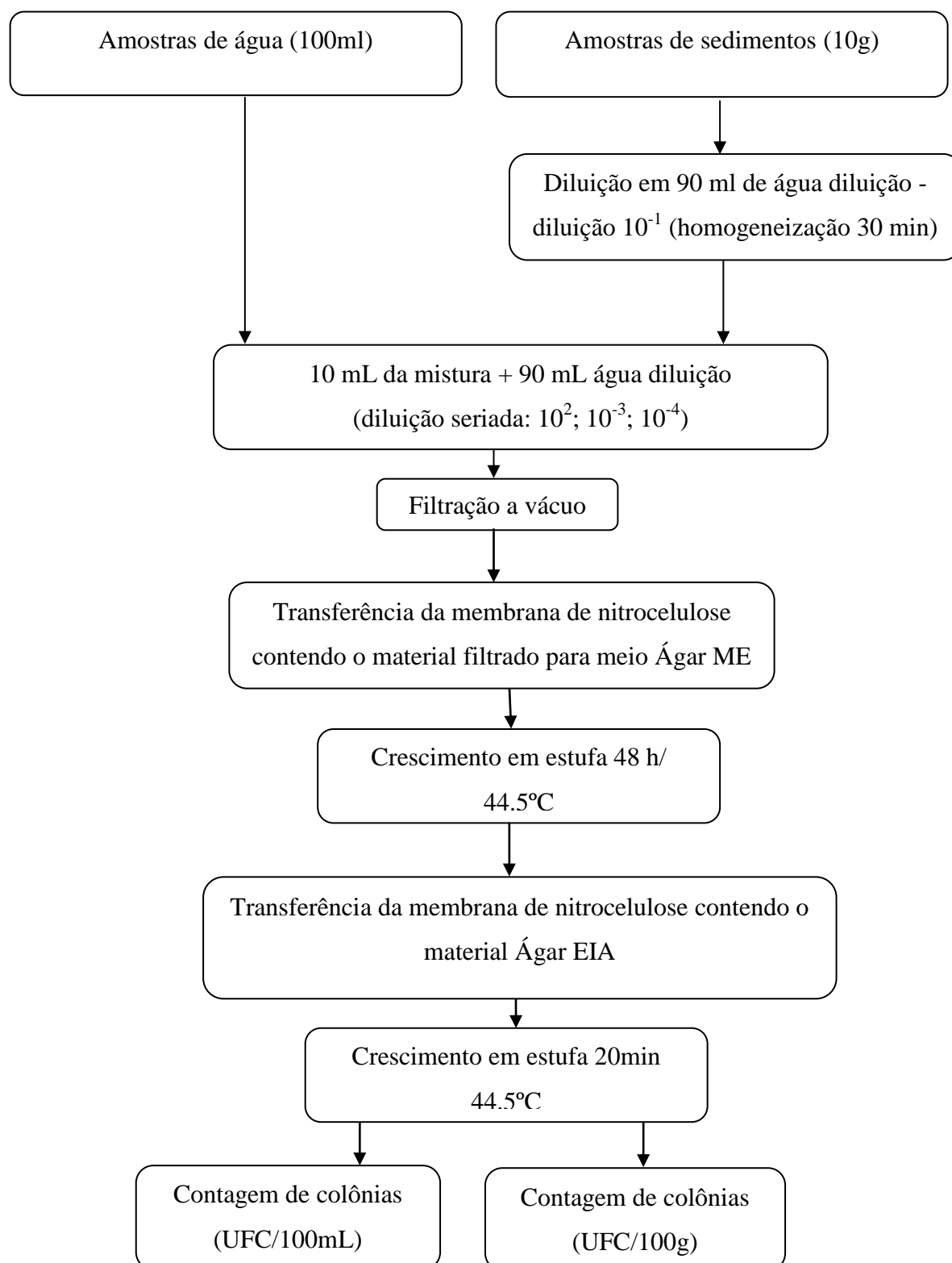


Figura 11: Fluxograma das principais etapas realizadas na detecção e quantificação de enterococos nas amostras de água do estuário e no sedimento.

4.4.3. Análises Virais

4.4.3.1 Concentração das amostras de água e sedimento

A detecção de vírus entéricos nas amostras de água e sedimento consistiu de quatro etapas: (1) Homogeneização e concentração, (2) extração de ácidos nucleicos, (3) síntese de DNA complementar (cDNA) e (4) detecção do material genético por PCR convencional.

A concentração das amostras de água e sedimento para detecção de vírus entéricos foi realizada a partir da técnica de adsorção-eluição em membrana carregada negativamente, método descrito por Katayama *et al* (2002) com modificações.

Nas amostras de água (1L) foi adicionado 1 L do tampão Tris/Ca⁺² 0,01 M (pH=7,2). Após homogeneização por dois minutos em agitador magnético, foi utilizada membrana de éster de celulose de poro 1,2 µm (Millipore) para filtrar a solução. Este procedimento foi utilizado para remoção de partículas maiores, utilizando recipiente de pressão para dispensação (Millipore). O material filtrado teve o pH ajustado para 3,5 (HCl 10 N) e novamente filtrado em membrana de éster de celulose carregada negativamente com poro de 0,45 µm (Millipore). O filtrado foi descartado e a membrana lavada com H₂SO₄ 0,5 mM e, posteriormente, eluída com 10 mL de NaOH 10mM. O eluato resultante foi neutralizado com H₂SO₄ 50mM e TE 100X. Após transferência para tubos Amicon Ultra-15 (Millipore), as amostras de água foram submetidas à técnica de ultrafiltração, consistindo em centrifugação a 6700xg a 4°C até que o volume da amostra atinja cerca de 400 µL. A amostra permaneceu em freezer a -80°C até a extração de ácidos nucleicos. O sistema de filtração utilizado nesta etapa foi descontaminado com uma solução de cloro 10 % por 15 minutos (100 mL de Q-Boa para 1 L), 1 L de solução de Na₂S₂O₃ 50 mg L⁻¹ (0,05 g L⁻¹) e 1 L de água destilada.

Em relação às amostras de sedimento, uma porção de 100g de sedimento foi homogeneizada em 1L de tampão fosfato para a desagregação dos vírus das partículas do sedimento. Após 30 minutos em agitador magnético, a solução decantou por 10 minutos. Aproximadamente 1L do sobrenadante foi coletado e a este foi adicionado 1L do tampão Tris/HCl/Ca⁺² 0,01 M (pH=7,2). Após

homogeneização por dois minutos em agitador magnético, foram utilizadas duas membranas de éster de celulose de poro 1,2 µm (Millipore) para filtrar a solução, pois a utilização de uma única membrana provoca o seu entupimento. Sendo assim, 500 ml da solução foram filtrados e logo em seguida os outros 500 ml. Este procedimento foi utilizado para remoção de partículas maiores, utilizando recipiente de pressão para dispensação (Millipore). O material filtrado teve o pH ajustado para 3,5 (HCl 10 N) e novamente filtrado em membrana de éster de celulose carregada negativamente com poro de 0,45 µm (Millipore). O filtrado foi descartado e a membrana lavada com H₂SO₄ 0,5 mM e, posteriormente, eluída com 10 mL de NaOH 10mM. O eluato resultante foi neutralizado com H₂SO₄ 50mM e TE 100X. Após transferência para tubos Amicon Ultra-15 (Millipore), as amostras de sedimento foram submetidas à técnica de ultrafiltração, consistindo em centrifugação a 6700xg a 4°C até que o volume da amostra atinja cerca de 400 µL. A amostra permaneceu em freezer a -80°C até a extração de ácidos nucleicos. O sistema de filtração utilizado nesta etapa foi descontaminado com uma solução de cloro 10 % por 15 minutos (100 mL de Q-Boa para 1 L), 1 L de solução de Na₂S₂O₃ 50 mg L⁻¹ (0,05 g L⁻¹) e 1 L de água destilada.

4.4.3.2 Extração dos ácidos nucleicos

Foi utilizado o método de Boom *et al* (1990) que se baseia na lise celular utilizando-se o tiocianato de guanidina/EDTA para dissociação da ribonucleoproteína viral seguido de adsorção dos ácidos nucleicos em micropartículas de sílica.

O RNA extraído foi submetido à reação de transcrição reversa para a obtenção do DNA complementar. Este procedimento foi adotado, pois dois dos três vírus pesquisados são vírus com o material genético RNA (norovírus e rotavírus). O volume final após cada etapa de extração foi de aproximadamente 30 µL.

4.4.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese do DNA complementar foi realizada a partir do ácido nucleico extraído nas amostras utilizando-se o protocolo proposto por Iturriza-Gomara *et al* (1999) com modificações, conforme descrição a seguir.

Uma mistura contendo 5µL de ácido nucléico e 1µL de DMSO, foi desnaturada à 97°C durante sete minutos e mantida em gelo por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado uma solução contendo tampão de reação contendo: 2 µL de cada dNTP (2,5 mM), 1,25 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,3 µL de transcriptase reversa (RT superscript II 200 U/µL), 11,95 µL de H₂O Milli-Q e 2,5 µL 10X buffer. A mistura foi incubada em banho maria à 42°C durante uma hora e em seguida desnaturada em banho maria a 95°C por 10 minutos. O cDNA foi armazenado em freezer a -20°C para posterior amplificação e quantificação específica dos vírus estudados.

4.4.3.4 Amplificação do DNA pela PCR convencional e Nested PCR

Após a síntese de DNA complementar as amostras foram quantificadas utilizando espectrofotômetro Ultrospec 100 (Amersham Pharmacia Biotech). 1 µg de DNA foi utilizado com a mistura de reação, conforme tabela 3, cobertos por 30µL de óleo mineral para cada reação. A amplificação foi realizada utilizando um termociclador PTC-100, versão 7.0, MJ Research. Este procedimento foi realizado antes de amplificar o material genético.

Tabela 3: Concentrações finais dos reagentes da PCR convencional em cada reação.

	Tampão 10X	DNTP	MgCl ₂	Iniciador sense ou antisense	TAQ
PCR AdV	1X	200µM	1,5 mM	0,4µM	1U
n-PCR AdV	1X	200µM	1,5mM	0,4 µM	1U
PCR RV	1X	200µM	1,5mM	0,24 µM	2U
n-PCR RV	1X	200µM	3,5mM	0,24 µM	2U
PCR NoV	1X	200µM	2,5mM	0,4 µM	1,25U
n-PCR NoV	1X	200µM	2,0mM	0,4 µM	1,25U

Nas tabelas 4 e 5, estão descritos os programas utilizados nas reações de amplificação da PCR e nested-PCR convencional para os três vírus estudados (AdV,

RV e NoV). Para cada reação de nested-PCR foi utilizado um microlitro do produto da primeira PCR. Na tabela 3 estão as concentrações finais dos reagentes da PCR convencional para cada reação.

Tabela 4: Programa para reações da 1ª PCR de AdV, RV e NoV.

Etapa	Programa AdV	Programa RV	Programa NoV
Desnaturação	94°C/ 5min	94°C/ 5min	94°C/5min
Hibridização e extensão	94°C/ 20s 60°C/ 20s 72°C/ 30s	94°C/ 20s 60°C/20s 72°C/ 30s	94°C/ 30s 50°C/1min 72°C/ 30s
	35x	35x	40x
Extensão final	72°C/ 7min	72°C/ 7min	72°C/ 7min

Tabela 5: Programa para reações de nested-PCR de AdV, RV e NoV.

Etapa	Programa AdV	Programa RV	Programa NoV
Desnaturação	94°C/ 5min	94°C/ 5min	94°C/5min
Hibridização e extensão	94°C/30s 60°C/30s 72°C/1min	94°C/30s 60°C/30s 72°C/1min	94°C/ 30s 50°C/1min 72°C/ 30s
	35x	35x	40x
Extensão final	72°C/ 5min	72°C/ 5min	72°C/ 7min

As sequências dos iniciadores utilizados para os três vírus analisados encontram-se na tabela 6. Os iniciadores utilizados para amplificação de AdV foram previamente descritos por Allard *et al.* (2001) e são encontrados em região conservada do gene hexon. Os iniciadores utilizados para amplificação de RV foram previamente descritos por Hafliiger *et al.* (1997) e são encontrados em região conservada do gene VP7 para rotavírus do grupo A. Para NoV os genes amplificados foram os encontrados em região conservada do gene da RNA polimerase para o Genogrupo II

(GII), previamente descritos por Hafliger *et al.* (1997). Devido à prevalência mundial de GII frente ao GI apenas GII foi pesquisado (LEES, 2000).

Tabela 6: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para PCR e nested PCR.

Vírus	Iniciador	Sequência(5'-3')
AdV (Allard <i>et al.</i> ,2001)	Hex 1	GCCSCARTGGKWCWTACATGCACATC
	Hex 2	CAGCACSCCICGRATGTCAA
	NeHex 3	GCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC
	NexHex 4	CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA
RV (Hafliger <i>et al.</i> , 1997)	RV 1	GTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG
	RV 2	CTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTG
	RV 3	TGTATGGTATTGAATATAACCAC
	RV 4	ACTGATCCTGTTGGCCAWCC
NoV (Hafliger <i>et al.</i> , 1997)	SR II-1	CGCCATCTTCATTCACAAA
	SR II-2	TWCTCYTTYTATGGTGATGATGA
	SR II-3	TTWCCAAACCAACCWGCTG

*Código universal de nucleotídeos degenerados (W=A ou T; Y=C ou T; K=G ou T; R=A ou G; S=C ou G; B= sem A e N=A, T, C ou G).

4.4.3.5 Visualização dos produtos da nested-PCR em gel de agarose

Os produtos de nested-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,8%, contendo 0,5 µg ml⁻¹ de brometo de etídeo (BET) em tampão TBE 1X, por 1h a 100V. O padrão de peso molecular Gene Ruler TM 100 pb plus DNA e o corante 6x Loading Dye (Marca Fermentas) foram aplicados no gel de agarose. O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta TFX-20M (Life Technologies) e fotografado por câmera digital (NIKON), para registro do resultado. O tamanho dos fragmentos esperados após a nested-PCR podem ser visualizado na tabela 7.

Tabela 7: Tamanho dos fragmentos esperados em números de pares de bases (pb) amplificados por reações de Nested - PCR

Vírus	PCR	Nested-PCR
AdV	301	171
RV	1059	346
NoV	514	203

AdV - Adenovírus; RV- Rotavírus; NoV- Norovírus

Os procedimentos para as análises virais podem ser visualizadas no fluxograma a seguir (figura 12).

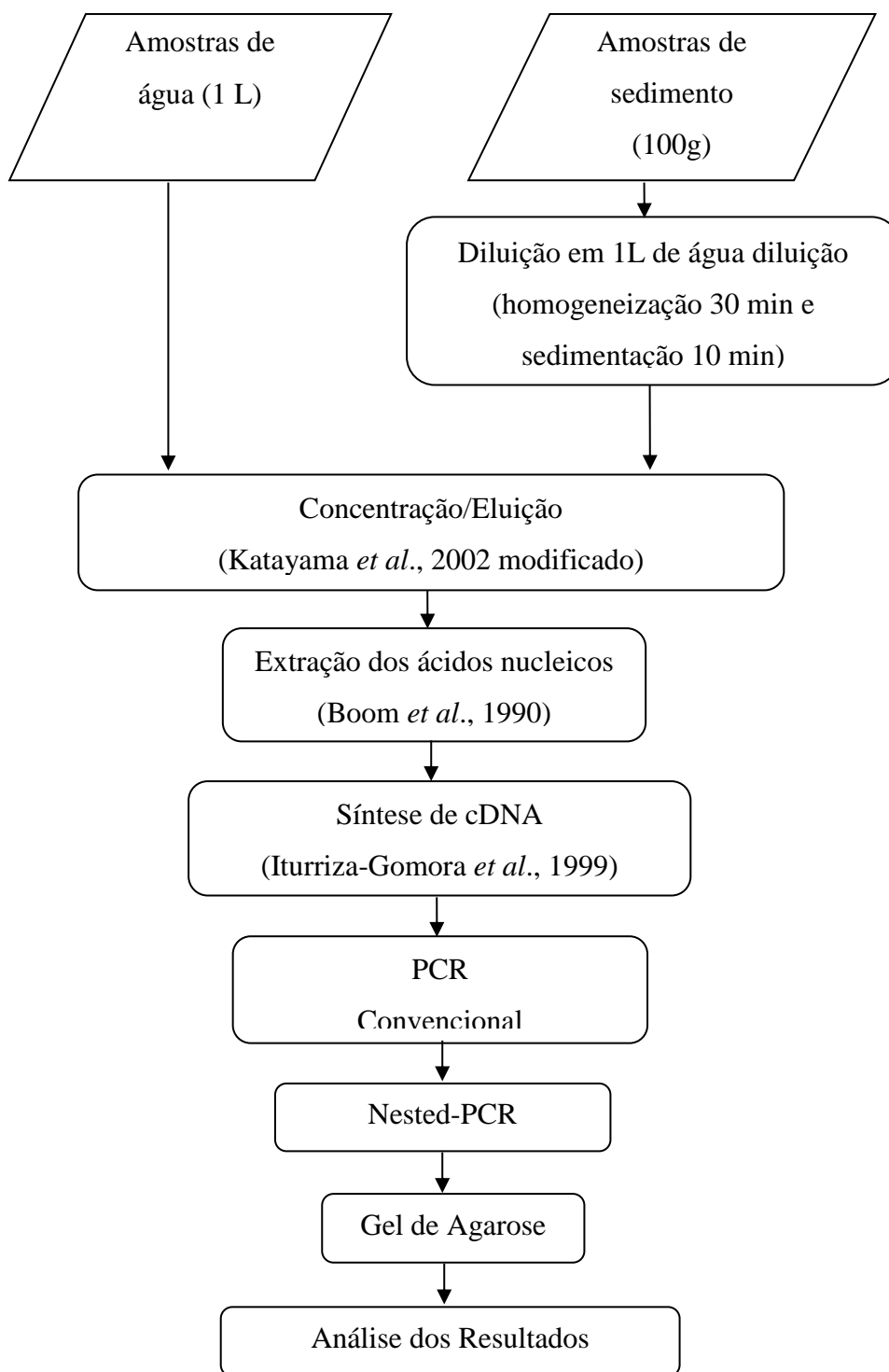


Figura 12: Fluxograma das principais etapas realizadas na detecção e quantificação de vírus entéricos nas amostras de água e sedimento do estuário.

4.5 Controle de qualidade das análises bacteriológicas, físico-químicas e virológicas

Para garantir o controle de qualidade, as análises bacteriológicas, físico-químicas e moleculares foram realizadas em salas diferentes para evitar o risco de contaminação.

As análises físico-químicas também foram realizadas em sala específica para este procedimento. Em relação às análises moleculares, todas as etapas deste procedimento foram realizadas utilizando-se um controle positivo e negativo. O controle negativo foi feito utilizando água Milli-Q. O controle positivo foi feito adicionando-se 10 g de fezes contaminadas com os vírus pesquisados na etapa de homogeneização/concentração a fim de garantir que a metodologia utilizada fosse capaz de identificar resultados positivos. Após inoculação, o procedimento seguiu as mesmas etapas realizadas para amostras ambientais. As amostras clínicas (fezes) utilizadas foram obtidas de crianças com diarreia atendidas na Policlínica de São Pedro e na Unidade de Saúde da Ilha das Caieiras

Na etapa de extração também foi utilizado controle positivo e negativo. Os controles negativos foram realizados pela substituição do DNA por água milli-Q.

4.6 Análise estatística

Foi realizada a estatística descritiva dos resultados das análises físico-químicas, bacteriológicas e virológicas qualitativas. Nas análises físico-químicas foram avaliados: mediana, mínimo e máximo; nas análises bacteriológicas foram avaliados: média geométrica, mediana, mínimo e máximo; e nas análises virais quantitativas, a média geométrica, mínimo e máximo.

Estudos de correlação foram realizados para verificar a associação entre a concentração de microrganismos indicadores de poluição fecal, parâmetros físico-químicos, presença de vírus e a pluviosidade. Para a identificação de diferenças entre as concentrações de coliformes termotolerantes e enterococos foi empregado, sempre que possível, o teste Kruskal-Wallis ou teste Mann-Whitney.

Em todas as análises estatísticas realizadas, consideraram-se como estatisticamente significativos valores que apresentassem $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos das análises realizadas nos três pontos de coleta (P1, P2 e P3) durante os 15 meses de monitoramento das amostras de água e das amostras de sedimento quanto às análises físico-químicas, bacteriológicas e virais.

5.1 Análises Físico-químicas

Os resultados dos parâmetros físico-químicos da água (pH, temperatura, condutividade, salinidade, sólidos dissolvidos totais, oxigênio dissolvido, turbidez e sólidos voláteis) podem ser visualizados nas figuras 13 a 23. Os dados pluviométricos do volume acumulado durante cada mês juntamente com os dados pluviométricos do volume de chuva acumulado nos cinco dias anteriores à coleta de cada mês foram realizados seguindo o padrão adotado por He e He (2008). Os dados de precipitação pluviométrica foram obtidos pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) para a estação do município de Vitória/ES.

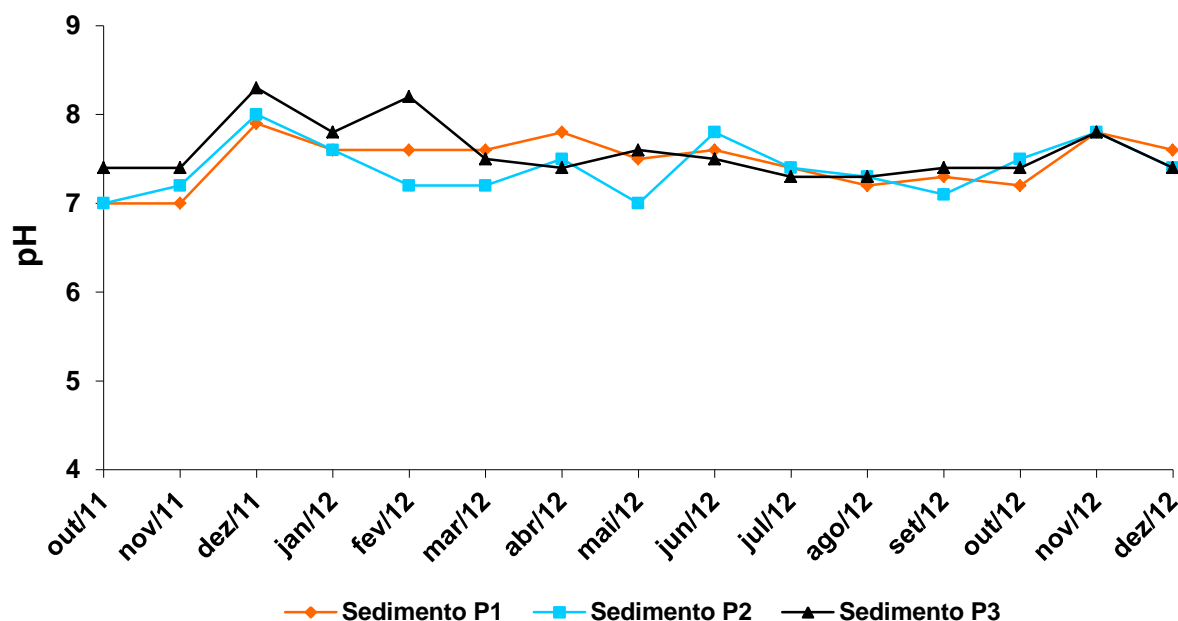


Figura 13: Monitoramento do pH da água intersticial do sedimento do estuário no dia de coleta, nos três pontos do estuário de Outubro/2011 a Dezembro/2012.

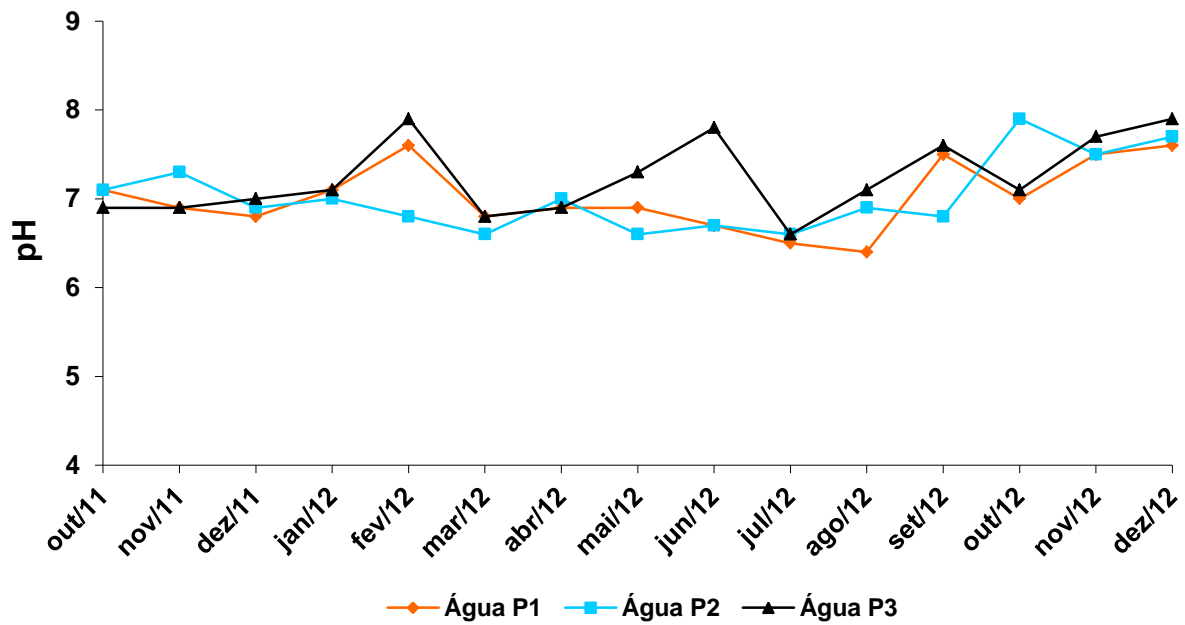


Figura 14: Monitoramento do pH da água do estuário no dia de coleta, nos três pontos do estuário de Outubro/2011 a Dezembro/2012.

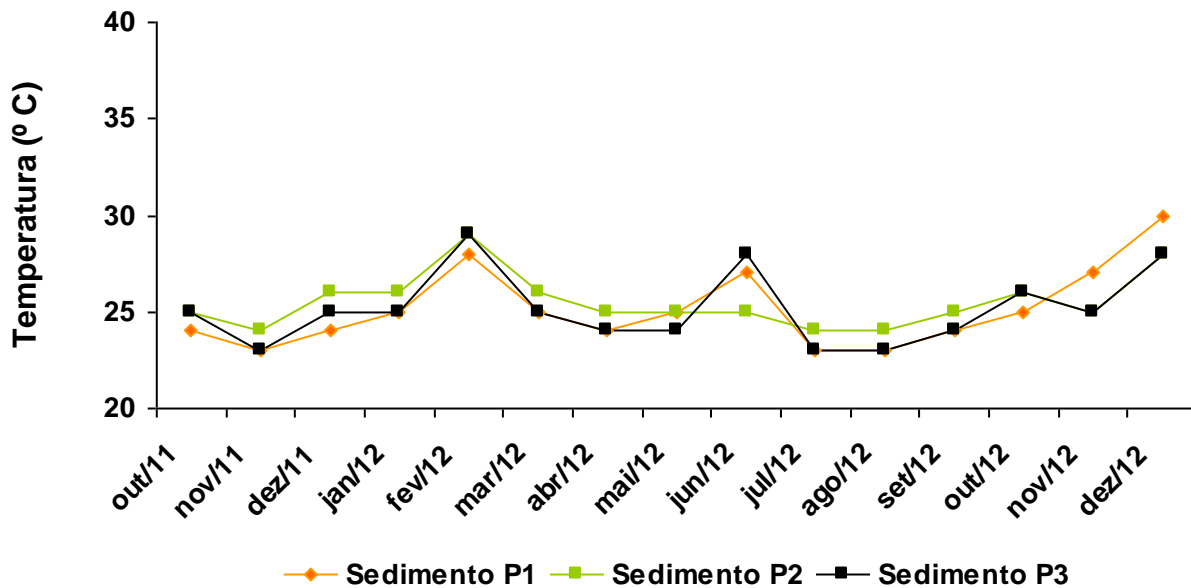


Figura 15: Monitoramento da temperatura do sedimento do estuário, nos três pontos do estuário de Outubro/2011 a Dezembro/2012

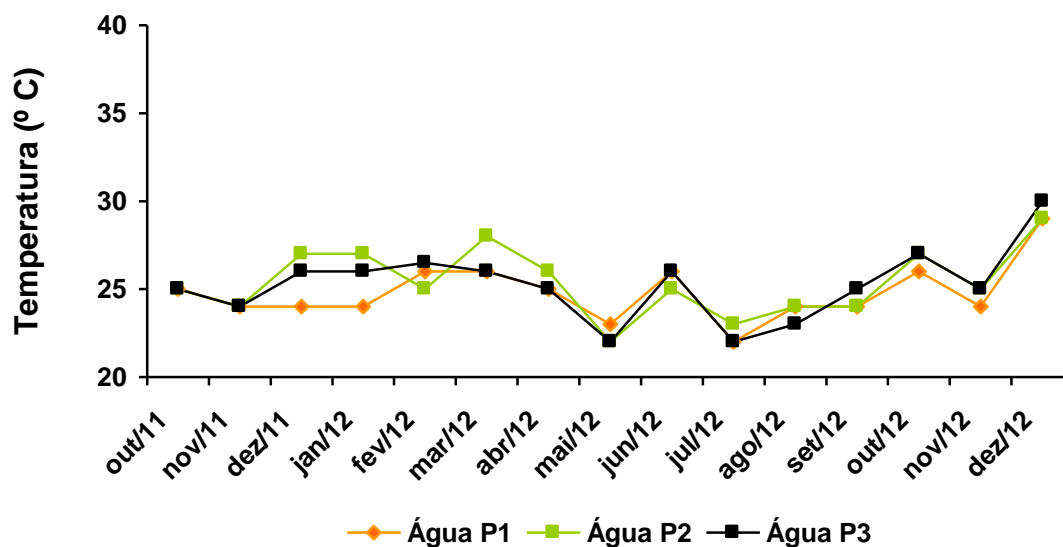


Figura 16: Monitoramento da temperatura da água do estuário, nos três pontos do estuário de Outubro/2011 a Dezembro/2012.

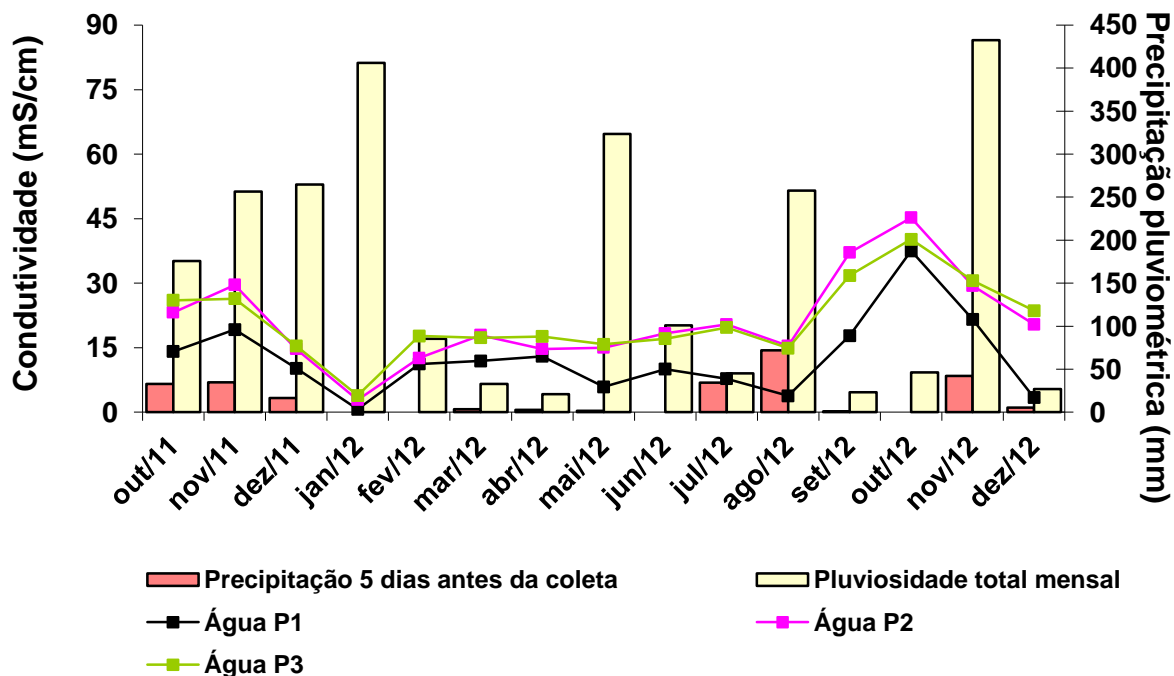


Figura 17: Monitoramento da condutividade no dia de coleta e valores acumulados de chuva mensais e para os cinco dias anteriores ao dia de coleta, nos três pontos do estuário de Outubro/2011 a Dezembro/2012.

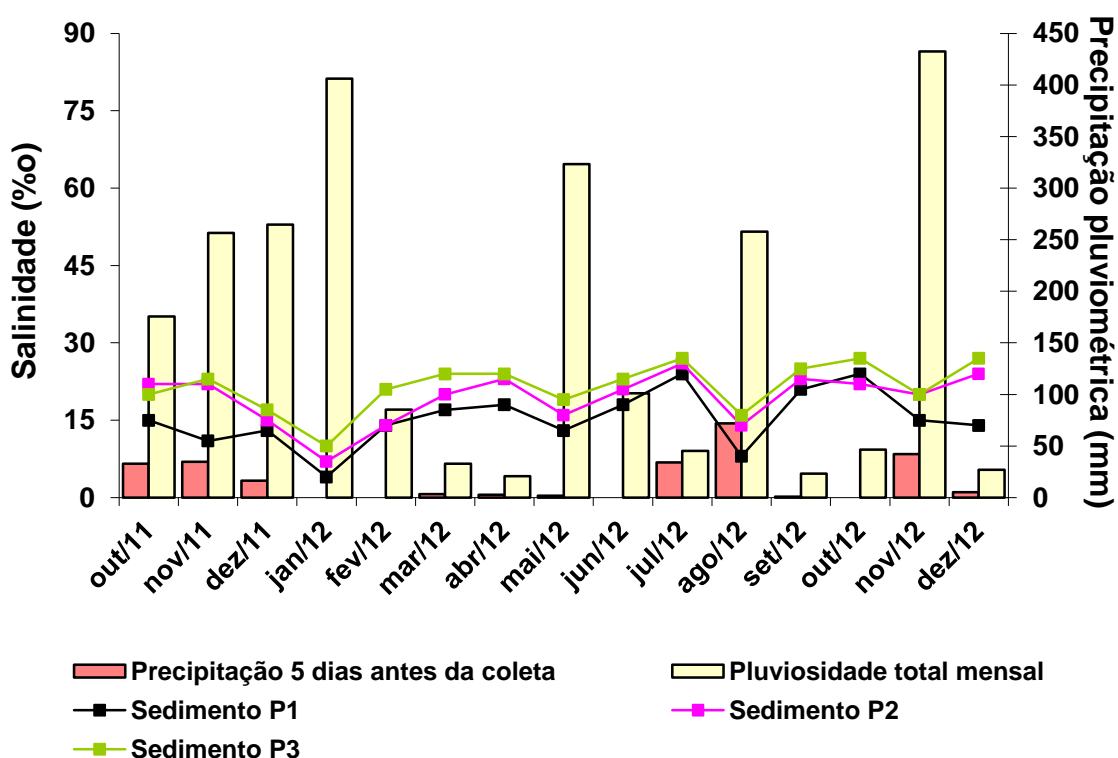


Figura 18: Monitoramento da salinidade da água intersticial do sedimento no dia de coleta e valores acumulados de chuva mensais e para os cinco dias anteriores ao dia de coleta, nos três pontos do estuário de Outubro/2011 a Dezembro/2012.

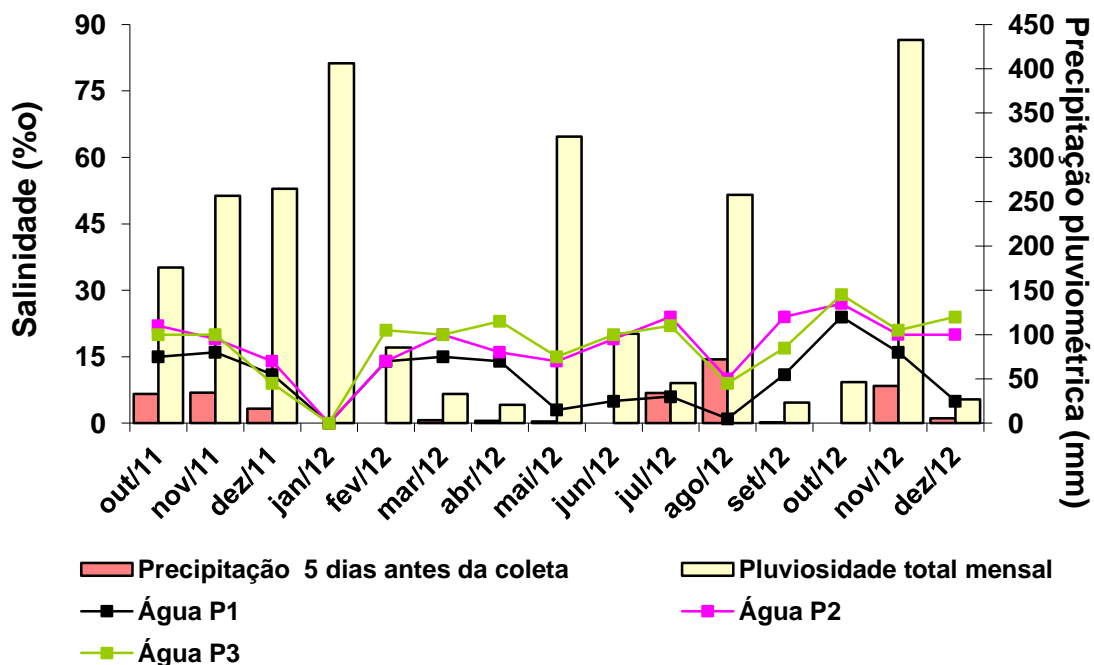


Figura 19: Monitoramento da salinidade da água no dia de coleta e valores acumulados de chuva mensais e para os cinco dias anteriores ao dia de coleta, nos três pontos do estuário de Outubro/2011 a Dezembro/2012.

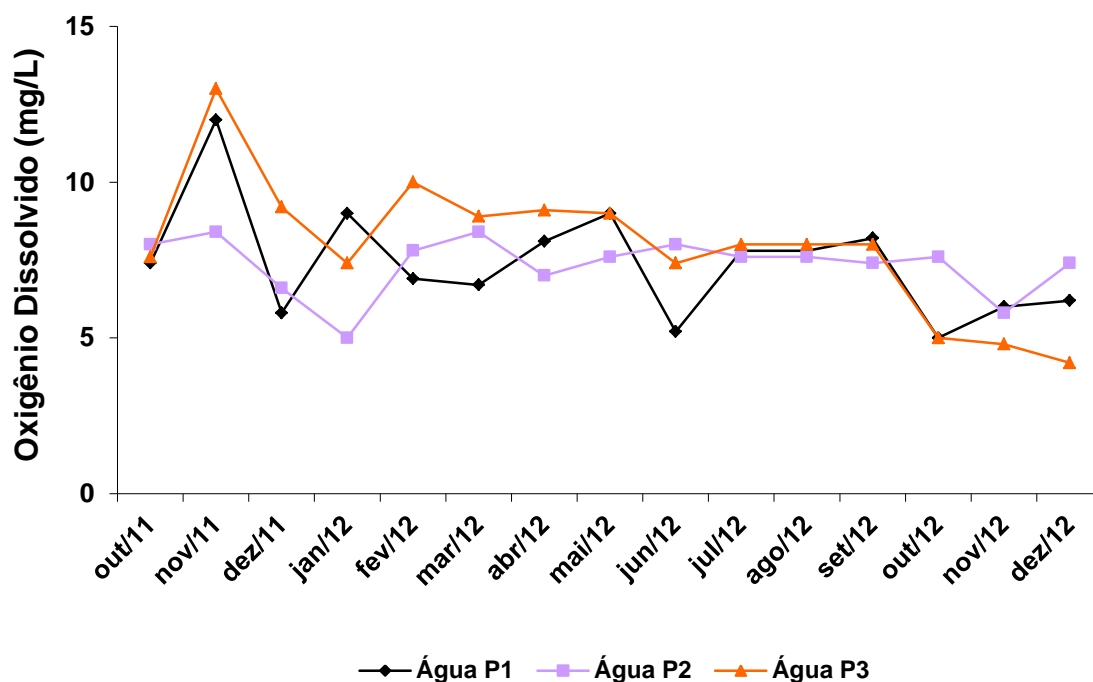


Figura 20: Monitoramento do oxigênio dissolvido na água do estuário no dia de coleta, nos três pontos do estuário de Outubro/2011 a Dezembro/2012.

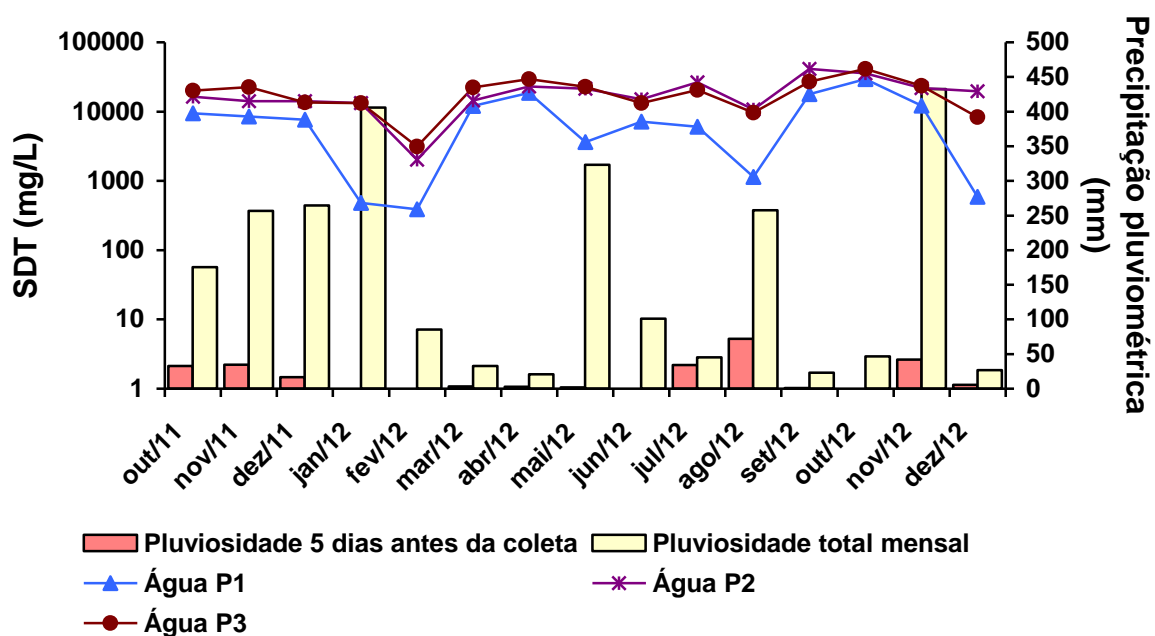


Figura 21: Monitoramento dos sólidos dissolvidos totais no dia de coleta e valores acumulados de chuva mensais e para os cinco dias anteriores ao dia de coleta, nos três pontos do estuário de Outubro/2011 a Dezembro/2012.

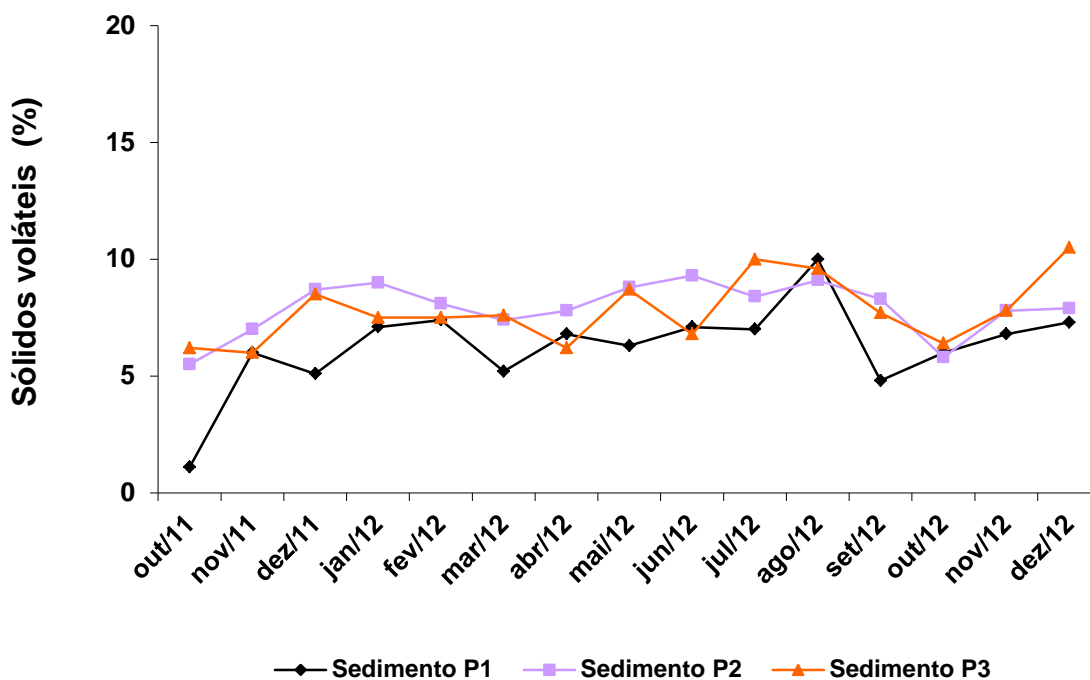


Figura 22: Monitoramento dos sólidos voláteis presentes no sedimento nos três pontos do estuário de Outubro/2011 a Dezembro/2012.

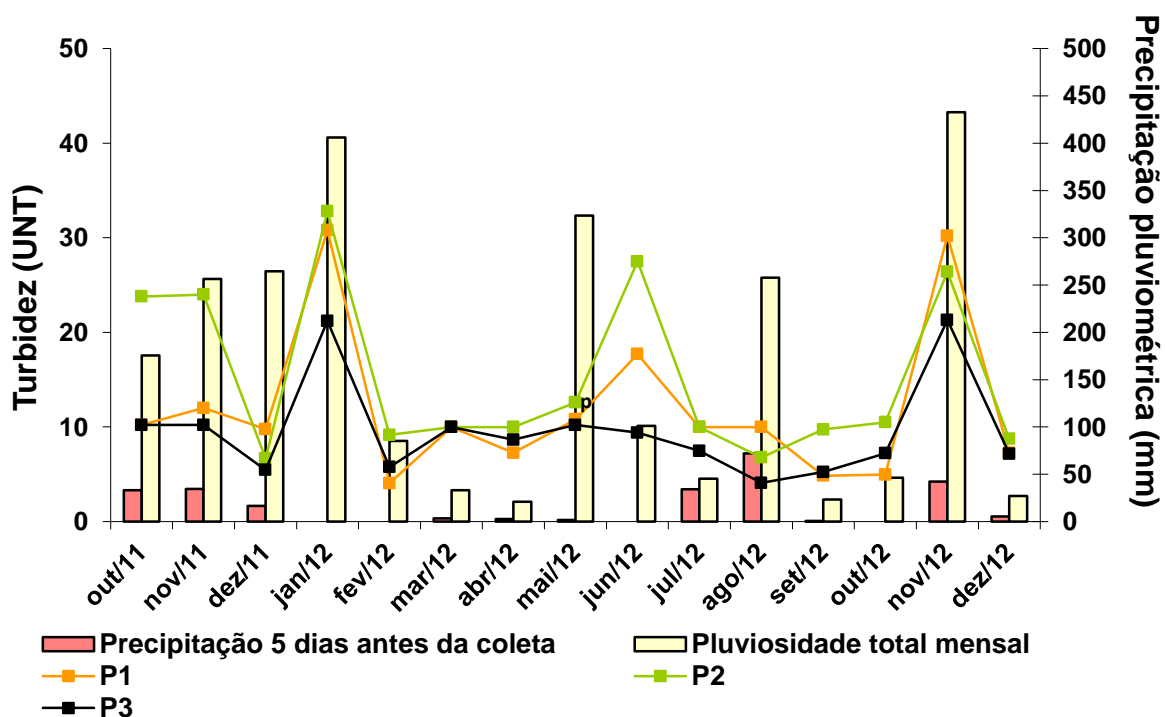


Figura 23: Monitoramento da turbidez no dia de coleta e valores acumulados de chuva mensais e para os cinco dias anteriores ao dia de coleta, nos três pontos do estuário de Outubro/2011 a Dezembro/2012.

Os parâmetros físico-químicos temperatura, pH, condutividade, salinidade, oxigênio dissolvido, sólidos dissolvidos totais, turbidez e sólidos voláteis foram analisados a fim de caracterizar a água do estuário onde as amostras de água e sedimento foram coletadas e também porque estes parâmetros podem afetar a integridade dos vírus no ambiente. Os parâmetros pH, temperatura, SDT e oxigênio dissolvido apresentaram poucas variações em seus resultados ao longo do ano, independente se a estação era seca ou chuvosa. O valor máximo de turbidez em todos os pontos ocorreu nos períodos chuvosos, assim como o declínio da condutividade, indicando maior entrada de água doce no sistema nestes períodos.

As medidas de precipitação pluviométrica do volume total mensal de chuva e o volume acumulado nos 5 dias anteriores a coleta foram utilizados a fim de verificar a existência de diferença entre os resultados demonstrando que quaisquer dos volumes de precipitação considerados não interferiram significativamente nos valores físico-químicos.

Com relação aos parâmetros condutividade elétrica e salinidade, estes variaram ao longo das estações seca e chuvosa sendo a salinidade da água intersticial do sedimento apresentando valores entre 4‰ e 27‰ e a salinidade da água entre 0‰ e 31‰. Os valores da condutividade da água variaram de 0,67 mS/cm a 45,2 mS/cm. Os resultados estatísticos descritivos dos parâmetros físico-químicos da água (condutividade, oxigênio dissolvido, salinidade, pH, temperatura, sólidos voláteis, SDT e turbidez) podem ser visualizados na tabela 8.

Tabela 8: Estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos da água analisados durante os 15 meses de monitoramento (n=15)

Parâmetro	Ponto de coleta	Mediana	Mínimo	Máximo
Condutividade (mS/cm)	P1	11,2	0,67	37,5
	P2	17,9	2,87	45,2
	P3	17,6	3,89	40,2
Oxigênio Dissolvido (mg/ L)	P1	6,9	4	9
	P2	7,6	5	8,8
	P3	8,0	4,8	13
Salinidade (UPS)	P1	15	0	24
	P2	20	0	31
	P3	23	0	29
pH	P1	6,9	6,4	7,6
	P2	7,0	6,6	8,3
	P3	7,1	6,6	7,9
Temperatura (°C)	P1	24	22	29
	P2	26	22	29
	P3	26	22	29
Sólidos voláteis (%)	P1	6,8	1,1	10,
	P2	8,1	5,5	9,3
	P3	6,8	6,0	10,5
SDT (mg/L)	P1	7,6	0,39	29,41
	P2	16,4	2,01	41,36
	P3	20,4	3,14	41,27
Turbidez (UNT)	P1	9,99	4,05	30,8
	P2	9,99	6,67	32,8
	P3	8,65	4,08	21,3

Não foram observadas diferenças significativas entre os pontos de coleta de água do estuário (P1, P2 e P3) quando analisados os parâmetros temperatura ($p = 0,9736$), pH ($p=0,3998$) e concentração de oxigênio dissolvido ($p=0,1559$). Os parâmetros condutividade elétrica e salinidade mostraram que P1 apresentou menores valores. Este ponto é localizado na desembocadura do Rio Santa Maria, sofrendo, assim, maior influência da água doce e conseqüentemente, uma concentração menor de sal em relação ao ponto 2, que se encontra a quase 1 Km da saída do mesmo rio e ao ponto 3 que se localiza a 2km da saída. Nos períodos mais chuvosos há um

grande aporte de água doce e turva proveniente do rio sendo que o valor máximo de turbidez em todos os pontos ocorreu nos períodos chuvosos.

A análise granulométrica realizada no sedimento demonstrou que o percentual de areia predominou na maioria das amostras. Porém nos meses de Fevereiro no ponto (P1 e P2), Abril (P2 e P3) e Setembro (P1) a porcentagem de finos (silte + argila) predominou (figura 9).

Tabela 9: Distribuição granulométrica das amostras de sedimento.

Mês/Ano	P1			P2			P3		
	Cascalho	Areia	Finos (%)	Cascalho	Areia	Finos (%)	Cascalho	Areia	Finos (%)
out/11	1,03	97,29	4,68	3,23	89,57	7,20	2,17	84,43	13,40
nov/11	0,00	90,92	9,08	0,68	94,10	5,22	4,09	92,91	3,00
dez/11	5,21	88,06	6,73	3,64	89,38	6,73	1,41	91,44	7,15
jan/12	1,81	95,28	2,81	43,75	53,99	2,26	2,52	95,69	1,79
fev/12	0,43	25,41	74,16	5,28	39,66	55,06	1,07	53,86	52,79
mar/12	0,26	46,29	53,45	1,55	49,49	47,62	1,44	47,62	50,94
abr/12	3,54	43,53	52,93	4,9	30,22	64,88	11,21	20,37	68,42
mai/12	0,29	52,18	47,53	29,24	35,45	35,31	9,16	54,00	36,84
jun/12	0,00	83,48	16,52	24,06	75,79	0,15	0,48	99,45	0,07
jul/12	7,00	71,43	21,57	23,91	52,52	23,57	15,64	57,40	26,96
ago/12	9,07	58,79	32,14	19,53	54,94	25,53	13,13	53,49	33,88
set/12	1,46	46,63	51,91	13,79	55,28	30,93	15,93	55,85	28,22
out/12	0,88	39,07	38,19	2,73	49,66	47,61	1,85	48,12	50,03
nov/12	0,15	89,65	10,20	2,14	91,15	6,71	0,72	96,26	3,0
dez/12	6,14	88,85	5,01	2,06	91,74	6,2	3,61	87,59	8,8

* Finos = silte + argila

5.2 Análises bacteriológicas

As médias dos pontos de coleta de coliformes termotolerantes e enterococos são longo dos 15 meses de monitoramento podem ser observadas nas figuras 24 e 25.

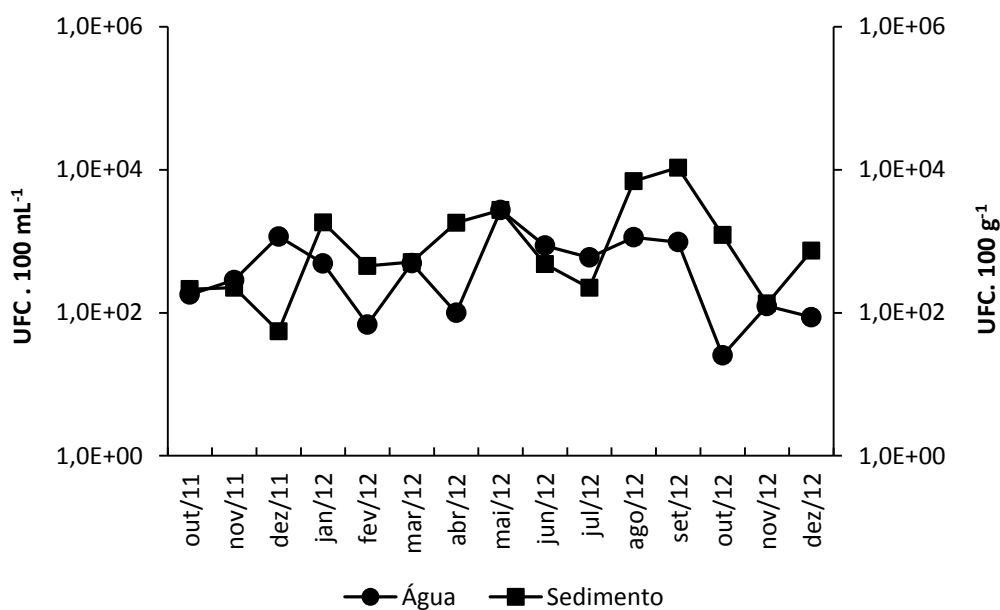


Figura 24: Médias dos pontos de coleta de coliformes termotolerantes (NMP) de outubro de 2011 a dezembro de 2012 nos três pontos de coleta de água e sedimento

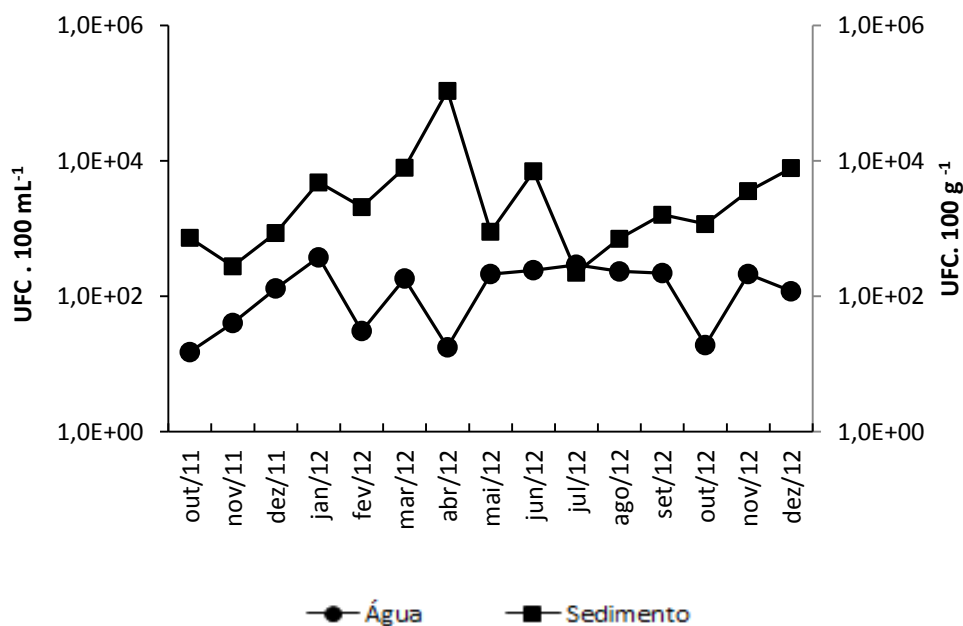


Figura 25: Médias dos pontos de coleta de enterococos (NMP) de outubro de 2011 a dezembro de 2012 nos três pontos de coleta de água e sedimento.

Conforme observado, a densidade de coliformes termotolerantes foi semelhante tanto nas amostras de água quanto nas amostras de sedimento. A concentração de enterococos foi maior nas amostras de sedimento do que na água na maioria dos meses analisados. Os resultados da estatística descritiva das análises ao longo de 15 meses de monitoramento de coliformes termotolerantes e enterococos das amostras de água e sedimento do estuário da Baía de Vitória podem ser observados na tabela 10.

Tabela 10: Resultados da estatística descritiva das análises de coliformes termotolerantes (UFC100/mL) e enterococos (UFC100/g) das amostras de água e sedimento do estuário da Baía de Vitória.

Bactérias		Água (UFC 100mL ⁻¹)			Sedimento (UFC 100g ⁻¹)		
		P1	P2	P3	P1	P2	P3
Coliformes termotolerantes	N	15	15	15	15	15	15
	Média Geométrica	2,2x10 ²	1,4x10 ²	3,0x10 ²	4,9x10 ²	2,7x10 ²	5,1x10 ²
	Mediana	1,9x10 ²	1,3x10 ²	3,3x10 ²	6,8x10 ²	2,0x10 ²	6,6x10 ²
	Máximo	3,0x10 ³	4,2x10 ³	2,4x10 ³	8,0 x10 ³	3,0 x10 ⁴	8,0 x10 ³
	Mínimo	2,0x10 ¹	6,0x10 ⁰	3,0x10 ¹	2,2 x10 ¹	2,4 x10 ¹	3,0 x10 ¹
Enterococos	N	15	15	15	15	15	15
	Média Geométrica	7,6x10 ¹	5,0x10 ¹	1,1x10 ²	1,6x10 ³	1,5x10 ³	1,1x10 ³
	Mediana	2,0x10 ²	4,8x10 ¹	1,2x10 ²	1,1x10 ³	2,8x10 ³	1,5x10 ³
	Máximo	3,0x10 ²	6,0x10 ²	5,4x10 ²	2,4x10 ⁵	7,0x10 ⁴	1,4x10 ⁴
	Mínimo	2,0x10 ²	2,0x10 ²	2,0x10 ²	1,2x10 ²	9,0x10 ¹	2,7x10 ¹

Conforme observado, a concentração de enterococos nas amostras de sedimento foi maior quando comparada às amostras de água. Em todos os pontos estudados observou-se diferença significativa ($p < 0.0001$). Para verificar a existência de diferença significativa nas densidades de coliformes termotolerantes e enterococos entre as amostras analisadas foi utilizado o Teste kruskal-Wallis.

Analisando a concentração de coliformes termotolerantes e enterococos nos pontos de coleta de sedimento, observou-se que no ponto P1 e no P2 a concentração de enterococos foi maior que no ponto P3. Já ao analisar a concentração de coliformes

termotolerantes e enterococos nos pontos de coleta de água, observou-se que no P2 a concentração de enterococos foi significativamente maior ($p < 0,05$).

A concentração de coliformes termotolerantes e enterococos nas amostras de água e sedimento foi detectada durante todo o ano, independente se a estação era seca ou chuvosa. Também não foi observada correlação com os parâmetros físico-químicos ou com a maré (0,3m enchente).

5.3 Detecção viral

Os resultados obtidos no monitoramento dos vírus entéricos adenovírus (AdV), rotavírus (RV) e norovírus (NoV), nas amostras da água e do sedimento do estuário da Ilha das Caieiras, podem ser visualizados nas tabelas 11 e 12 respectivamente.

Em todas as amostras de água analisadas foi detectada maior prevalência de rotavírus, quando comparado com os demais vírus estudados. Os resultados da amplificação do genoma viral pela técnica de nested-PCR mostraram que adenovírus e os rotavírus não foram detectados nas amostras de sedimento do ponto 1, 2 e 3. O norovírus GII foi detectado em apenas duas amostras nos pontos 2 (5%).

Tabela 11: Ocorrência de vírus detectados durante o período de monitoramento para amostras de água por análise de PCR qualitativa

Mês/Ano	Amostras de água								
	Água P1			Água P2			Água P3		
	Adv	RV	Nov	Adv	RV	Nov	Adv	RV	Nov
out/11	-	-	-	-	+	-	+	-	-
nov/11	-	+	-	-	-	-	-	+	+
dez/11	-	-	-	-	+	-	-	-	-
jan/12	-	-	-	-	+	-	-	-	-
fev/12	-	-	-	+	-	-	-	-	+
mar/12	-	-	+	-	-	-	+	-	+
abr/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mai/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
jun/12	-	+	-	-	-	-	+	+	-
jul/12	-	-	-	-	+	-	+	+	-
ago/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
set/12	-	-	-	-	-	+	-	-	-
out/12	-	-	+	-	-	-	+	-	-
nov/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dez/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“-”: Resultado negativo; “+” : Resultado positivo.

Tabela 12: Ocorrência de vírus detectados durante o período de monitoramento para amostras de sedimento por análise de PCR qualitativa.

Mês/Ano	Amostras/ vírus								
	Sedimento P1			Sedimento P2			Sedimento P3		
	Adv	RV	Nov	Adv	RV	Nov	Adv	RV	Nov
out/11	-	-	-	-	-	+	-	-	-
nov/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dez/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
jan/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fev/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mar/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
abr/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mai/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
jun/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
jul/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ago/12	-	-	-	-	-	+	-	-	-
set/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
out/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nov/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dez/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“-“ Resultado negativo; “+” Resultado positivo.

Tabela 13: Frequência de genoma de AdV, RV e NoV por nested-PCR em água e sedimento durante 15 meses de monitoramento.

Amostra	Vírus	Nº amostras positivas/total	% amostras positivas
Água	HAdV	6/45	13%
	RVA	9/45	20%
	NoVGII	4/45	9%
Sedimento	HAdV	0/45	0.0%
	RVA	0/45	0.0%
	NoVGII	2/45	5%

Os rotavírus apresentaram a maior prevalência entre os demais vírus estudados, adenovírus e norovírus, para todas as amostras de água do estuário em relação a amplificação do genoma viral pela técnica de Nested-PCR. Os adenovírus foram encontrados com a segunda maior taxa de prevalência dentre os vírus estudados nas amostras de água do estuário. Os Norovírus foram detectados em menor frequência nas amostras de água. Contudo, nas amostras de sedimento somente os norovírus foram detectados, com 4.5% (2/45).

Não foi observada uma correlação estatística entre o a quantidade de chuva e a concentração de partículas virais no ambiente para nenhum dos vírus. Os testes de correlação entre a concentração de vírus no sedimento e os demais parâmetros físico-químicos demonstraram que não há correlação entre eles.

6. DISCUSSÃO

6.1 Avaliação dos fatores físico-químicos com respeito à presença de microrganismos indicadores em água e sedimento

As condições físico-químicas ambientais podem contribuir para a permanência dos microrganismos como bactérias indicadoras de poluição fecal e vírus entéricos no meio ambiente. Os microrganismos podem estar aderidos à matéria orgânica, partículas suspensas e se acumular no sedimento (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Neste estudo, os parâmetros temperatura e pH não apresentaram grandes variações ao longo do período de monitoramento. Este fato é corroborado por alguns trabalhos anteriores realizados nas regiões tropicais, os quais demonstram que a temperatura é sempre elevada, mas apresenta uma grande estabilidade durante o ciclo sazonal, (HONORATO DA SILVA *et al.*, 2004; FLORES, 1996). Os testes estatísticos não apontaram correlação entre estes parâmetros e a presença de vírus no ambiente. Os vírus entéricos têm sido apontados como microrganismos que permanecem estáveis por um período maior de tempo em temperaturas mais baixas em ambientes naturais. Altas temperaturas podem danificar o capsídeo viral ou os ácidos nucleicos, impedir a adsorção dos vírus ao seu hospedeiro e levar a inativação de enzimas requeridas para sua replicação (FONG & LIPP, 2005; BOSCH *et al.*, 2008). No ambiente estudado, apesar da temperatura média ter sido 25°C foi possível detectar genoma viral na água nos três pontos de coletas analisados.

Em relação ao pH, segundo a resolução CONAMA 430/11, em corpo d'água de água salobra classe 1, o pH deve permanecer entre 6,5 - 8,5, o que ocorreu nos pontos analisados, sendo este um ambiente propício para a sobrevivência de microrganismos. Os vírus entéricos são mais estáveis em pH entre 3 e 5 do que a pH 9 a 12 (METCALF; MELNICK; ESTES, 1995; BOSCH *et al.*, 2008). Alguns vírus entéricos, como os rotavírus e enterovírus, são estáveis em uma ampla faixa de pH (3 - 9), podendo ainda resistirem, em determinadas

situações, à desinfecção por compostos que diminuem o pH da água abaixo de 3,0 (KOOPMANS; DUIZER, 2004, TAVARES *et al.* 2005) porém são sensíveis a pH acima de 10 (BOSCH *et al.*, 2008). Já os calicivirus são inativados entre pH 3 e 5 (ABDEL- MOETY *et al.*, 2008). Duizer *et al.*, (2004) mostraram que durante 3 horas a um pH de 2,7 não foi suficiente para inativar completamente norovírus.

Um estudo feito por Melnick e Gerba, (1978), demonstrou que, se o pH é mantido acima de 11 por um longo período de tempo, 99,9% dos vírus são inativados pois o pH tem efeito sobre a fragmentação dos ácidos nucleicos. Além disso, a variação do pH nos estuários depende do fluxo e refluxo das marés e da quantidade de água doce proveniente dos tributários (SASSI *et al.*, 1980).

Considerando-se os parâmetros condutividade e salinidade, por outro lado, variaram ao longo das estações seca e chuvosa. O padrão esperado era que os valores fossem maiores em períodos secos e menores em períodos chuvosos já que em períodos chuvosos ocorre uma diluição nas águas do estuário diminuindo a quantidade de íons dissolvidos da água. Neste trabalho foi possível observar a estreita relação entre estes dois parâmetros. É importante ressaltar que, a coleta das amostras foi realizada em maré baixa. Com a maré mais baixa e em períodos chuvosos, o sedimento revolvido pelas chuvas passou a exercer um grau de interferência maior sobre os parâmetros salinidade e condutividade, devido à mistura do material anteriormente sedimentado com a coluna d'água (JENG *et al.*, 2005; HALLER *et al.*, 2009).

Alguns estudos mostram que os parâmetros de qualidade de água principalmente a salinidade e a condutividade estão sujeitos a influências de fatores como influxo de água doce, ventos, descarga fluvial e influência da maré (JUSTINO, 2009 KJERFVE, 1990; KRAMER, 1994). A Resolução CONAMA 430/2011 classifica como água salobra aquelas com salinidade superior a 0,5 ‰ e inferior a 30 ‰, mas neste estudo foi possível observar

valores inferiores a 0,5 ‰ em P1 no mês de janeiro de 2012, evidenciando a forte influência do Rio Santa Maria da Vitória neste ponto de coleta.

No que se refere à salinidade, cujas variações tanto diurnas quanto sazonais representam uma característica marcante das áreas estuarinas tropicais, Macedo (1974) e Melo (2007) ressaltam que as principais fontes geradoras destas variações são as marés, a evaporação, e o fluxo de água doce dos rios que deságuam nestes ambientes. A inativação acelerada dos vírus em salinidades superiores tem sido relatada, talvez porque altas concentrações de sais tem efeito virucida (FONG & LIPP, 2005; BOSCH *et al.*, 2006).

O oxigênio dissolvido é um dos principais parâmetros para controle dos níveis de poluição de águas. Ele é fundamental para manter e verificar as condições aeróbicas num curso d'água que recebe material poluidor (BAUMGARTEN; POZZA, 2001). É de vital importância à caracterização do estado de saúde do corpo hídrico, sendo o principal parâmetro de caracterização dos efeitos da poluição das águas por despejos orgânicos. Um dos principais responsáveis pela elevação do consumo de oxigênio dissolvido são os microrganismos responsáveis pela degradação da matéria orgânica (VON SPERLING, 1996).

Em relação a concentração de oxigênio dissolvido na água, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os pontos coletados e ao longo do tempo foi registrado de acordo com a resolução CONAMA 430/2011, já que a mesma estabelece um limite mínimo de 6 mg/L para as águas de classe 1.

No que se refere à turbidez, esta se deve aos sólidos suspensos presentes no ambiente e por isso pode estar relacionada com a presença de organismos patogênicos (FONG & LIPP, 2005). As partículas em suspensão constituem um veículo natural na ajuda à sobrevivência de vírus na água, pois os vírus são capazes de se agregar rapidamente às partículas sólidas, protegendo-se desta forma dos fatores degradantes, como luz UV (MARINO *et al.*, 2005). Em um estudo feito por Jeng e colaboradores (2005) foram observados valores

maiores de turbidez no estuário estudado, após eventos chuvosos o que corrobora com os resultados deste estudo.

6.2 Detecção de coliformes termotolerantes e enterococos nas amostras de água e sedimento do estuário

A presença de microrganismos patogênicos na água normalmente é resultante da poluição por fezes humanas e de animais, provenientes de águas residuárias urbanas e rurais (GONZALEZ *et al.*, 1982). Considerando que a maioria dos agentes patogênicos de veiculação hídrica tem em comum sua origem nas fezes de indivíduos doentes, uma condição para a avaliação da qualidade microbiológica da água é o exame de indicadores de contaminação fecal (AMARAL *et al.*, 2003). Os microrganismos indicadores mais utilizados são: *Enterococcus*, coliformes termotolerantes e *E.coli* (ORTEGA *et al.*, 2009).

Os microrganismos podem ser introduzidos no meio ambiente através de descargas de esgoto “in natura”, águas das chuvas em regiões urbanas ou rurais, dejetos de animais domésticos e, possivelmente, por meio dos próprios indivíduos que utilizam dessas águas para recreação ocasionando uma série de patologias gastrointestinais (GERMANO; GERMANO, 2001; COSTA *et al.*, 2003).

Além disso, o esgoto que é lançado no recurso hídrico pode se acumular no sedimento e atuar como um reservatório de indicadores fecais incluindo *E.coli* e *Enterococcus* (JENG *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2006). Estes microrganismos podem sobreviver por um longo período no sedimento e serem liberados para a coluna d'água podendo assim, colocar em risco a população que utiliza essa água para a recreação (LEWIS, 2003; HALLER *et al.*, 2009).

A área de estudo do presente trabalho, corresponde a uma área utilizada para atividades recreacionais e de lazer pela população do entorno. Essa região é referência em frutos do mar, com diversos restaurantes especializados em mariscos e com grande parcela da população vivendo da caça e pesca de

peixes. Os pontos do estuário selecionados (P1, P2 e P3), onde foram coletadas as amostras de água e sedimento são locais utilizados também para a extração de bivalves pelos pescadores da região. Segundo pescadores da região, cerca de 20 Kg de sururus são comercializados por semana e 70 Kg de ostras normalmente sob encomenda.

No Brasil, a legislação que determina as características que as águas doces, salobras e salinas devem possuir com finalidade de balneabilidade é a resolução CONAMA 274/2000. Nesta resolução, as águas são classificadas como próprias (excelente, muito boa, satisfatória) quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver, no máximo, 1.000 coliformes fecais (termotolerantes) ou 800 *Escherichia coli* ou 100 enterococos/100 mL (valores estabelecidos para água própria satisfatória).

A avaliação da qualidade bacteriológica das águas de estuário nos pontos 1, 2 e 3 (P1, P2 e P3) revelou que na maioria dos meses do ano a presença de coliformes termotolerantes e enterococos estavam dentro dos padrões considerados próprios estabelecidos pela Resolução CONAMA 274/2000 para água recreacionais, embora, deva-se considerar que as análises foram realizadas mensalmente, e não semanalmente conforme determina a legislação. Em alguns meses os valores de coliformes termotolerantes encontrados estiveram acima do padrão considerado “impróprio”.

De acordo com o que preconiza a Resolução CONAMA 357/2005, que 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, o sistema estuarino da Baía de Vitória poderia ser classificado como corpo d'água Classe 1 - água salobra, de acordo com seus usos preponderantes. Além disso, esta resolução também impõe o limite de 1000 coliformes termotolerantes/100mL em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência

bimestral, para usos que não sejam cultivo de moluscos bivalves ou recreação (BRASIL, 2005).

Ao analisar a qualidade da água para fins de cultivo de bivalves, conforme padrão preconizado pelo CONAMA 357/2005 foi observada a inadequação da área para este uso, pois o limite de 43 coliformes termotolerantes/100 mL de água do estuário. Estes resultados indicam esta área é imprópria para cultivo, pois pode colocar em risco a saúde dos consumidores dos mariscos procedentes desta região.

Na Europa, para águas de recreação de contato primário, conforme Diretiva 2006/7/CE, as concentrações de *E. coli* não devem exceder 500 UFC/100mL, baseadas em uma avaliação do percentil 95% (CEE, 2006).

Neste mesmo trabalho, elevada presença de coliformes termotolerantes e enterococos foi detectada nas amostras de sedimento sendo que no ponto P1 e no P2 a concentração de enterococos foi significativamente maior ($p < 0,05$) que a concentração de coliformes termotolerantes.

Os resultados também demonstraram que não houve diferença significativa nos pontos analisados ($p > 0,05$) em relação à concentração de coliformes termotolerantes na água e no sedimento. Já em relação a concentração de enterococos na água e no sedimento foi possível verificar que houve diferença significativa em todos os pontos analisados ($p < 0,0001$). Vários estudos têm demonstrado que a concentração de enterococos tanto na água quanto no sedimento é mais elevada quando comparada com a presença de coliformes termotolerantes (DAVIES *et al.*, 1995; DE-LUCA-ABBOTT *et al.*, 2000; ROSLEV *et al.*, 2008). Os elevados níveis de coliformes termotolerantes e enterococos detectados no sedimento são atribuídos à interação do sedimento a presença de partículas orgânicas no ambiente (DAVIES *et al.*, 1995; DAVIES., 2005; JENG *et al.*, 2005).

A presença de coliformes termotolerantes e enterococos tanto na água quanto no sedimento no ponto P1 pode ser justificado pelo frequente influxo de cargas de esgoto provenientes do Rio Santa Maria que recebe o aporte de esgoto sem tratamento em vários pontos do seu curso (CORREIA JUNIOR, 2003).

O ponto P2, devido à sua localização geográfica, é o ponto que menos sofre influência de esgoto doméstico, e isso refletiu na sua qualidade microbiológica, com menor média de coliformes e enterococos dentre os pontos estudados. Já o ponto P3 situado na foz do rio Bubu que corta o município de Cariacica recebe aporte de áreas rurais e urbanas o que contribui para a contaminação. A ausência de um sistema de saneamento da Ilha das Caieiras pode colaborar com a contaminação do local já que diversas manilhas podem ser observadas nas saídas do bairro beirando as margens do estuário.

Em trabalho realizado anteriormente neste mesmo estuário foi detectado até 10^5 UFC / 100 mL de *E. coli* na água (JESUS et al, 2006; JUSTINO, 2009). Moraes (2008) estudou pontos de lançamento de esgoto / drenagem urbana na Baía de Vitória e detectou até 107 UFC / 100 mL de coliformes.

Vários estudos têm demonstrado que a concentração de enterococos tanto na água quanto no sedimento é mais elevada quando comparada com a presença de coliformes termotolerantes (DAVIES *et al.*, 1995; DE-LUCA-ABBOTT *et al.*, 2000; ROSLEV *et al.*, 2008). Os elevados níveis de coliformes termotolerantes e enterococos detectados no sedimento são atribuídos à interação do sedimento a presença de partículas orgânicas no ambiente (DAVIES *et al.*, 1995; JENG *et al.*, 2005; DAVIES., 2005).

A presença desses microrganismos é utilizada para estimar a presença de outros organismos patogênicos de origem fecal presentes na coluna d'água como, por exemplo, os vírus entéricos que podem causar doenças gastrointestinais na população que utiliza essas áreas como subsistência e lazer (CRAIG *et al.*, 2002).

6.3 Detecção viral nas amostras de água e sedimento do estuário

Nesse estudo verificou-se a ocorrência de AdV, RV e NoV GII nas amostras de águas do estuário da Baía de Vitória em três pontos de coleta. Nas amostras de sedimento somente NoV GII foi encontrado. O ponto 1 é situado na desembocadura de um importante rio da Baía de Vitória, rio Santa Maria da Vitória, que recebe o aporte de efluentes domésticos *in natura*. O ponto 2 localiza-se em uma área considerada mais protegida, e o ponto 3 é situado na desembocadura do rio Bubu que corta o município de Cariacica.

Serão discutidos inicialmente os resultados obtidos na água próxima aos pontos de coleta das amostras de sedimento (a) e em seguida os resultados obtidos nas amostras de sedimento (b).

a) Água

Os vírus entéricos estudados foram detectados em algumas amostras de água analisadas durante todo o período de monitoramento.

Neste estudo, observou-se que tanto nos meses chuvosos quanto nos meses de menor precipitação foram detectados vírus entéricos. No período de alta pluviosidade o escoamento superficial contribui com o aumento dos níveis de esgoto sanitário que é carregado. Alguns fatores que podem afetar a distribuição e ocorrência de vírus entéricos em um ambiente estuarino são: variação da maré, salinidade, pH, presença de nutrientes, temperatura da água, intensidade da luz solar, agregação com sólidos suspensos e outras variáveis ambientais, como presença de predadores, chuva e características estruturais das partículas (AZADPOUR; FAULKNER; CHEN,2003; FONG & LIPP, 2005). Assim, mesmo com maior influxo de esgoto em meses chuvosos, a intensidade solar, por exemplo, pode contribuir para a eliminação dos vírus mais rapidamente.

Outro fator que favorece a estabilidade viral no ambiente é o pequeno diâmetro das partículas virais o que justifica, por exemplo, a maior a resistência destes patógenos ao processo de filtração empregado nas estações de tratamento de água e esgoto, que é eficaz para remoção de bactérias e parasitos (PAYMENT 1998, TAVARES *et al.*, 2005).

No presente estudo foram encontrados adenovírus, rotavírus e norovírus GII em amostras de água do estuário da Ilha das Caieiras, Vitória. Os RV foram os vírus de maior prevalência nas amostras de água seguidos dos AdV e NoV.

O AdV tem sido considerado um vírus com potencial risco à saúde associados com surtos de doenças por veiculação hídrica, sendo este envolvido em surtos por gastroenterites principalmente em crianças menores de 4 anos (MEHNERT *et al.*, 1999; FROST *et al.*, 2002). Trabalhos publicados sugerem o uso do AdV como indicador de poluição viral uma vez que este patógeno tem sido detectado em amostras aquáticas (KATAYAMA *et al.*, 2002; CARDUCCI *et al.*, 2008) sendo mais estáveis no ambiente (ENRIQUEZ *et al.*, 1995) devido a capacidade de maior resistência à inativação por UV (LINDEN *et al.*, 2007). Além disso, o AdV por ser um vírus dupla fita de DNA se mantém infeccioso por mais tempo na água que um vírus de fita simples de RNA (JIANG *et al.*, 2006). Embora tenham sido sugeridos como indicadores de poluição, os adenovírus tiveram menor prevalência dentre os vírus estudados neste trabalho, sugerindo que este não seria o marcador de contaminação ambiental mais adequado para o estuário na Ilha das Caieiras.

Na Espanha Pina *et al.* (1998) reportaram a presença de 65% de amostras positivas para HAdV em águas de rios. Na Califórnia (EUA) o HAdV apresentou prevalência de 52% em águas de consumo (JIANG & CHU, 2004). Chapron *et al.* (2000) detectaram a presença de AdV em 48,3% de amostras de águas de superfície. MIAGOSTOVICH *et al.* (2008) detectaram 30,8% das amostras positivas para AdV. Na Alemanha, Hamza *et al.* (2009) encontraram 97,5% das amostras positivas para AdV. No Brasil, Staggemeier *et al.* (2012) detectaram

87,3% de amostras positivas para AdV. O número de amostras positivas para adenovírus detectadas neste trabalho mostrou-se inferior ao detectado em estudo realizado por Justino (2009) e inferior ao detectado em estudo realizado por Loss (2012) na mesma região de estudo.

A alta prevalência de RV em amostras de água tem sido descrita por alguns autores (GERBA *et al.*, 1996; MIAGOSTOVICH *et al.*, 2008) já que estes vírus são a causa mais comum de diarreia em todo o mundo. Num estudo feito por Miagostovich e outros (2008) em amostras de riachos em Manaus/Amazonas também foi observada alta prevalência de rotavírus 44,2%. Num estudo feito por Kittigul e colaboradores (2005) em amostras de água fluvial na Tailândia detectaram 20% das amostras positivas para rotavírus. Já no estudo feito por Staggemeier e colaboradores (2012) em água fluvial no Brasil detectaram 25,5% das amostras positivas para RV. Os rotavírus podem ser detectados com elevada prevalência no ambiente, pois, podem sobreviver por dias a semanas, dependendo das condições ambientais (GERBA *et al.*, 1996). No trabalho realizado por Loss (2012) os rotavírus foram os vírus mais frequentes o que corrobora com o resultado do atual estudo. Vale ressaltar que as amostras coletadas no trabalho de Justino foram realizadas em períodos com pluviosidade (mm) maior que a do presente estudo. A redução do número de amostras positivas observadas neste trabalho, em relação ao trabalho de Justino (2009), pode estar relacionada, ao aumento da região de cobertura de tratamento de esgoto devido aos projetos de saneamento em municípios adjacentes ao estuário estudado (Projeto Águas Limpas e Pró-Rural, CESAN, 2008 – 2012).

Além de RV e AdV, o terceiro vírus detectado em menor frequência nas amostras de águas de estuário da Ilha das Caieiras foi o NoV GII o que é corroborado com o feito por Justino (2009) na qual NoV foi detectado em 5% das amostras.

O norovírus foi detectado ao longo do período de monitoramento, não sendo observada influência de sazonalidade nos resultados obtidos. Em estudo

realizado por Katayama e colaboradores (2008) no Japão detectaram 25% de amostras positivas para norovírus. Segundo Katayama et al. (2008), a presença de NoV no verão sugere a circulação do vírus no ambiente ao longo do ano, incluindo as temporadas não-epidêmicas. Na região da Grande Vitória, ES, as temperaturas permanecem constantes, com pouca variação entre as estações, não interferindo, então, na distribuição de NoV ao longo do ano.

b) Sedimento

Segundo Dias (2004), os sedimentos são fundamentalmente constituídos por quatro classes texturais: cascalho, areia, silte e argila. Na coesão entre partículas, o cascalho não apresenta qualquer tipo de coesão sendo a adsorção nula. As areias aderem umas as outras quando ficam no estado úmido (devido à tensão superficial do filme de água que as envolve), porém não apresentam coesão quando o sedimento está seco. Já o silte e principalmente a argila apresentam coesão mesmo quando secos.

Uma das características que diferenciam as classes textuais é a porosidade, que é alta nos cascalhos, média a pequena nas areias (dependendo a forma como as partículas se dispõem umas relativamente às outras no sedimento), pequena no silte e bem reduzida nas argilas. As altas propriedades de adsorção de um solo argiloso evitam o transporte de vírus à outra matriz, tais como águas subterrâneas. Sendo assim, uma maior quantidade de silte e argila (finos) e menor de areia aumentam a possibilidade maior de se encontrar contaminantes (CETESB, 2008).

Alguns estudos demonstraram que nos sedimentos compostos em sua maioria por silte e argila, as amostras caracterizadas por argila mostraram grandes porcentagens de adsorção enquanto em sedimentos onde a maioria das amostras era composta por areia e cascalho a adsorção foi menor o que corrobora com os resultados do nosso estudo (SCHAUB *et al.*, 1975; PIANETTI *et al.*, 2007).

Em relação à presença de vírus em amostras de sedimento, existem poucos estudos realizados sobre o encontro destes, este fato ocorre provavelmente em decorrência da pouca disponibilidade de métodos de concentração viral a partir de sedimentos (LE GUYADER *et al.*, 1994; GREEN & LEWIS, 1999; MEHNERT, 1999). Num estudo feito por Staggemeier e colaboradores (2012) detectaram rotavírus e norovírus em amostras de sedimento. Já no presente estudo encontramos somente norovírus (5%) nas amostras analisadas. Isso reforça a importância do desenvolvimento de novas metodologias de concentração e detecção viral, tendo em vista o potencial acúmulo de vírus entéricos no sedimento de ecossistemas aquáticos, apresentando-se geralmente em concentrações mais elevadas do que nas águas (GABUTTI, 2000).

Neste estudo, a composição do sedimento foi principalmente areia. Entretanto, no P2, situado próximo a uma pequena ilha na Baía de Vitória foi detectado norovírus em dois meses do monitoramento. Este achado deve-se possivelmente à localização deste ponto, mais distante das desembocaduras dos rios Santa Maria da Vitória e rio Bubu, onde o sedimento tem menos chance de ser revolvido que nos pontos de coleta P1 e P3.

A agregação de partículas virais no solo depende do tipo de solo, da temperatura, pH, e do nível de umidade presente (GERBA *et al.*, 1988; NASSER *et al.*, 2002). Também são importantes características inerentes às próprias partículas virais, tais como ponto isoelétrico e hidrofobicidade (WILLIAMSON *et al.*, 2005). Minerais de argila no solo e água podem proteger os vírus da biodegradação de seu genoma por nucleases bacterianas e também do capsídeo viral por proteases (NASSER *et al.*, 2002).

Em condições ambientes, os vírus são normalmente carregados negativamente, assim sendo atraído e retido pelo material carregado positivamente no solo (SOBSEY *et al.*, 1980). Em situações neutras e alcalinas do solo, os vírus não irão se ligar a presença de partículas e poderão mover-se livremente no solo. Há, no entanto, muitas exceções a estas regras gerais. A

absorção vírus ao solo também é afetada por cátions que podem favorecer a adsorção do vírus no solo, reduzindo suas forças repulsivas. Alguns componentes como as substâncias húmicas e flúvicas podem competir com o vírus por sítios de adsorção do solo reduzindo assim o nível de adsorção destes no solo. (SOBSEY *et al.*, 1980).

Os vírus associam-se a argila através de interações electrostáticas nas quais protegem o genoma viral contra nucleases ou outro fator antagonista presente no solo (GERBA; BITTON, 1984). Além disso, a argila contribui para a sobrevivência dos vírus através da retenção de quantidades mínimas de água, o que proporciona a umidade necessária para a estabilidade da partícula (STRAUB *et al.*, 1992).

Um fator que pode contribuir para a dificuldade de detecção de vírus no ambiente, especialmente quando contaminado por esgoto, é a presença de substâncias inibidoras como compostos fenólicos, metais pesados e ácidos húmicos. (SCHRIEWER, *et al.*, 2011 apud WILSON, 1997).

Em um estudo feito por Souza (2002), nos manguezais dos rios Aribiri, Santa Maria da Vitória e Bubu, localizados na mesma região do presente estudo foram observados a presença de metais pesados acima do limite permitido pela Portaria MS 685/98. Os metais pesados (especialmente, mercúrio, chumbo, zinco, cádmio e cobre) podem se acumular com facilidade nos sedimentos, podendo estar disponíveis novamente na água por qualquer revolvimento do sedimento (NOAA; 2002). Essas substâncias inibidoras afetam a sensibilidade de técnicas moleculares, podendo levar à subestimação da presença ou concentração de agentes patogênicos nas amostras. Assim, a escolha de um método mais sensível e específico é fundamental para análise de microrganismos em amostras ambientais.

Outro fator que pode contribuir com a dificuldade em encontrar vírus em amostras de sedimento é que as taxas de sobrevivência de patógenos

entéricos são mais baixas em solos arenosos do que em solos compostos por argila (STOTZKY 1980; STOTZKY et al., 1981).

WILLIAMSON *et al.* (2005) analisaram a presença de vírus em seis tipos de solo, e verificaram que os vírus persistem por mais tempo em solos úmidos. O aumento da sobrevivência em solos úmidos é provavelmente devido a películas mais espessas de água e menores áreas interfaciais (interface ar-água), uma vez que tais interfaces são conhecidas por inativar virions (ZHUANG & JIN, 2003). Além disso, vírus e bactérias são abundantes em solos úmidos e ricos em matéria orgânica já em solos arenosos (secos) que possuem capacidade de retenção de água baixa a taxa de sobrevivência de patógenos entéricos e menor.

Vários métodos de extração e detecção de vírus em amostras de solo têm sido desenvolvidos, mas ainda não há um padrão ouro com elevada porcentagem de recuperação viral. Os métodos moleculares de detecção, ainda são muito caros. Há uma necessidade de que novas técnicas de extração sejam desenvolvidas com base em diferentes tipos de solos, pois a composição do solo pode influenciar a recuperação do vírus. Estudos sobre as interações dos vírus com diferentes tipos de solo, assim como a influência dos parâmetros físico-químicos da água e do sedimento sobre a dinâmica dos transportes dos vírus nas matrizes água e sedimento são ainda necessários para compreendermos os impactos dos vírus nas amostras ambientais.

7. CONCLUSÕES

As amostras de água e sedimento provenientes de área de manguezal do sistema estuarino da Baía de Vitória revelaram que os níveis de coliformes termotolerantes e enterococos das amostras de água do estuário apresentam-se superiores aos limites estabelecidos para águas destinadas ao cultivo de bivalves definido pelo CONAMA (357/2005) durante a maior parte do período de monitoramento, demonstrando que a área não é uma área própria para extrativismo de mariscos, lazer e recreação.

Os três vírus avaliados, adenovírus, rotavírus e norovírus GII foram detectados nas amostras de água do estuário e norovírus GII nas amostras de sedimento estudadas ao longo de todo o período de monitoramento.

A presença viral e bacteriológica das amostras indica que esta região está sob impacto antropogênico resultante do despejo de esgoto sanitário, e que o sedimento proveniente do manguezal da Ilha das Caieiras pode atuar como um reservatório de microrganismos (bactérias) que ao serem liberados para a coluna d'água pode causar doenças gastrointestinais a população do entorno. A falta de estudos no Brasil correlacionando agentes virais patogênicos ao solo torna este trabalho importante para alertar que o monitoramento desses patógenos em matrizes sólidas ambientais.

Dentre os parâmetros físico-químicos analisados, a pluviosidade foi a que mais influenciou nos parâmetros microbiológicos, sendo demonstrada uma correlação com os coliformes termotolerantes e os enterococos.

8. RECOMENDAÇÕES

Verificar por técnicas de cultura celular a infecciosidade de vírus entéricos presentes na água e no sedimento proveniente do sistema estuarino da Baía de Vitória.

Realizar a quantificação de vírus entéricos presentes na água e no sedimento através de técnicas capazes de quantificar as partículas virais, como a PCR em tempo real.

Realizar a genotipagem dos vírus entéricos encontrados nas amostras de água, e no sedimento visando identificar os genótipos dominantes na região. Compará-los com os vírus isolados de pacientes com gastroenterite de origem viral para confirmação da circulação dos mesmos vírus entre este ambiente e a população da Ilha das Caieiras.

Realizar um monitoramento após a implantação do sistema de esgotamento sanitário que atenderá a região de estudo, a fim de comparar com os resultados obtidos neste trabalho e avaliar a qualidade do tratamento de esgoto nessa região.

9. REFERÊNCIAS

ABDEL-MOETY, N.M.; AL-FASSI F.A. e ALI, M.A. Health aspects of virological water quality: an overview review. **Journal of applied sciences reserh**, Cairo, v. 10, n. 4, p. 1205-1215, 2008.

ALONGI, D.M. The energetics of mangrove forests. **Springer Science and Business**, New York, 2009.

AMARAL LA, NADER FILHO A, ROSSI JUNIOR OD, FERREIRA LAF, BARROS LSS. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Rev Saúde Pública**. 37: 510-514, 2003.

ALBINADA-GIMENEZ N, CLEMENTE-CASARES P, CALGUA B, HUGUET JM, COURTOI S, GIRONES R 2009a. Comparation of methods for concentrating concentrating human adenovirus, polyomavirus JC and norovirus in source waters and drinking water using quantitative PCR. **J Virol Methods** 158: 104-109.

ALM EW, BURKE J, SPAIN A. Fecal indicator bacteria are abundant in wetsand at freshwater beaches. **Water Res**. 37(16): 3978-3982, 2003.

ALLARD,A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 498-505, 2001.

APHA; AWWA; WEF. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, **American Public Health Asssociation**, ed. 21, 2005.

ARNOLD, M.M.; PATTON, J.T. Rotavirus Antagonism of the Innate Immune Response. **Viruses**, v. 1, p. 1035-1056, 2009.

ATMAR, R. L.; ESTES, M. K. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 35, p. 275-290, 2006.

ATMAR, R.L.; Noroviruses: State of the Art. **Food and environmental virology**, v. 2, p.117-126, 2010.

AZADPOUR, K. A., FAULKNER, B. R., CHEN, J. Movement and longevity of viruses in the subsurface. **United States Environmental Protection Agency (USEPA)**, 24p, 2003

BAUMGARTEN, M. G. Z.; POZZA, S. A. **Qualidade de Águas. Descrição de Parâmetros Químicos referidos na Legislação Ambiental**. Rio Grande: Editora da FURG, 2001. 166p.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BORDALO, A.A. Effects of salinity on bacterioplankton: field and microcosm experiments. **Journal of Applied Bacteriology**, 75, 393–398, 1993.

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

BOSCH, A.; GUIX, S.; SANO, D.; PINTO, R.M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 295-301, 2008.

BNDO (Banco Nacional de Dados Oceanográficos) Precisões de marés (Máximas e Mínimas diárias). Disponível em: <<http://www.mar.mil.br/dhn/chm/tabuas/index.htm>>. Acesso em 22/07/2012

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente (**CONAMA**). Resolução 274 de 29 de Novembro de 2000. Dispõe sobre a classificação das águas doces, salobras e salinas, em todo o Território Nacional, bem como determina os padrões de lançamento. Diário Oficial, 08 de janeiro de 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria MS 518 de 25 de Março de 2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente (**CONAMA**). Resolução nº 357 de 17 de Março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial, 18 de março de 2005.

BROOKS, H. A., R. M. GERSBERG and A.K. DHAR. (2005). Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time RT-PCR. **J. Virological. Methods.** 127,109-118.

CALLISTO, M.; GONÇALVES, J. F. JR.; MORENO, P. Invertebrados Aquáticos como Bioindicadores. In: Lisboa, A.H. & Goulart, E.M.A. (Organizadores). **Navegando o Rio das Velhas das Minas aos Gerais.** 1 ed. v. 1, p. 556-567, 2005.

CARDUCCI A, MORICI P, PIZZI F, BATTISTINI R, ROVINI E, VERANI M. Study of Viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. **Sci Technol.** 58: 893-897, 2008.

CARMO, T.M.S. Os manguezais ao norte da Baía de Vitória, Espírito Santo. **Anais do Simpósio 'Ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: Síntese dos conhecimentos'**, v. 2, p. 173-194. Cananéia/SP, 1987.

CARMO, T.M. S; PERRONE, E.C.; FUNDÃO, D.N.; MELO, R.M.S.; ZANOTTIXAVIER, S. Macrofauna de invertebrados do estuário do rio Santa Maria da Vitória, Vitória, ES. **Anais do III Simpósio 'Ecosistemas da costa sul e sudeste brasileira: subsídios a um gerenciamento ambiental'**, v. 1, p. 305-314, Serra Negra/SP, 1994.

CARTER, M.J. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1354-1380, 2005.

CEE. Diretiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de Fevereiro de 2006 relativa à gestão da qualidade das águas balneares e que revoga a Directiva 76/160/CEE. **Jornal Oficial das União Européia** (versão em português), n. L64, p. 37-51, 04/03/2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Updated Norovirus Outbreak Management and Disease Prevention Guidelines. **MMWR**, v. 60, 2011.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem. Apêndice A do Relatório da Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo, 2008.

CHAPRON CD, BALLESTER NA, FONTAINE JH, FRADES CN, MARGOLIN AB. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. **Appl Environ Microbiol**. 66:2520–2525, 2000.

CHOI, S.; JIANG, S.C. Real-Time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers genome prevalence but low infectivity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 7426-7433, 2005.

CLESCERI, L.; A. GREENBERG.; A. EATON. Standard methods for the examination of water and wastewater, p. 115-131. **American Public Health Association**, Washington, D.C,1998.

CORREIA JUNIOR, Y. Estudo da Variação de parâmetros de qualidade de água em pontos da região do estuário do Rio Santa Maria da Vitória. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. UFES, 2003.

COSTA, K. M. P.; MACEDO, S. J. Estudo Hidrológico do Rio Timbó (Pernambuco-Brasil). **Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco**. Recife, v. 20. p. 7 - 34, 1989.

COSTA, L. de L. et al. *Eficiência de Wetlands construídos com dez dias de retenção hidráulica na remoção de colífagos e bacteriófagos*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 3, n. 1. 2003.

DAVIES, C.M., et al. Survival of fecal microorganisms in marine sediments and freshwater. **Applied Environmental Microbiology**, v.1, p.1888-1896, 1995.

CRAIG, J. I., A. P. HAYNES, D. B. MCCLELLAND, and C. A. LUDLAM . (2002). Blood disorders in viral diseases. **Annu Rev Med**. 53.15-33.

DAVISON, A. J., BENKO, M., HARRACH, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. **Journal of General Virology**. Nov;84(Pt 11):2895-908, 2003.

D'AGOSTINI, D. P. Fácies sedimentares associadas ao sistema estuarino da baía de Vitória (ES). 2005. 64f. **Monografia (Graduação em Oceanografia)** – Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, 2005.

DE LUCCA-ABBOTT, S., G. D. Lewis, and R. G. Creese. 2000. Temporal and Spatial Distribution of Enterococcus in Sediment, Shellfish Tissue, and Water in a New Zealand Harbour. *Journal of Shellfish Research*. 19(1):423-429.

DIAS, M. H. B. Distribuição de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo de uma secção transversal do manguezal no estuário da baía de Vitória. 2005. **Monografia (graduação em oceanografia)** – programa de graduação em oceanografia, universidade federal do espírito santo (UFES), Vitória – ES, 2004.

ENRIQUEZ, C.E, HURST CJ, GERBA CP. 1995. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and wastewater. **Water Res.** 29:2548–2553, 1995.

ESTES, M.K, Prasad BV, Atmar RL. 2006. Noroviruses everywhere: has something changed? **Curr Opin Infect Dis** 19:467-474

EUROPEAN UNION - EU 2006, DIRECTIVE 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council concerning the management of bathing water quality. **Official Journal of the European Communities**, p. 37-51, 2006.

FERNANDES, A. J.; PERIA, L. C. S., 1995, “Características do ambiente”, In: SCHAEFFER-NOVELLI, Y., Manguezal: Ecossistema entre a Terra e o Mar, **Caribbean Ecological Research**, São Paulo.

FLORES, MONTES, M. **Variação nictmeral do fitoplâncton e parâmetros hidrológicos no Canal de Santa Cruz (Itamaracá, PE)**. Dissertação (Mestrado em Oceanografia), Recife, 1996.

FONG, T.T.; LIPP, E.K.; Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. **Microbiology and molecular biology reviews**, v.69, p. 357–371, 2005.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Atheneu: São Paulo, 182p, 2003.

FROST FJ, KUNDE TR, CRAUN GF. Is contaminated groundwater an important cause of viral gastroenteritis in the United States? **J Environ Health.** 65: 9-14, 2002.

Fundação Nacional da Saúde. Esgotamento Sanitário. In: **Manual de Saneamento.** Brasília: FUNASA; 2004.

GABUTTI G. Comparative survival of faecal and human contaminants and use of *Staphylococcus aureus* as an effective indicator of human pollution. **Mar Pollut Bull.** 40(8): 697-700, 2000.

GALLIMORE, C. I.; CHEESBROUGH, LAMDEN, K.; BINGHAM, C.; GRAY, J. J. Multiple norovirus genotypes characterized from an oyster-associated outbreak of gastroenteritis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 323-330, 2005.

GEO BRASIL. Ambientes Marinhos e Costeiros. In: *Perspectivas do meio Ambiente no Brasil / Thereza Christina Carvalho Santos; João Batista Drummond Câmara.* Ambi Brasília: Edições IBAMA, 2002.

GERBA C.P, SMITH EM, MELNICK JL. Development of a quantitative method for detecting enteroviruses in estuarine sediments. **Appl Environ Microbiol.** 34(2): 158-163, 1977.

GERBA C.P & BITTON G. Microbial pollutants: their survival and transport pattern to groundwater IN: *Groundwater pollution microbiology.* New York: John Wiley & Sons. 65-88, 1984.

GERBA C. P, MARGOLIN B, TRUMPER E. Enterovirus detection in water with gene probes. **Z Gesamte Hyg.** 34(9):518-519, 1988.

GERBA, C.P.; ROSE, J.B.; HAAS, C.N.; CRABTREE, K.D. Waterborne rotavirus: a risk assessment. **Water Research**, v.30, p.2929-2940, 1996.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Agentes bacterianos de toxinfecções alimentares. In: **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Ed. Varela, 629 p. Parte 12, p. 199-258, 2001.

GLASS, R. I.; PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; TURCIOS, R.; FISCHER, T.; WIDDOWSON, M.; JIANG, B.; GENTSH, J. R. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. **The Lancet**, v. 368, p. 323-332, 2006.

GONÇALVES, M. A., & DE VRIES, A. A. Adenovirus: from foe to friend. **Reviews in Medical Virology**, 16, 167–186, 2006.

GONZALEZ, R. G; TAYLOR, M. L; ALFARO, G. Estudio Bacteriologico del Agua de Consumo en una Comunidad Mexicana. *Bol Of Sanit Panam*, v. 93, n. 2, p. 127-141, 1982.

GRAFF, J.W.; EWEN, J.; ETTAYEBI, K.; HARDY, M.E. Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. **Journal of General Virology**, v.88, p.613-620, 2007.

GREEN DH & LEWIS GD. Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription-PCR and cell culture, **Wat. Res.** 33(5): 1195-1200, 1999.

HAFLIGER, D.; GILGEN, M.; LUTHY, J.; HUBNER, P. Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 27-36, 1997.

HALLER, L.; POTÉ, J.; LOIZEAU, J.; WILDI, W. Distribution and survival of fecal indicator bacteria in the sediments of the Bay of Vidy, lake Geneva, Switzerland. **Ecological Indicators**, v. 9, p. 540-547, 2009.

HAMZA, I. A.; JURZIK, L.; STANG, A.; SURE, K.; UBERLA, K.; WILHELM, M. Detection of human viruses in rivers of a densely populated area in Germany

using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. **Water Research**, v. 43, p. 2657-2668, 2009.

HARAMOTO E, KATAYAMA H, OHGAKI S. Detection of noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater. **Appl Environ Microbiol.** 70: 2154-2160, 2004.

HARRIS, J. P.; EDMUNDS, W. J.; PEBODY, R.; BROWN, D. W.; LOPMAN, B. A. Deaths from Norovirus among the Elderly, England and Wales. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 1020- 1027, 2008.

HE, L.; HE, Z. Water quality prediction of marine recreational beaches receiving watershed baseflow and stormwater runoff in southern California, USA. **Water Research**, v. 42, p. 2563-2573, 2008.

HOBSON, N. S.; TOTHILL, I.; TURNER, A.P.F. Microbial detection. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 11, n. 5, p. 455-477, 1996.

HONORATO-DA-SILVA, M.; PASSAVANTE, J.Z.O.; SILVA-CUNHA, M.G.G.; Nascimento-Vieira, D.A.; Grego, C.K.S. & Muniz, K. Distribuição espacial e sazonal da biomassa fitoplanctônica e dos parâmetros hidrológicos no estuário do rio Formoso (Rio Formoso, Pernambuco, Brasil). **Tropical Oceanography**, 32: 89-106.2004.

HORWITZ, M.S.; Adenoviruses. In: **Virology**, v.2, p. 2149-2171, 1996.

ICTVdB Management. 00.060.0.03. Rotavirus. In: **ICTVdB - The Universal Virus Database**, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico de 2008**, p. 40, Rio de Janeiro, 2010.

ITURRIZA-GOMARA, M.; GREEN, J.; BROWN, D.W.G.; DESSLBERGER, U.; GRAY, J. J. Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 78, p. 93-103, 1999.

JAYARAM, H.; ESTES, M.K.; PRASAD, B.V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. **Virus Research**, v. 101, p. 67-81, 2004.

JENG, H. A. C.; ENGLANDE, A. J.; BAKEER, R. M.; BRADFORD, H. B. Impacto of urban stormwater runoff on estuarine environmental quality. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 63, p. 513-526, 2005.

JESUS, H.C.; COSTA, E.A.; MENDONÇA, A.S.F.; ZANDONADE, E. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da ilha de Vitória-ES. **Química Nova**, v. 27, p. 378-386, 2004.

JESUS, H.C., AMORIM, N.R.; ALONSO, M.K. Investigação da poluição da Baía de Vitória-ES através da análise de metais, colimetria e agrotóxicos em sururu de mangue (*Mytella guyanensis*). XLVI **Congresso Brasileiro de Química**, 2006.

JIANG SC & CHU W. PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers. **J Appl Microbiol**. 97:17–28, 2004.

JIANG, S. C. Human adenoviruses in water: Occurrence and health implications: A critical review. **Environ. Sci. Technol**. V. 40, 7132-7140, 2006.

JUSTINO, J. F.; **Dissertação de mestrado**. Avaliação de coliformes e vírus entéricos na água e no mexilhão (*Mytella guyanensis*) em área de manguezal da Baía de Vitória (ES). Vitória, 2009.

KARST, S. M.; Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. **Viruses**, v. 2, p. 748-781, 2010;

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI,A.; OHGAKI, S. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1033-1039, 2002.

KATAYAMA H, HARAMOTO E, OGUMA K, YAMASHITA H, TAJIMA A, NAKAJIMA H, OHGAKI S. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. **Water Res.** 42: 1441-1448, 2008.

KITTIGUL L, KHAMOUN P, SUJIRARAT D, UTRARACHKIJ F, CHITPIROM K, CHAICHANTANAKIT N, VATHANOPHAS K. An improved method for concentration rotavirus from water samples. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 96: 1-7, 2001.

KJERFVE, B.; LACERDA, L. D. Mangroves of Brazil. In: Lacerda, L. D. (Ed.). **Conservation and sustainable utilization of mangrove forest in Latin America and Africa regions.** Okinawa: ITTO/ISME, cap 1, 272 p., 1993.

KJERFVE, B.J. 1990. Manual for Investigation of Hydrological Processes in Mangrove Ecosystems. UNESCO/UNDP. RAS/79/002 and RAS/86/120. 79pp

KOJAOGHLANIAN, T., FLOMENBERG, P., & HORWITZ, M. S. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. **Reviews in Medical Virology**, 13, 155–171, 2003.

KOOPMANS, M.; DUIZER, E. Foodborne viruses: an emerging problem. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 23-41, 2004.

KRAMER, K. J. M.; BROCKMANN, U. H.; WARWICK, R.M. Tidal Estuaries: **Manual of sampling and analytical procedures**. Commission of the European Communities, 1994.

KUMAZAKI, USUKU; NOGUSHI, 2007. New variant of Norovirus GII-4 strains prevalent in Yokohama City, October 2006-March 2007. **Japan Journal of Infectious Disease**. V. 60, 2007.

LABELLE, R. L., and C. P. Gerba. Influence of pH, salinity, and organic matter on the adsorption of enteric viruses to estuarine sediment. **Appl. Environ. Microbiol.** 38:93-101, 1979.

LANDGRAF, M. Microorganismos Indicadores. In: **Microbiologia de Alimentos**. Franco, B.D.G.M. & Landgraf, M. (organizadores). SP, p.142. 2005.

LEE, C.M., T.Y. LIN, C.C. LIN, G.A. KOHBODI, A. BHATT, R. LEE and J.A. JAY. 2006. Persistence of fecal indicator bacteria in Santa Monica Bay beach sediments. **Water Research** 40:2593-2602.

LEES, D. Viruses and Bivalve Shellfish. **International Journal of food Microbiology**, v. 59, p. 81-116, 2000.

LE GUYADER, F., DUBOIS, E., MENARD, D., POMMEPUY, M., 1994. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** 60, 3665–3671.

LEWIS, G. D.; METCALF, T. G. P. Polyethylene Glycol Precipitation for Recovery of Pathogenic Viruses, Including Hepatitis A Virus and Human Rotavirus, from Oyster, Water, and Sediment Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1983-1988, 1988.

LINHARES A. C, PINHEIRO F.P, FREITAS R.B, GABBAY Y.B, SHIRLEY J.A, Beards GM 1981. An outbreak of rotavirus diarrhea among nonimmune isolated south American Indian community. **Am J Epidemiol** 113: 703-710.

LINDEN KG, THURSTON J, SCHAEFER R, JR MALLEY JP. Enhanced UV inactivation of adenoviruses under polychromatic UV lamps. **Appl Environ Microbiol.** 73: 7571-7574, 2007.

LIPP, E. K.; KURZ, R.; VINCENT, R.; RODRIGUEZ-PALACIOS, C.; FARRAH, S. R.; ROSE, J. B. The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. **Estuaries**, v. 24, n. 2, p. 266-276, 2001.

LOSS, S. M.; **Dissertação de mestrado.** Vírus entéricos e indicadores bacteriológicos de poluição fecal em amostras de água na região da Ilha das caieiras, na Baía de Vitória, ES, 2009.

LOURENÇO, M.H.; THOMPSON, R.; DRUCKER, J., GRENIER, B. Rotavirus electrophoretotypes en infantile gastro-enteritis: An epidemiologic study. **Pathologie Biologie**, 1985.

LUZ, R.B.; KLUGE, M.; FABRES, R.B.; FONTANA, T.; PACHECO, A.; STAGGMEIER, R.; RODRIGUES, M.T.; FLECK, J.D.; SPILK, F.R. Presença de partículas virais infecciosas em amostras de água de diferentes tipos e localidades do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista brasileira de Biociências**, v.10, n.1, p.103-106, 2012.

MACEDO,S.J. Fisoecologia de alguns estuários do Canal de Santa Cruz. Itamaracá, PE. **Dissertação de Mestrado.** Univ. São Paulo .Inst. Biocienc. 121p. 1974.

MARINO, A.; LOMBARDO, L.; FIORENTINO, C. Uptake of Escherichia coli, Vibrio cholerae and Enterococcus durans by, and depuration of mussels

(*Mytilus galloprovincialis*). **International Journal Food Microbiology**, v. 99, p. 281-286, 2005.

MATTNER, F, Sohr D, Heim A, Gastmeier P, Vennema H, Koopmans M. 2006. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. **Clin Microbiol Infect** 12:69-74

MEHNERT, D.U.; QUEIROZ, A.P.S.; SANTOS, F.M.; CANDEIAS, J.M.G.; HÁRSI, C.M.; Occurrence of human enteric viruses in sewage and surface waters in the city of São Paulo. **Virus Reviews and Research** v.4, p. 27, 1999.

MEHNERT DU, QUEIROZ APS, PAULI V, MONEZI TA, HÁRSI CM. Virus: a new parameter for determination of water quality. **Virus Rev Res.** 6: 67, 2001.

MEHNERT DU. Reuso de efluente doméstico na agricultura e a contaminação ambiental entéricos humanos. **Biológico.** 65: 19-21, 2003.

MELNICK, J. L., C. P. GERBA, and C. WALLIS (1978). Viruses in water. Bulletin of The World Health Organization. 56: 499 - 508.

MELO, F.C.A., SOUTO, F.J.D., NABUCO, L.C., VILLELA-NOGUEIRA, C.A., COELHO, H.S.M., FRANZ, H.C.F., SARAIVA, J.C.P., VIRGOLINO, H.A., MOTTA-CASTRO, A.R.C., MELO, M.M.M., MARTINS, R.M.B., GOMES, S.A. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC Microbiology**, 7: 1-9, 2007.

METCALF, T.G.; MELNICK, J.L.; ESTES, M.K. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years. **Annual Reviews Microbiology**, v.49, p.461-487, 1995.

MIAGOSTOVICH, M. P.; FERREIRA, F. F. M.; GUIMARÃES, F. R.; FUMIAN, T. M.; DINIZ-MENDES, L.; LUZ, S. L. B.; SILVA, L. A.; LEITE, J. P. G. Molecular

detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 375-382, 2008.

MILLER, M.A., McCann, L., 2000. Policy analysis of the use of hepatitis B, *Haemophilus influenzae* type b-, *Streptococcus pneumoniae*-conjugate and rotavirus vaccines in national immunization schedules. **Health Econ.** 9, 19–35.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA), 2007. Recursos hídricos e ambiente urbano. Disponível em <http://www.mma.gov.br>. Acesso: 10/08/12

MORAIS, A.C. **Estimativa de cargas poluidoras na Baía de Vitória, ES, com uso de sistemas de informações geográficas e sensoriamento remoto.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental – UFES), 2008.

MUNIAN-MUJIKA, I.; GIRONES, R.; LUCENA, F. Viral contamination of shellfish: evaluation of methods and analysis of bacteriophages and human viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 89, p. 109-118, 2000.

NASSER AM, GLOZMANA R, NITZAN Y. Contribution of microbial activity to virus reduction in saturated soil. **Water Res.** 36:2589–2595, 2002.

NOAA - National Oceanic and Atmospheric Administration. 2002. **Oil Spill in Mangroves.** Seattle, Washington: Office of Response and Restoration, National Oceanic and Atmospheric Administration, 2002. 72 p.

OLIVEIRA, J.; CUNHA, A.; CASTILHO, F.; ROMALDE, J.L.; PEREIRA, M.J. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives - A mini-review. **Food Control**, v.22, p.805-816, 2011.

OMS – Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*). **Guidelines for drinking water quality**, 3 ed. Genebra, 2006.

OMS – Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*). **Guidelines for drinking water quality**, 3 ed. Incorporating the first and second addenda. Genebra, 2008.

ORTEGA, C.; SOLO-GABRIELE, H.M.; ABDELZAHER, A.; WRIGHT, M.; DENG, Y.; STARK, L.M. Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical Estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 1374-1381, 2009.

PALOMBO, E.A.; BISHOP, R.F. Rotaviruses. eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 10p. 2011.

PARASHAR, U. D., GIBSON, C. J. BRESEE, J. S., GLASS R. I. Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. **Emerging Infectious Diseases** - Vol. 12, No. 2, 2006.

PAYMENT P. Waterborne viruses and parasites: resistance to treatment and disinfection. In: **OECD Workshop Molecular Methods for Safe Drinking Water**. Available from: Interlaken. 98:1-11, 1998.

PINA, S.; MONTSERRAT, P.; LUCENA, F.; JOFRE, J. GIRONES, R. Viral Pollution in the environment and in Shellfish: Human Adenovirus detection by PCR as an Index of Human viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p.3376-3382, 1998.

PITTA, M.S. Tendência actual del estreptococo como indicador de contaminação fecal. **Revista Cubana Higiene y Epidemiología**, v.1, p.38-43, 2002.

PREFEITURA MUNICIPAL DE VITÓRIA (PMV), 2012. Vitória em Dados. <http://legado.vitoria.es.gov.br/regionais/bairros/regiao7/ilhadascaieiras.asp>
Acesso: 12/05/12

PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. *Microorganisms and Environment*. Brown Publishers, USA, 3ed, p. 850-851, 1996.

PUIG, M.; JOFRE, J.; LUCENA, F.; ALLARD, A.; WADELL, G., GIRONES, R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. **Applied and environmental Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 2963-2970, 1994.

PURVES, W. K. *et al. Vida A Ciência da Biologia*, Artmed, Rio Grande do Sul, 6. ed., 2002.

RAO, V. C., METCALF, T. G., MELNICK, J. L., 1986, Development of a method for concentration of rotavirus and its application to recovery of rotaviruses from estuarine waters. **Appl. Environ. Microbiol.** 52: 484 - 488.

REYNOLDS, K. A., GERBA, C. P., & PEPPER, I. L. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture - PCR procedure. **Applied and Environmental Microbiology**, 62, 1424 - 1427, 1996.

RIGO, D. Análise do escoamento em regiões estuarinas com manguezais – medições e modelagem na Baía de Vitória, ES. **Tese: Doutorado**. Departamento de Engenharia Oceânica/Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

RIGOTTO, C. ; SINCERO, T. C. M. ; SIMÕES, C. M. O. ; BARARDI, C. R. M. Detection of Adenovirus in shellfish by means of conventional-PCR, nested PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). **Water Research**, Estados Unidos, v. 39, p. 297-304, 2005.

ROBINSON, C.; ECHAVARRIA, M. Adenoviruses. *Manual of Clinical Microbiology*, **ASM Press**, 2007

ROSLEV, P., BASTHOLM, S. and IVERSEN, N. (2008) Relationship between fecal pollution indicators in sediment and recreational waters in a Danish estuary. **Water Air Soil Poll** 194,13–21.

RUFINO, R.C.; Avaliação da qualidade ambiental do município de Tubarão(SC) através do uso de indicadores ambientais. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 123f, 2002.

SANTAMARIA, J.; TORANZOS, G.A. Enteric pathogens and soil: a short review. **International Microbiology**, v.6, p.5-9. 2003.

SASSI, R.; WATANABE, T. Estudos ecológicos básicos no estuário do rio Paraíba do Norte, Paraíba, Brasil. Fitoplâncton e fatores hidrológicos. In: Simpósio Nacional de Ecologia, 2. **Anais do Simpósio Nacional de Ecologia**, Belém: [s.n.], 1980. p. 305 – 313. v. 3. 1980.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezais brasileiros: Região sudeste-sul. **Anais do Simpósio sobre Ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: síntese dos conhecimentos**, p. 78-79, Cananéia/SP, 1987.

_____. Perfil dos Sistemas Litorâneos Brasileiros, com Especial Ênfase Sobre o Ecossistema Manguezal. **Publicação Especial do Instituto de Oceanografia de São Paulo**, v. 7, p.1-16, 1989b.

_____. Manguezal - Ecossistema entre a Terra e o Mar. **Caribbean Ecological Research**, p.63, 1995.

SCHAEFFER-NOVELLI Y.; CINTRON, G. Status of mangrove research in Latin America and the Caribbean. **Boletim do Instituto de Oceanografia**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 93-97, 1990.

SCHERER, Marinez; SANCHES, Manuel; NEGREIROS, Dora Hees de. **Gestão das zonas costeiras e as políticas públicas no Brasil: um**

diagnóstico. CYTED Ibermar, Red Iberoamericana de Manejo Costeiro – Brasil. Agência Brasileira de Gerenciamento Costeiro. 2009. 37p.

SCHRIEWER, A.; WEHLMANN, A.; WUERTZ, S.; Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, p.16-21, 2011.

SMITH, E. R., C. P. GERBA, and J. L. MELNICK. 1978. Role of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment. **Appl. Environ. Microbiol.** 35:685-689.

SOBSEY, M.D., DEAN, C. H., KNUCKLES, M. E., and WAGNER, R.A., 1980, Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. **Appl. Environ. Microbiol.** 40:92–101.

SOUZA, E. M. Avaliação da contaminação por metais pesados (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn) no manguezal do rio Santa Maria da Vitória, Grande Vitória/ES, utilizando *Crassostrea rhizophorae* (Guildins, 1828) e *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) como biomonitores. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, 2002.

SPALDING, M.; BLASCO, F.; FIELD, C. World mangrove atlas. Okinawa: **International Society for Mangrove Ecosystems**, 178 p., 1997.

SHAW, A.R. The rotavirus vaccine saga. **Annual Review of Medicine**, v.57, p.167-180, 2006.

STAGGEMEIER, R. Vírus entéricos em amostras de sedimento e água subterrânea e superficial de áreas rurais nos municípios de Riozinho e Rolante, região aflorantes do Aquífero Guarani, bacia hidrográfica do rio dos Sinos, **Dissertação de mestrado**. RS, 2012

SUBEKTI D., LESMANA M., TJANIADI P., SAFARI N., FRAZIER E., SIMANJUNTAK C., KOMALARINI S., TASLIM J., CAMPBELL J.R., OYOFO B.A. Incidence of Norwalk-like viruses, rotavirus and adenovirus infection in patients with acute gastroenteritis in Jakarta, Indonesia. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.33, p. 27-33, 2002.

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

TOZE, S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. **Wat. Res.** Vol. 33, No. 17, 1999.

TSAI, Y.et al. Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. **American Society for Microbiology**. 1994.

United States Environmental Protection Agency (**USEPA**). National Primary Drinking Water Regulations: Monitoring Requirements for Public Drinking Water Supplies; Final Rule. 40 CFR Part 141. May 14, 1996.

United States Environmental Protection Agency (**USEPA**). Bacterial water quality standards for recreational waters (fresh and marine waters)EPA/823.R-03/008. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. 2003.

VELLINGA, J., VAN DEN WOLLENBERG, D. J. M., VAN DER HEIJDT, S., RABELINK, M. J. W. E. & HOEBEN, R. C. The coiled-coil domain of the adenovirus type 5 protein IX is dispensable for capsid incorporation and thermostability. **J Virol** 79, 3206–3210. 2005.

VERONEZ, J. P., BASTOS, A. C., PIZZIN, B. F., GAVA, R. D., QUARESMA, V. S., SILVA, C. G. Sonar de varredura lateral e sísmica de alta resolução

aplicados no estudo de ecofácies na Baía de Vitória – ES. **Revista Brasileira de Geofísica**. 27(3): 411-425, 2009.

VON SPERLING, M. Princípios básicos do tratamento de esgotos - Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Belo Horizonte, UFMG. v.2. 1996.

VORONEY, R. P. The Soil Habitat. **In: Soil Microbiology and Biochemistry**. Paul E. A. (Ed.), Elsevier, Oxford, Reino Unido, 3. ed., p. 25-49, 2007

YAN et al., 2003; H. YAN, F. YAGYU, S. OKITSU, O. NISHIO, H. USHIJIMA. Detection of norovirus (GI, GII) Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR **J. Virol. Methods**, 114 (2003), pp. 37–44.

WETZ, J.J.; LIPP, E.K.; GRIFFIN, D.W.; LUKASIK, J.; WAIT, D.; SOBSEY, M.D.; SCOTT, T.M.; ROSE, J.B. Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 698-704, 2004.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p.3741–3751, 1997.

WILLIAMSON KE, RADOSEVICH M, WOMMACK KE. Abundance and Diversity of Viruses in Six Delaware Soils. **Appl Environ Microbiol**. 71(6): 3119–3125, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) & UNICEF. Global Water Supply and Sanitation Assessment 2000 Report. WHO/UNICEF, Geneva/New York, 2000.

Disponível: http://www.who.int/water_sanitation_health/monitoring/jmp2000.pdf>. Data de acesso: 11/03/2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).Guidelines for drinking water quality.Volume 1.Recommendations.3rd ed. World Health Organization.Genebra, 2004. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/guidelines/en/index.html>.

Data de acesso: 13/04/2011.

WYN-JONES, A.P.; SELLWOOD, J. A.; Review: Enteric viruses in aquatic environment. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.945-962, 2001.

ZHUANG J & JIN Y. Virus retention and transport through Al-oxide coated sand columns: effects of ionic strength and composition. **J Contam Hydrol**. 60:193–209, 2003.