

COLIFAGOS COMO INDICADORES VIRAIS: COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS PADRONIZADOS DE ENUMERAÇÃO

COLIPHAGES AS VIRAL INDICATORS: COMPARISON BETWEEN STANDARDIZED ENUMERATION METHODS

ELLOÍIS ROCHA RAMOS¹
GISELE APARECIDA RODRIGUES KELMER²
EDGARD HENRIQUE OLIVEIRA DIAS³

DOI:

RESUMO

Esta revisão sistemática de literatura objetivou agrupar e analisar dados de colifagos (concentrações e eficiências de remoção) obtidos pelos dois métodos analíticos padronizados disponíveis, USEPA (EUA) e ISO (União Europeia). Um total de 39 artigos científicos foram considerados. Constatou-se dificuldade para obter e comparar dados de colifagos de diferentes ETEs e regiões geográficas, o que pode ser justificado pela falta de informação sobre os métodos utilizados. Observou-se que o método ISO é mais aplicado do que o método USEPA, além de resultados discrepantes de concentrações e eficiências de remoção obtidos a partir das duas metodologias. Posto isto, propõe-se futuras pesquisas de comparação entre as duas técnicas.

Palavras-chave: Fagos. Indicadores. Vírus entéricos. Tratamento de esgoto.

ABSTRACT

This systematic literature review aimed to gather and analyse coliphage data (concentrations and removal efficiencies) obtained by the two standardized methods available, USEPA (USA) and ISO (European Union). A total of 39 research articles were considered. It was noted some difficulties to gather and compare phage data from different WWTPs and geographical regions, which could be justified by the lack of information about the methods used. It was observed that the ISO method is more commonly applied than the USEPA technique, as well as some discrepant results in terms of concentrations and removal efficiencies obtained from the two methodologies. That said, further research is recommended to compare the two phage methods.

Keywords: Phages. Surrogate organisms. Enteric viruses. Wastewater treatment.

¹ Engenheira Ambiental e Sanitarista pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Aluna do programa BIC da UFJF. ramos.rocha@engenharia.ufjf.br

² Engenheira Ambiental e Sanitarista pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Aluna do programa BIC da UFJF. gisele.kelmer@engenharia.ufjf.br

³ Professor orientador. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ESA), Faculdade de Engenharia, UJFJF. Campus Universitário, Juiz de Fora, MG – Brasil. edgard.dias@ufjf.edu.br

1 INTRODUÇÃO

Vírus patogênicos estão amplamente associados a doenças de veiculação hídrica, com grande impacto na saúde pública. Norovírus são associados a surtos de gastroenterite aguda em crianças (IBRAHIM, 2020). Adenovírus humanos estão relacionados a doenças gastrointestinais, respiratórias, urinárias e outras infecções (SILVA *et al.*, 2011).

Bactérias como *Escherichia coli* (*E. coli*) e enterococos intestinais são tradicionalmente utilizadas como organismos indicadores, o que pode ser visto como um impasse, uma vez que os sistemas de tratamento comumente aplicados em estações de tratamento de esgotos (ETEs) removem bactérias de forma mais eficiente do que vírus (GRABOW, 2001). Isso porque vírus são significativamente menores do que bactérias entéricas, e geralmente mais resistentes aos sistemas de tratamento (PURNELL *et al.*, 2015).

Bacteriófagos (fagos), vírus que infectam bactérias, se apresentam como potenciais indicadores virais, pelo fato de serem comumente encontrados em elevadas concentrações nos esgotos domésticos e possuem elevada resistência a sistemas de tratamento, além de apresentarem estrutura, composição, tamanho e modo de replicação semelhantes aos vírus entéricos patogênicos (NASSER *et al.*, 2021). Além disso, fagos dificilmente se replicam em ambientes aquáticos (USEPA, 2015; McMINN *et al.*, 2017). Os bacteriófagos também são mais fáceis de detectar que os vírus entéricos humanos, e podem ser identificados e quantificados por métodos analíticos convencionais, economicamente viáveis e rápidos (DIAS *et al.*, 2018).

Colifagos são fagos que infectam cepas de *E. coli*. Dois grupos de colifagos se destacam como indicadores da qualidade da água: colifagos somáticos e colifagos F-específicos (GRABOW, 2001). Dois métodos são utilizados para a enumeração de fagos: método da *International Organization for Standardization* (ISO), com origem na União Europeia; e método da *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), com origem nos EUA. Ambas as metodologias se baseiam em ensaios de cultivo, com a formação de placas de lise celular das cepas hospedeiras, e fornecem resultados em unidades formadoras de placas por unidade de volume (e.g., ufp/mL e ufp/100mL). As principais diferenças entre as duas metodologias são as seguintes: (i) o método ISO se baseia em uma técnica

de dupla camada de ágar, usando como cepas hospedeira *Escherichia coli* WG5 (ATCC 700078) para colifagos somáticos (Método ISO 10705-2; ISO, 1995) e *Salmonella typhimurium* WG49 (NCTC 12484) para colifagos F-específicos (ISO, 1995; ISO, 2000); (ii) o método USEPA se baseia em uma técnica de camada única de ágar, usando como cepas hospedeiras *Escherichia coli* CN13 (ATCC 700609) para colifagos somáticos e *Escherichia coli* F_{amp} (ATCC 700891) para colifagos F-específicos (USEPA, 2001).

Apesar dos fagos estarem sendo amplamente propostos como indicadores de vírus entéricos (McMINN *et al.*, 2017; BALLESTÉ *et al.*, 2019), inclusive por instituições de relevância internacional como a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2015) e a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017), mais pesquisas são necessárias para avaliar sua remoção durante o tratamento de efluentes (USEPA, 2015; DIAS *et al.*, 2018). Além disso, a padronização global dos métodos aplicados é de suma importância para a obtenção e a comparação de resultados em diferentes circunstâncias e locais, bem como corroborar o uso de fagos como indicadores nas legislações e diretrizes de água potável e efluentes (IAWPRC, 1991).

A partir do exposto, este trabalho pretendeu realizar uma revisão sistemática da literatura a respeito do uso de colifagos como indicadores virais em esgotos domésticos. Os dois principais objetivos deste estudo foram: (i) reunir concentrações e eficiências de remoção de dois grupos de fagos (colifagos somáticos e colifagos F-específicos) em efluentes brutos e tratados, considerando diferentes sistemas de tratamento secundário aplicados mundialmente; e (ii) comparar as metodologias utilizadas para a enumeração de fagos, ISO e USEPA, de forma a verificar diferenças entre elas em termos de concentrações e eficiências de remoção de colifagos em diferentes ETEs.

2 METODOLOGIA

Para esta revisão sistemática, foi realizada uma varredura da literatura entre os anos de 2000 e 2021. Os seguintes termos foram pesquisados no título, resumo e palavras-chave especificadas pelos autores: (*phage* OR *bacteriophage*) AND (*sewage* OR *wastewater*). As plataformas utilizadas foram *Science Direct* (<https://www.sciencedirect.com/>) e *Scopus*

(<https://www.scopus.com/>). Na plataforma *Scopus*, a busca limitou-se às seguintes áreas de conhecimento: Ciências Ambientais, Ciências Agrárias e Biológicas, Engenharia e Engenharia Química. Estudos que continham informações sobre a concentração de colifagos somáticos e/ou colifagos F-específicos em amostras de efluentes domésticos brutos ou tratados foram selecionados para uma análise mais detalhada. Estudos sobre outros grupos de fagos e/ou efluentes não domésticos, bem como estudos baseados em ensaios de bancada e em escala piloto foram desconsiderados. Nos casos em que os dados de fagos se encontravam em gráficos, foi utilizado o *software* Plot Digitizer, versão 2.6.8 (Source Forge, San Diego, Estados Unidos), para extração das informações. Por fim, os resultados obtidos (concentrações e eficiências de remoção) foram compilados em dois grupos: (i) colifagos em sistemas de lodos ativados; e (ii) colifagos em outros sistemas de tratamento (biológico) secundário.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

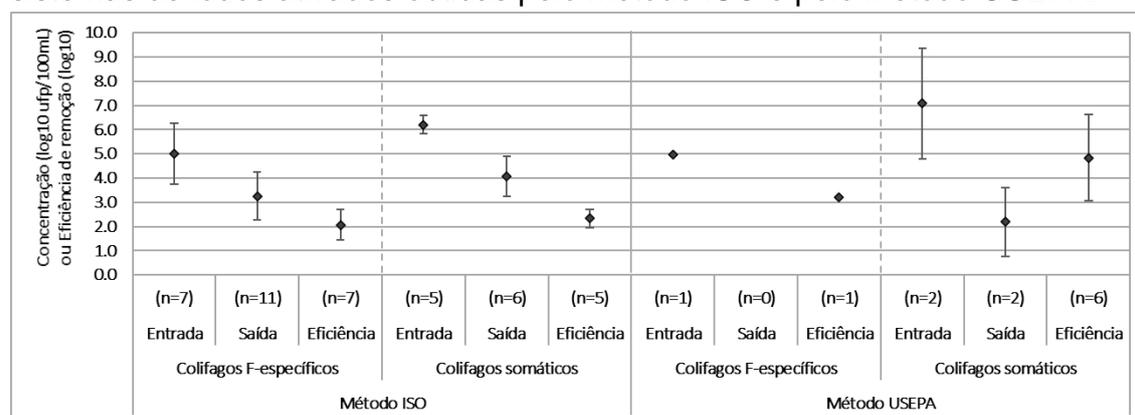
A partir das buscas realizadas, um total de 1034 artigos de pesquisa foram encontrados nas plataformas *Science Direct* (256 artigos) e *Scopus* (778 artigos). Destes, 188 eram comuns às duas plataformas. A partir da leitura do título, resumo e palavras-chave dos 846 diferentes artigos, 660 artigos foram excluídos por não conterem os grupos de fagos de interesse, ou por envolver efluentes não domésticos. Após a leitura completa dos artigos restantes, 147 foram descartados por não atenderem aos critérios estabelecidos. Ao final, um total 39 artigos foram considerados nesta revisão sistemática de literatura.

Dados sobre concentrações de colifagos no efluente bruto e efluente tratado e eficiências de remoção em diferentes sistemas secundários (biológicos) de tratamento foram compilados de todos os 39 artigos, levando em consideração a metodologia de enumeração e as cepas hospedeiras bacterianas utilizadas. O banco de dados foi então subdividido em dois grupos, com base no sistema de tratamento biológico aplicado: (i) lodos ativados; e (ii) demais sistemas de tratamento secundário. Os dados obtidos são apresentados e discutidos nas seções a seguir.

3.1. Colifagos em sistemas de lodos ativados

Dos 39 estudos considerados nesta revisão, 14 forneceram dados sobre a enumeração de colifagos em amostras de efluentes associados a sistemas de lodos ativados. Dos 14 artigos, 9 deles desenvolveram os estudos com base na metodologia ISO, dos quais dois quantificaram apenas fagos somáticos, três apenas fagos F-específicos e quatro quantificaram ambos os colifagos. Os outros cinco artigos utilizaram o método USEPA, dos quais três consideraram apenas fagos somáticos, um apenas fagos F-específicos e um ambos os colifagos. A Figura 1 apresenta os dados compilados.

Figura 1 – Média e desvio padrão das concentrações (\log_{10} ufp/100mL) e eficiências de remoção (\log_{10}) de colifagos somáticos e F-específicos em sistemas de lodos ativados obtidas pelo método ISO e pelo método USEPA.



Trabalhos considerados: Bicudo *et al.* (2021); Chacón *et al.* (2020); Costán-Longares *et al.* (2008); De Luca *et al.* (2013); Dias *et al.* (2018); Dias *et al.* (2019); Flannery *et al.* (2012); Francy *et al.* (2012); Haramoto *et al.* (2015); Muniesa *et al.* (2012); Pommepuy *et al.* (2004); Schmitz *et al.* (2018); Thwaites *et al.* (2018); Wu *et al.* (2020).

Fonte: Autoria própria.

Em relação à metodologia ISO, as concentrações de colifagos F-específicos relatadas na literatura variaram de 3,1 a 6,0 \log_{10} ufp/100mL (média = 5,0 \log_{10} ufp/100mL; n = 7) em esgoto bruto, e de 1,4 a 4,7 \log_{10} ufp/100mL (média = 3,3 \log_{10} ufp/100mL; n = 11) em efluentes tratados por lodos ativados, com valores de eficiência de remoção oscilando entre 1,3 e 3,0 \log_{10} (média = 2,1 \log_{10} ; n = 7). Para colifagos somáticos, a concentração variou de 5,9 a 6,8 \log_{10} ufp/100mL (média = 6,2 \log_{10} ufp/100mL; n = 5) em esgoto bruto, e de 3,4 a 5,1 \log_{10} ufp/100mL (média = 4,1 \log_{10} ufp/100mL; n = 6) em efluentes tratados por lodos ativados, com valores de eficiência de remoção oscilando entre 1,7 e 2,7 \log_{10} (média = 2,3 \log_{10} ; n = 5).

Em termos do método USEPA, apenas um dado foi encontrado para colifagos F-específicos em esgoto bruto ($5,0 \log_{10}$ ufp/100mL; THWAITES *et al.*, 2018), e um para eficiência de remoção ($3,2 \log_{10}$; FRANCY *et al.*, 2012), enquanto não foram encontrados valores para efluentes de lodos ativados. Em relação aos colifagos somáticos, dois valores foram encontrados para efluente bruto, $5,5 \log_{10}$ ufp/100mL (WU *et al.*, 2020) e $8,7 \log_{10}$ ufp/100mL (CHACÓN *et al.*, 2020), e dois para efluente tratado por lodos ativados, $1,2 \log_{10}$ ufp/100mL (WU *et al.*, 2020) e $3,2 \log_{10}$ ufp/100mL (CHACÓN *et al.*, 2020), enquanto as eficiências de remoção variaram de 1,5 a $6,3 \log_{10}$ (média = $4,8 \log_{10}$; n = 6).

Algumas discrepâncias em termos de eficiência de remoção foram observadas em sistemas de lodos ativados. Para colifagos somáticos, Schmitz *et al.* (2018) relataram remoções de $6,29 \log_{10}$ (USEPA), enquanto Dias *et al.* (2019) observaram remoções de $2,45 \log_{10}$ (ISO). Para colifagos F-específicos, foram relatadas remoções de $3,19 \log_{10}$ (método USEPA; FRANCY *et al.*, 2012) e $2,13 \log_{10}$ (método ISO; HARAMOTO *et al.*, 2015).

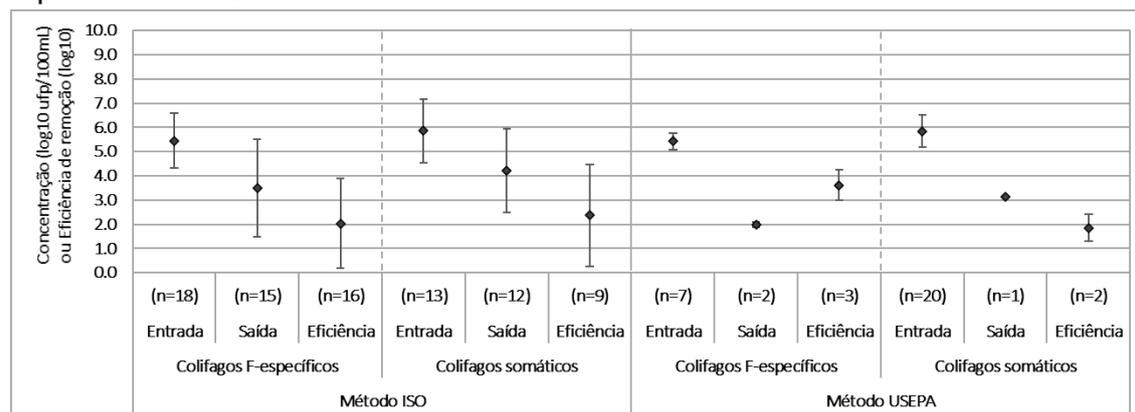
Como pode ser observado na Figura 1, a partir da quantificação de colifagos pelo método ISO, as concentrações médias de fagos somáticos tendem a apresentar valores aproximadamente $1,0 \log_{10}$ superiores às de fagos F-específicos, tanto para efluentes brutos quanto para efluentes tratados por lodos ativados, com eficiências de remoção muito semelhante para ambos os grupos de colifagos ($\sim 2,0 \log_{10}$). Apesar dos dados limitados obtidos pelo método USEPA, os níveis de fagos somáticos também foram maiores do que fagos F-específicos em esgoto bruto, e as eficiências de remoção foram consideravelmente superiores às observadas no método ISO: $\sim 3,0 \log_{10}$ para F-específicos e $\sim 5,0 \log_{10}$ para somáticos. Não foram obtidos valores de F-específicos em efluentes de lodos ativados da literatura aqui considerada. Diante da escassez de dados de fagos usando o método USEPA, não foi possível comparar estatisticamente os métodos aqui agrupados.

3.2. Colifagos em outros sistemas de tratamento secundário

Considerando os estudos que monitoraram fagos em ETEs com etapa de tratamento secundário (biológico) diferente de lodos ativados, um total de 68 dados foram obtidos de 28 artigos de pesquisa. Os sistemas de tratamento incluíram biorreatores de membrana (MBR), filtros biológicos percoladores

(FBP), lagoas de estabilização (LE) e *wetlands* construídos (WC). Em alguns casos, o sistema de tratamento não foi especificado. A Figura 2 apresenta os dados compilados.

Figura 2 – Média e desvio padrão das concentrações (\log_{10} ufp/100mL) e eficiências de remoção (\log_{10}) de colifagos somáticos e F-específicos em diferentes sistemas de tratamento biológico secundário obtidas pelo método ISO e pelo método USEPA.



Trabalhos considerados: Baggi *et al.* (2001); Ballesté *et al.* (2019); Barrios *et al.* (2018); Blanch *et al.* (2006); Chaudhry *et al.* (2015); Dias *et al.* (2018); Dias *et al.* (2019); Ebdon *et al.* (2007); Ebdon *et al.* (2011); Espinosa *et al.* (2021); Flannery *et al.* (2013); Franczy *et al.* (2012); Hartard *et al.* (2015); Harwood *et al.* (2013); Marti *et al.* (2011); Marti *et al.* (2014); Meuleman *et al.* (2003); Muniesa e Jofre (2000); Muniesa *et al.* (2009); Plummer *et al.* (2014); Purnell *et al.* (2015); Purnell *et al.* (2016); Rambags *et al.* (2019); Sánchez-Alfonso *et al.* (2020); Stefanakis *et al.* (2019); Venegas *et al.* (2015); Vijayavel *et al.* (2010); Zanetti *et al.* (2010).

Fonte: Autoria própria.

Em relação à metodologia ISO, as concentrações de colifagos F-específicos relatadas na literatura variaram de 3,1 a 6,4 \log_{10} ufp/100mL (média = 5,5 \log_{10} ufp/100mL; n = 18) em esgoto bruto, e de 0,2 a 5,2 \log_{10} ufp/100mL (média 3,5 \log_{10} ufp/100mL; n = 15) em efluentes tratados, com eficiências de remoção variando de 0,2 a 5,8 \log_{10} (média = 2,0 \log_{10} ; n = 16). As maiores concentrações observadas, 8,0 e 7,0 \log_{10} ufp/100mL nas amostras bruta e tratada, respectivamente, foram obtidas por Baggi *et al.* (2001), que usaram *E. coli* K-12 Hfr como cepa hospedeira. Todos os outros estudos utilizaram *E. coli* WG49 como cepa hospedeira, mais comumente aplicada para a enumeração de colifagos F-específicos seguindo o método ISO.

Ainda considerando o método ISO, as concentrações de colifagos somáticos variaram de 2,0 a 8,0 \log_{10} ufp/100mL (média = 5,9 \log_{10} ufp/100mL; n = 13) no esgoto bruto, e de 0,8 a 7,0 \log_{10} ufp/100mL (média = 4,2 \log_{10} ufp/100mL; n = 13) em efluentes tratados, com eficiências de remoção de 0,8 a

5,6 log₁₀ (média = 2,4 log₁₀; n = 9). É importante destacar que, para amostras de efluentes brutos e tratados, os elevados valores observados foram obtidos a partir do uso de *E. coli* 036 como cepa hospedeira, por Baggi *et al.* (2001). Os demais estudos usaram principalmente *E. coli* WG5 como a cepa hospedeira, que é a cepa mais comumente aplicada para a enumeração de colifagos somáticos seguindo o método ISO.

Em termos do método USEPA, as concentrações observadas para colifagos F-específicos variaram de 5,0 a 5,8 log₁₀ ufp/100mL (média = 5,4 log₁₀ ufp/100mL; n = 7) em amostras de esgoto bruto. Apenas dois valores foram obtidos para efluentes tratados: 2,1 log₁₀ ufp/100mL (PLUMMER *et al.*, 2014); e 1,9 log₁₀ ufp/100 mL (VIJAYAVEL *et al.*, 2010). Para eficiências de remoção, os valores variaram de 2,9 a 4,1 log₁₀ (média = 3,61 log₁₀; n = 3). A maioria dos estudos considerados utilizou *E. coli* F_{amp} como cepa hospedeira.

Para colifagos somáticos, ainda considerando o método USEPA, 20 valores diferentes de concentração foram coletados para esgoto bruto (intervalo = 4,4-7,3 log₁₀ ufp/100mL; média = 5,8 log₁₀ ufp/100mL), enquanto apenas um dado foi encontrado para efluente tratado, 3,13 log₁₀ ufp/100mL (PLUMMER *et al.*, 2014), e apenas dois para eficiências de remoção, 1,4 log₁₀ (FRANCY *et al.*, 2012) e 2,2 log₁₀ (PLUMMER *et al.*, 2014).

É importante destacar que não foi possível realizar comparações estatísticas entre os métodos, em decorrência dos limitados dados encontrados a partir da metodologia USEPA, principalmente para efluentes tratados. No entanto, avaliando dados no esgoto bruto, as concentrações médias foram muito semelhantes entre as metodologias, tanto para colifagos F-específicos (5,5 log₁₀ ufp/100mL ISO; 5,4 log₁₀ ufp/100mL USEPA) quanto para colifagos somáticos (5,9 log₁₀ ufp/100mL ISO; 5,8 log₁₀ ufp/100mL USEPA).

Após lodos ativados, os sistemas de tratamento secundário mais comuns estudados nos artigos de pesquisa considerados neste trabalho foram FBP e MBR, ambos com quatro estudos cada. Para FBP, todos os estudos utilizaram o método ISO, enquanto para o MBR, três utilizaram o método ISO e um utilizou o método USEPA. Em sistemas MBR, aplicando o método ISO, Purnell *et al.* (2015) mostraram remoções médias iguais a 3,5 log₁₀ para fagos F-específicos e 5,3 log₁₀ para fagos somáticos, enquanto Zanetti *et al.* (2010) relataram eficiências de 5,8 log₁₀ e 4,4 log₁₀ para colifagos F-específicos e somáticos,

respectivamente. Momba *et al.* (2019) relataram taxas de remoção abaixo de 7,0 \log_{10} em sistemas MBR. Em termos de sistemas de FBP, as taxas de remoção variaram entre 0,2 e 1,0 \log_{10} para fagos F-específicos e entre 0,9 e 1,1 \log_{10} para fagos somáticos (EBDON *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2019; STEFANAKIS *et al.*, 2019). Eficiências de remoção abaixo de 1,0 \log_{10} em FBP foram relatadas por Momba *et al.* (2019).

Alguns estudos descreveram seus tratamentos de forma genérica, como apenas tratamento secundário (BALLESTÉ *et al.*, 2019; MUNIESA *et al.*, 2009), tratamento biológico e químico (BAGGI *et al.*, 2001), biorreator (RAMBAGS *et al.*, 2019) e reatores em batelada sequencial (FLANNERY *et al.*, 2013). Apenas um estudo apresentou *wetland* construído como tratamento secundário (MEULEMAN *et al.*, 2003) e outro lagoas de estabilização (BARRIOS *et al.*, 2018). Quatro estudos apresentaram dados sobre efluentes tratados sem tratamento especificado, e nove estudos apresentaram dados apenas sobre esgoto bruto.

3.3. Uso de fagos como indicadores de patógenos virais

Diante das diferentes características dos diferentes grupos de microrganismos de interesse no saneamento (bactérias, vírus, protozoários e helmintos), é improvável que um único organismo cumpra de forma eficiente o papel de indicador da presença de todos os patógenos em amostras aquáticas e da eficiência de remoção em sistemas de tratamento (SAVICHTCHEVA e OKABE, 2006). Nesse contexto, evidências recentes sugerem que bactérias indicadoras de contaminação fecal tradicionalmente empregadas (e.g., *E. coli* e enterococos) não são boas indicadoras da presença e da persistência de vírus entéricos patogênicos em ambientes aquáticos e em estações de tratamento de água e esgoto (USEPA, 2015). Como consequência, há um aumento no interesse no uso de bacteriófagos como indicadores virais. Isso porque fagos apresentam tamanho, morfologia, estrutura e mecanismos de remoção semelhantes aos vírus entéricos humanos (SAVICHTCHEVA e OKABE, 2006), além do fato de que vírus, incluindo fagos, serem mais resistentes a sistemas de tratamento do que bactérias (PURNELL *et al.*, 2015).

Na busca por indicadores virais mais representativos, alguns estudos revelaram relações estatisticamente significativas entre a detecção de vírus

entéricos humanos e fagos em amostras de águas residuais (BAGGI *et al.*, 2001; CHACÓN *et al.*, 2020). Por outro lado, a seleção de bacteriófagos como substitutos para a contaminação do vírus deve ser vista com cautela, pois a correlação entre fagos e vírus entéricos depende fortemente das condições de tratamento e do tipo de vírus (KALIAKATSOS *et al.*, 2019) e, em alguns casos, pode não haver correlação (FLANNERY *et al.*, 2012). Além do mais, a natureza heterogênea dos colifagos somáticos e F-específicos implica que o comportamento de fagos específicos pode não ser indicativo de todo o grupo, por isso muitas vezes é mais desejável elucidar o efeito do tratamento usando ambos os grupos de fagos (MOMBA *et al.*, 2019).

Como já sugerido por IAWPRC (1991), também é necessário padronizar os métodos de quantificação dos diferentes grupos de fagos (F-específicos e somáticos). Isso auxilia no estabelecimento de métodos de detecção e quantificação, bem como permite uma comparação mais eficaz entre estudos desenvolvidos em diferentes sistemas de tratamento e em partes do mundo. Nesse sentido, a partir dos dados coletados e aqui analisados, o método ISO mostrou ser mais comumente aplicado do que a técnica USEPA. Comparando as duas metodologias, notou-se a existência de diferenças consideráveis entre concentrações e eficiências de remoção para os mesmos grupos de colifagos, que foram submetidos aos mesmos tipos de tratamento, quando quantificados por diferentes metodologias.

Do exposto, destaca-se que fagos apresentam potencial para serem usados como indicadores virais. No entanto, pesquisas futuras objetivando comparações entre os métodos ISO e USEPA são recomendadas. Ainda, há necessidade de mais estudos que envolvam a quantificação de bactérias indicadoras de contaminação fecal, colifagos e vírus patogênicos em diferentes sistemas de tratamento de efluentes e diferentes etapas de tratamento, bem como estudos sobre os mecanismos de remoção (e.g., adsorção e sedimentação, desinfecção, inativação e predação) de patógenos e indicadores virais e bacterianos. Outros grupos de fagos (e.g., fagos de *Bacteroides* spp., colifagos totais e crAssphages) e de organismos indicadores (e.g., esporos de bactérias aeróbicas) também devem ser considerados pesquisas futuras.

4 CONCLUSÃO

As principais conclusões da pesquisa são resumidas a seguir:

- Vários artigos de pesquisa não puderam ser selecionados para esta revisão por não apresentarem informações básicas sobre a quantificação de fagos (e.g., método e cepas hospedeiras utilizados).
- Existe grande diferença no número de estudos desenvolvidos envolvendo os dois métodos em questão, sendo o método ISO mais comumente aplicado do que o método USEPA.
- Observou-se diferenças consideráveis entre concentrações e eficiências de remoção de colifagos somáticos e F-específicos quando quantificados por diferentes metodologias.
- A falta de padronização dos métodos disponíveis dificulta a obtenção e comparação de dados em diferentes condições e locais.
- Recomenda-se futuras pesquisas envolvendo a comparação entre os métodos ISO e USEPA, bem como comparações entre concentrações e eficiências de remoção de patógenos e indicadores virais e bacterianos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Projeto 434814/2018-0), à FAPEMIG (Projeto APQ-01695-17) e à FUNASA (Projeto 25100.015.575/2017-86) pelo financiamento da pesquisa. Os autores agradecem também ao programa institucional de bolsas de iniciação científica da UFJF (XXIX PIBIC/CNPq/UFJF - 2020/2021).

REFERÊNCIAS

- BAGGI, F.; DEMARTA, A.; PEDUZZI, R. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. **Research in Microbiology**. v. 152. n. 8. p. 743–751, out. 2001.
- BALLESTÉ, E. *et al.* Dynamics of crAssphage as a human source tracking marker in potentially faecally polluted environments. **Water Research**. v. 155. p. 233–244, mai. 2019.
- BARRIOS, M. E. *et al.* Viral tools for detection of fecal contamination and microbial source tracking in wastewater from food industries and domestic sewage. **Journal of Virological Methods**. v. 262. p. 79–88, dez. 2018.
- BICUDO, Bruno *et al.* Low voltage iron electrocoagulation as a tertiary treatment of municipal wastewater: removal of enteric pathogen indicators and antibiotic-resistant bacteria. **Water Research**. v. 188. p. 116500. 2021.
- BLANCH, A. R. *et al.* Integrated Analysis of Established and Novel Microbial and Chemical Methods for Microbial Source Tracking. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 5915–5926, set. 2006.
- CHACÓN, Luz *et al.* A somatic coliphage threshold approach to improve the management of activated sludge wastewater treatment plant effluents in resource-limited regions. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 86. n. 17. p. e00616-20. 2020.
- CHAUDHRY, Rabia M.; NELSON, Kara L.; DREWES, Jörg E. Mechanisms of pathogenic virus removal in a full-scale membrane bioreactor. **Environmental science & technology**. v. 49. n. 5. p. 2815-2822. 2015
- COSTÁN-LONGARES, A. *et al.* Microbial indicators and pathogens: Removal relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities. **Water Research**. v. 42. n. 17. p. 4439–4448, nov. 2008.
- DE LUCA, G. *et al.* Removal of indicator bacteriophages from municipal wastewater by a full-scale membrane bioreactor and a conventional activated sludge process: Implications to water reuse. **Bioresource Technology**. v. 129. p. 526–531, fev. 2013.
- DIAS. E.; EBDON. J.; TAYLOR. H. Estimating the concentration of viral pathogens and indicator organisms in the final effluent of wastewater treatment processes using stochastic modelling. **Microbial Risk Analysis**. v. 11. p. 47–56, abr. 2019.
- DIAS. E.; EBDON. J.; TAYLOR. H. The application of bacteriophages as novel indicators of viral pathogens in wastewater treatment systems. **Water Research**. v. 129. p. 172–179, fev. 2018.

EBDON, J. E. *et al.* Phages of Bacteroides (GB-124): A Novel Tool for Viral Waterborne Disease Control? **Environmental Science & Technology**. v. 46. n. 2. p. 1163–1169. 15 dez. 2011.

EBDON, J.; MUNIESA, M.; TAYLOR, H. The application of a recently isolated strain of Bacteroides (GB-124) to identify human sources of faecal pollution in a temperate river catchment. **Water Research**. v. 41. n. 16. p. 3683–3690, ago. 2007.

ESPINOSA, M. F. *et al.* Reduction and partitioning of viral and bacterial indicators in a UASB reactor followed by high rate algal ponds treating domestic sewage. **Science of The Total Environment**. v. 760. p. 144309, mar. 2021.

FLANNERY, J. *et al.* Concentration of Norovirus during Wastewater Treatment and Its Impact on Oyster Contamination. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78. n. 9. p. 3400–3406. 24 fev. 2012.

FLANNERY, J. *et al.* Norovirus and FRNA bacteriophage determined by RT-qPCR and infectious FRNA bacteriophage in wastewater and oysters. **Water Research**. v. 47. n. 14. p. 5222–5231, set. 2013.

FRANCY, D. S. *et al.* Comparative effectiveness of membrane bioreactors. conventional secondary treatment. and chlorine and UV disinfection to remove microorganisms from municipal wastewaters. **Water research**. v. 46. n. 13. p. 4164-4178. 2012.

GRABOW, W. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. **Water SA**. v. 27. n. 2. 15 abr. 2001.

HARAMOTO, E.; FUJINO. S.; OTAGIRI. M. Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant. **Science of The Total Environment**. v. 520. p. 32–38, jul. 2015.

HARTARD, C. *et al.* Occurrence of and Sequence Variation among F-Specific RNA Bacteriophage Subgroups in Feces and Wastewater of Urban and Animal Origins. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 81. n. 18. p. 6505–6515. 15 set. 2015.

HARWOOD, V. J. *et al.* Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study. **Water Research**, v. 47, n. 18, p. 6929–6943, nov. 2013.

IAWPRC study group on health related water microbiology. Bacteriophages as model viruses in water quality control. **Water Research**. v. 25. n. 5. p. 529–545, mai. 1991.

IBRAHIM, C.; HAMMAMI. S.; HASSEN. A. Noroviruses. Sapoviruses. and Aichi Viruses Emergence in Wastewater Associated With Viral Pandemic Gastroenteritis. **Emerging and Reemerging Viral Pathogens**. p. 411–441. 2020.

ISO - International Standardization Organization. 1995. **Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Pt. 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages.** ISO- 10705-1. Int. Stand. Organ. Geneva Switz.

ISO - International Standardization Organization. 2000. **Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Pt. 2: Enumeration of somatic coliphages.** ISO-10705-2. Int. Stand. Organ. Geneva Switz.

KALIAKATSOS, Andreas *et al.* Efficiency of two constructed wetland systems for wastewater treatment: removal of bacterial indicators and enteric viruses. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, n. 7, p. 2123-2130, 2019.

MARTI, E. *et al.* Removal of microbial indicators from municipal wastewater by a membrane bioreactor (MBR). **Bioresource Technology**. v. 102. n. 8. p. 5004–5009, abr. 2011.

MARTI, E.; VARIATZA. E.; BALCÁZAR. J. L. Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 20. n. 7. p. O456–O459, jul. 2014.

MCMINN, B. R.; ASHBOLT, N. J.; KORAJKIC, A. Bacteriophages as indicators of faecal pollution and enteric virus removal. **Letters in Applied Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 11–26, 5 jun. 2017.

MEULEMAN, A. F. M. *et al.* Water and mass budgets of a vertical-flow constructed wetland used for wastewater treatment. **Ecological Engineering**. v. 20. n. 1. p. 31–44, mar. 2003.

MOMBA, M., EDBON, J., KAMIKA, I. and VERBYLA, M. (2019). **Using indicators to assess microbial treatment and disinfection efficacy.** In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*. (A.Farnleitner, and A. Blanch (eds), Part 2: Indicators and Microbial Source Tracking Markers) , Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO.

MUNIESA, M. *et al.* Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. **Water Research**. v. 43. n. 6. p. 1559–1564, abr. 2009.

MUNIESA, M. *et al.* Use of abundance ratios of somatic coliphages and bacteriophages of *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 for microbial source identification. **Water Research**. v. 46. n. 19. p. 6410–6418, dez. 2012.

MUNIESA, M.; JOFRE, J. Occurrence of phages infecting *Escherichia coli*O157:H7 carrying the Stx 2 gene in sewage from different countries. **FEMS Microbiology Letters**. v. 183. n. 1. p. 197–200, fev. 2000.

NASSER, A.; SASI, S.; NITZAN, Y. Coliphages as Indicators for the Microbial Quality of Treated Wastewater Effluents. **Food and Environmental Virology**. v. 13. n. 2. p. 170–178. 11 jan. 2021.

- PLUMMER, J. D. *et al.* Bacterial and viral indicators of fecal contamination in drinking water. **Journal AWWA**. v. 106. n. 4 abr. 2014.
- POMMEPUY, M. *et al.* Sewage impact on shellfish microbial contamination. **Water Science and Technology**. v. 50. n. 1. p. 117–124. 1 jul. 2004.
- PURNELL, S. *et al.* Bacteriophage removal in a full-scale membrane bioreactor (MBR) – Implications for wastewater reuse. **Water Research**. v. 73. p. 109–117, abr. 2015.
- PURNELL, S. *et al.* Removal of phages and viral pathogens in a full-scale MBR: Implications for wastewater reuse and potable water. **Water Research**. v. 100. p. 20–27, set. 2016.
- RAMBAGS, F. *et al.* Bacteria and virus removal in denitrifying bioreactors: Effects of media type and age. **Ecological Engineering**. v. 138. p. 46–53, nov. 2019.
- SÁNCHEZ-ALFONSO, A. C. *et al.* Microbial indicators and molecular markers used to differentiate the source of faecal pollution in the Bogotá River (Colombia). **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. v. 225. p. 113450, abr. 2020.
- SAVICHTCHEVA, O.; OKABE, S. Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water Research**, v. 40, n. 13, p. 2463–2476, jul. 2006.
- SCHMITZ, B. W. *et al.* Reduction of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and fecal indicators by Bardenpho wastewater treatment. **Environmental science & technology**. v. 52. n. 12. p. 7015-7023. 2018.
- SILVA, H. D.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A.; ANUNCIAÇÃO, C. E. Why the Use of Adenoviruses as Water Quality Virologic Marker? **Food and Environmental Virology**. v. 3. n. 3–4. p. 138–140. 26 out. 2011.
- STEFANAKIS, A. I. *et al.* Presence of bacteria and bacteriophages in full-scale trickling filters and an aerated constructed wetland. **Science of The Total Environment**. v. 659. p. 1135–1145, abr. 2019.
- THWAITES, B. J. *et al.* Comparing the performance of aerobic granular sludge versus conventional activated sludge for microbial log removal and effluent quality: Implications for water reuse. **Water Research**. v. 145. p. 442–452, nov. 2018.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency. Method 1602: **Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure**. Washington: USEPA. 2001.
- VENEGAS, C. *et al.* Microbial source markers assessment in the Bogotá River basin (Colombia). **Journal of Water and Health**. v. 13. n. 3. p. 801–810. 21 jan. 2015.

VIJAYAVEL, K. *et al.* Isolation and characterization of Bacteroides host strain HB-73 used to detect sewage specific phages in Hawaii. **Water Research**. v. 44. n. 12. p. 3714–3724, jun. 2010.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Guidelines for drinking-water quality: The fourth edition incorporating the first addendum**. World Health Organization. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. ISBN 978-92-4-154995-0. © World Health Organization. 2017.

WU, Z. *et al.* Comparative fate of CrAssphage with culturable and molecular fecal pollution indicators during activated sludge wastewater treatment. **Environment International**. v. 136. p. 105452, mar. 2020.

ZANETTI, F.; DE LUCA, G.; SACCHETTI, R. Performance of a full-scale membrane bioreactor system in treating municipal wastewater for reuse purposes. **Bioresource Technology**. v. 101. n. 10. p. 3768–3771, mai. 2010.