

ROSANE CRISTINA DE ANDRADE

**INDICADORES NÃO CONVENCIONAIS PARA O RASTREAMENTO
DE FONTES DE CONTAMINAÇÃO FECAL EM BACIAS
HIDROGRÁFICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A553i
2015

Andrade, Rosane Cristina de, 1977-

Indicadores não convencionais para o rastreamento de fontes de contaminação fecal em bacias hidrográficas / Rosane Cristina de Andrade. – viçosa, MG, 2015.

xiii, 129f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Rafael Kopschitz Xavier Bastos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.96-116.

1. Engenharia sanitária. 2. Saneamento. 3. Bacias hidrográficas - Contaminação - Indicadores. 4. Avaliação de riscos. 5. Bacteriófagos. 6. *Cryptosporidium*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia Civil. Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil. II. Título.

CDD 22. ed. 628

ROSANE CRISTINA DE ANDRADE

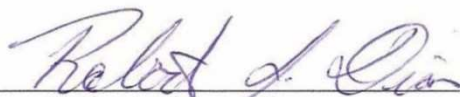
**INDICADORES NÃO CONVENCIONAIS PARA O RASTREAMENTO
DE FONTES DE CONTAMINAÇÃO FECAL EM BACIAS
HIDROGRÁFICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVAÇÃO: 17 de dezembro de 2015.



Artur Kanadani Campos



Roberto Sousa Dias



Rosângela Vieira de Andrade



Daniel Adolpho Cerqueira



Paula Dias Bevilacqua
Presidente

BIOGRAFIA

ROSANE CRISTINA DE ANDRADE, filha de João Batista de Andrade e de Vera Lucia Vieira, nasceu em 30 de janeiro de 1977, em Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 1996, iniciou o curso de Bacharel em Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em outubro de 2000.

Em agosto de 2003, iniciou o curso de Engenharia Ambiental na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em outubro de 2007.

Em 2008, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, área de concentração em Engenharia Sanitária e Ambiental, da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em outubro de 2010.

Em 2011, iniciou o Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, área de concentração em Engenharia Sanitária e Ambiental, da Universidade Federal de Viçosa; em 2013 cumpriu período “sanduíche” na Universidade de Brighton, Inglaterra, submetendo-se à defesa de tese em dezembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Bem, serei honesta. Às vezes acho difícil escrever agradecimentos, pela simples razão de que minha trajetória até aqui ter sido sempre abençoada por pessoas exemplares.

Mas, preciso começar....

Como não poderia deixar de ser, inicialmente agradeço ao professor e orientador Rafael Bastos, por todos esses anos de convívio, pela confiança, pelas broncas necessárias e principalmente pelo inestimável aprendizado pessoal e profissional. Sentirei sempre muito orgulho de ter recebido sua orientação.

À professora Paula Dias Bevilacqua, minha admiração e meu agradecimento pela valiosa colaboração ao longo de todos esses anos e por ser sempre mais que minha coorientadora.

Aos professores (pesquisadores) membros da banca, pelas contribuições para o aperfeiçoamento do trabalho final.

À agência de fomento, Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa e pela oportunidade da realização do doutorado “sanduíche”.

À Universidade Federal de Viçosa, à Universidade de Brighton e à Universidade Católica de Brasília, pela acolhida, pela infraestrutura e pelo apoio acadêmico.

Aos Departamentos de Engenharia Civil e Medicina Veterinária da UFV, pela possibilidade de realização deste trabalho. Ao corpo técnico-administrativo, minha gratidão pela prontidão e pelo auxílio constante.

Ao Laboratório de Controle da Qualidade da Água da Divisão de Água e Esgotos da UFV, por se tornar minha segunda casa. Agradeço a todos pela amizade e pelo maravilhoso clima de trabalho.

À “quadrilha da microbiologia” (Camila, Carolina e Renata), por nunca me deixarem desistir e por estarem sempre à disposição para ajudar e principalmente para me ouvir.

À CETESB, pelo fornecimento das cepas utilizadas neste estudo.

A todas as pessoas que me ajudaram a realizar este trabalho, cada um merece minha gratidão, mas para não ser indelicada ou até mesmo injusta esquecendo alguém, não mais citarei nomes. Se assim o fizesse, precisaria compor uma lista que em número de páginas seria maior que a própria tese, pois esta jornada se iniciou MUITO antes do meu ingresso no programa de doutorado do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Viçosa e a finalização desta etapa, a concretização de um sonho e, principalmente, o meu amadurecimento se devem à participação de inúmeras pessoas.

À minha família, colocada no fim desta redação por ser o alicerce de toda minha conquista. Sem vocês, MÃE e IRMÃS, a trajetória seria muito mais difícil. Obrigada pelo amor, pela educação, pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem na minha capacidade.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Qualidade microbiológica da água e indicadores de contaminação fecal.....	5
2.2. Rastreamento de Fontes de Contaminação Microbiológica.....	11
2.3. Bacteriófagos como método de rastreamento de fontes de contaminação microbiológica da água.....	15
2.3.1. Colifagos somáticos.....	17
2.3.2. Colifagos F-RNA específicos.....	19
2.3.3. Bacteriófagos que infectam bacteroides.....	21
2.4. Genotipagem de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. como ferramenta para rastreamento de fontes de contaminação microbiológica de águas superficiais.....	22
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivo geral.....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. Localização e caracterização das áreas de estudo.....	30
4.1.1. Bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu, Viçosa, MG.....	30
4.1.2. Bacia hidrográfica do rio Ouse – Sudeste da Inglaterra, Reino Unido.....	34
4.2. Coleta de amostras de água.....	36
4.3. Análises microbiológicas.....	39
4.3.1. Detecção e quantificação de bacteriófagos.....	39
4.3.2. Detecção, enumeração e genotipagem de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	41
4.4. Análise de organismos indicadores de contaminação fecal.....	46
4.5. Análises físicas e químicas.....	47
4.6. Análise dos dados.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1. Estudo 1 – Rastreamento de fontes de contaminação na bacia de captação do ribeirão São Bartolomeu - Viçosa, MG.....	49
5.1.1. Quantificação de bacteriófagos e de bactérias indicadoras de contaminação fecal (BICF) na bacia do ribeirão São Bartolomeu.....	50
5.1.2. Correlação entre colifagos, bactérias indicadoras de contaminação fecal (BICF) e as variáveis físicas e químicas de qualidade da água - análise dos dados na bacia do RSB como um todo.....	54
5.1.3. Potencialidade do uso de colifagos somáticos e F-específicos no rastreamento de fontes de contaminação fecal na bacia do RSB - análise dos dados por sub-bacia.....	56
5.1.4. Detecção e genotipagem de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	64
5.2. Estudo 2 – Rastreamento de fontes de contaminação na bacia hidrográfica do rio Ouse, Reino Unido.....	72
5.2.2. Uso de bacteriófagos no rastreamento de fontes de contaminação microbiológica.....	75
5.2.3. Genotipagem de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	86
5. CONCLUSÕES.....	93
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
ANEXO.....	117
ANEXO A.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APHA	<i>American Public Health Association</i>
ARA	Análise de Resistência a Antibióticos
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CT	Coliformes totais
CF	Coliformes fecais
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
EPHRU	<i>Environment and Public Health Research Unit</i>
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EF	Estreptococos Fecais
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICZN	Código Internacional de Nomenclatura Zoológica
MDE	Modelo Digital de Elevação
MDEHC	Modelo Digital de Elevação Hidrograficamente Condicionado
MF	Membrana Filtrante
MG	Estado de Minas Gerais
MS	Ministério da Saúde
NA	Não Aplicável
NMP	Número Mais Provável
OD	Oxigênio Dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PSA	Plano de Segurança da Água
RFCM	Rastreamento de Fontes de Contaminação Microbiológica
RNA	Ácido Ribonucleico
RSB	Ribeirão São Bartolomeu
SAAE	Serviço Autônomo de Água e Esgoto
SB	Sub-Bacia
SCA	Camada Simples de Ágar
TSB	Ágar Triptona e Soja
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFP	Unidade Formadora de Placas
UFV	Universidade Federal de Viçosa
USEPA	United States Environmental Protection Agency
uT	Unidade de Turbidez
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Delimitação da bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu, Viçosa Minas Gerais, Brasil, 2015.	31
Figura 2 – Mapa de uso e ocupação do solo, bacia de captação do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, 2015.	32
Figura 3 – Localização das fontes pontuais de poluição na bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, 2015.	34
Figura 4 – Bacia do rio Ouse, sudeste da Inglaterra, Reino Unido.	35
Figura 5 – Localização das estações de tratamento de esgotos na Bacia do rio Ouse, Sudeste da Inglaterra, Reino Unido.	35
Figura 6 – Localização dos pontos de coleta de água na bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu, Viçosa, MG.	36
Figura 7 – Pontos de coleta de água na bacia hidrográfica do RSB. A = ribeirão São Bartolomeu; B = córrego “São Lucas”; C = córrego dos Machados; D =) córrego Santa Catarina; E = córrego Paraíso; F = córrego Palmital; G = córrego “Antuérpia”; e H = córrego do Engenho; Viçosa, MG.	37
Figura 8 – Localização dos pontos de coleta de água na bacia do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido.	38
Figura 9 – Esquema representativo da técnica de ágar de camada dupla descrita pelo ‘Padrão Britânico’ <i>British Standard</i> (BS, 2001a; BS, 2001b, BS, 2001c) para detecção e enumeração de bacteriófagos que infectam <i>Bacteroides fragilis</i>	41
Figura 10 – Concentração média (log 10) de coliformes totais, <i>E. coli</i> , enterococos, colifagos somáticos (CN 13) e colifagos F-RNA (Famp) nos pontos de coleta na bacia do ribeirão São Bartolomeu, Viçosa, MG.	53
Figura 11 – Estatística descritiva das concentrações de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. nos pontos amostrados na bacia do ribeirão São Bartolomeu, Viçosa, MG, 2013 e 2014.	65
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados nas reações de Nested PCR para o fragmento de 826 pb. L = marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen); 1 e 2 = controles positivos; 3 = controle negativo; e 4-14 = amostras V3, V4, V6, V7, V9, V10, V12, V13, V15, V15 e V16.	69
Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados nas reações de Nested PCR para o fragmento de 826 pb. L = marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen); 1-14 = amostras V23, V24, V25, V26, V27, V33, V35, V37, V38, V40, V41, V42, V43, V44 e V45.	70
Figura 14 – Relações evolutivas dos táxons baseadas no método de Neighbor-Joining utilizando sequências do gene <i>18S rRNA</i> de diferentes espécies de <i>Cryptosporidium</i> disponíveis no banco de dados GenBank e os valores de <i>bootstrap</i> após 1.000 réplicas. As demais amostras identificadas pela letra V são amostras positivas de água oriundas deste estudo. O número entre parênteses indica o GenBank Identifier (GI number) da sequência. Os números próximos aos ramos representam a porcentagem em que os taxa se agruparam no teste de bootstrap. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (158819369) foi usado como <i>outgroup</i>	71

Figura 15 – Concentração média (log 10) de coliformes termotolerantes, enterococos, colifagos somáticos (WG-5) e colifagos F-RNA (WG-49) nos pontos de coleta na bacia do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014.....	76
Figura 16 – Concentração média de fagos que infectam GB-124 nos pontos de amostragem e localização das ETEs existentes na bacia do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido.....	78
Figura 17 – Concentração média de fagos que infectam GB-124 nos pontos de amostragem e localização das ETEs existentes na bacia do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido.....	79
Figura 18 – Estatística descritiva das concentrações de cistos de <i>Giardia</i> nos pontos amostrados na bacia hidrográfica do rio Ouse, Reino Unido, agosto de 2013 a janeiro de 2014.....	87
Figura 19 – Estatística descritiva das concentrações de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> nos pontos amostrados na bacia hidrográfica do rio Ouse, Reino Unido, agosto de 2013 a janeiro de 2014.....	87
Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando os produtos da amplificação pela Nested-PCR. 1 = marcador molecular 1 Kb ladder; 2 = controle negativo; 3 = controle positivo; e 4-8 = amostras B1, B2, B3, B4 e B5. A seta indica a posição do fragmento esperado na amplificação (819-825 pb).....	89
Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando os produtos da amplificação pela Nested-PCR. 1 = marcador molecular 1 Kb ladder; e 2-8 = amostras B6, B7, B8, B9, B10, B11 e B12. A seta indica a posição do fragmento esperado na amplificação (819-825 pb).....	90
Figura 22 – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando os produtos da amplificação pela Nested-PCR. Poço 1 = marcador molecular 1 Kb ladder; poços 2-8 = amostras B13, B14, B15, B16, B17, B18 e B19. A seta indica a posição do fragmento esperado na amplificação (819-825 pb).	90
Figura 23 – Árvore filogenética baseada no método <i>neighbor-joining</i> , utilizando a sequência parcial do gene 18S RNAr (186 pb) de diferentes espécies de <i>Cryptosporidium</i> . O número entre parênteses indica o <i>GenBank Identifier</i> da sequência. Os números próximos aos ramos representam a porcentagem em que os taxa se agruparam no teste de <i>Bootstrap</i> após 1.000 simulações. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (158819369) foi usado como <i>outgroup</i>	91

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 – Principais microrganismos patogênicos sugeridos como causa de doenças transmitidas pela água.....	7

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Espécies de <i>Cryptosporidium</i> , respectivos hospedeiros principais, tamanho dos oocistos e infectividade para o ser humano	24
Tabela 2 – Estatística descritiva dos resultados de colifagos somáticos (CN-13) em amostras de água da bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, julho de 2012 a maio de 2014.....	52
Tabela 3 – Estatística descritiva dos resultados de colifagos F-RNA (Famp) em amostras de água da bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, julho de 2012 a maio de 2014.....	52
Tabela 4 – Matriz de correlação – coeficiente de correlação de Spearman (rs) e valores de p (entre parênteses) – entre colifagos somáticos (CN-13), colifagos F-RNA (Famp) e coliformes totais, <i>E. coli</i> e enterococos na bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, julho de 2012 a maio de 2014	54
Tabela 5 – Matriz de correlação – coeficiente de correlação de Spearman (rs) e valores de p (entre parênteses) – entre colifagos somáticos (CN-13), colifagos F-RNA (Famp) e variáveis físicas e químicas de qualidade da água na bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu, Viçosa, MG, julho de 2012 a maio de 2014	56
Tabela 6 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 1, ribeirão São Bartolomeu, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014	57
Tabela 7 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 2, sub-bacia córrego do São Lucas, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014.....	57
Tabela 8 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 3, sub-bacia córrego dos Machados, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014.....	58
Tabela 9 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 4, sub-bacia córrego Santa Catarina, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014.....	58
Tabela 10 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 5, sub-bacia córrego Paraíso, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014.....	59
Tabela 11 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 6, sub-bacia córrego Palmital, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014.....	59
Tabela 12 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 7, sub-bacia córrego Antuérpia, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014.....	60
Tabela 13 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 8, sub-bacia córrego do Engenho, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014.....	60
Tabela 14 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 9, ponto de captação de água para abastecimento das ETA-UFV e ETA1	

SAAE, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014.....	61
Tabela 15 – Distribuição proporcional das propriedades e dos animais segundo a sub-bacia, bacia hidrográfica ribeirão São Bartolomeu	62
Tabela 16 – Matriz de correlação entre as variáveis de qualidade da água e o número de animais existentes em cada sub-bacia, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, julho de 2012 a maio de 2014	62
Tabela 17 – Quantificação do material genético extraído das amostras positivas para <i>Cryptosporidium</i> em microscopia de imunofluorescência, com as respectivas datas de coleta e identificação utilizada na etapa de biologia molecular	68
Tabela 19 – Matriz de correlação entre colifagos somáticos (WG-5), colifagos F-RNA (WG-49) e coliformes termotolerantes e enterococos na bacia hidrográfica do rio Ouse. Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014	77
Tabela 20 – Matriz de correlação entre bacteriófagos que infectam <i>B. fragilis</i> (GB-124, HB-73 e S-10), coliformes termotolerantes e enterococos na bacia hidrográfica do rio Ouse. Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014	80
Tabela 21 – Matriz de correlação entre os bacteriófagos que infectam <i>B. fragilis</i> (GB-124, HB-73 e S-10) e os colifagos somáticos (WG-5) e F-RNA (WG-49) na bacia hidrográfica do rio Ouse. Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014	82
Tabela 22 – Número de animais presentes nas proximidades dos pontos de coleta, bacia de captação do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido.....	83
Tabela 23 – Matriz de correlação entre os organismos indicadores de contaminação fecal, colifagos somáticos (WG-5) e F-RNA (WG-49), bacteriófagos que infectam <i>B. fragilis</i> (GB-124, HB-73 e S-10) e o número de animais (bovinos, ovelhas e suínos) na bacia hidrográfica do rio Ouse. Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014.....	85
Tabela 24 – Resultados obtidos na detecção de oocistos por microscopia de imunofluorescência e quantificação de DNA (Qubit) nas amostras positivas, com as respectivas datas de coleta	89

RESUMO

ANDRADE, Rosane Cristina de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2015. **Indicadores não convencionais para o rastreamento de fontes de contaminação fecal em bacias hidrográficas.** Orientador: Rafael Kopschitz Xavier Bastos. Coorientadora: Paula Dias Bevilacqua.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de bacteriófagos e a genotipagem de oocistos de *Cryptosporidium* spp. na tentativa de identificar as fontes de contaminação fecal em duas bacias hidrográficas bem distintas: i) a bacia do ribeirão São Bartolomeu, localizada em Viçosa, MG, Brasil; e ii) a bacia do rio Ouse, localizada no sudeste da Inglaterra, Reino Unido. Colifagos somáticos, colifagos F-RNA e bacteriófagos que infectam *Bacteroides fragilis* foram utilizados por sua simplicidade metodológica, pelo baixo custo e por apresentarem, em tese, elevada especificidade no reconhecimento das bactérias hospedeiras. Para comparação, foram monitoradas bactérias tradicionalmente utilizadas como indicadoras de contaminação fecal – coliformes termotolerantes, *E. coli* e enterococos. Os resultados demonstraram que as áreas analisadas são impactadas, apresentando níveis relativamente elevados de contaminação fecal tanto humana quanto animal, indicados pelas concentrações de bactérias do grupo coliformes e de enterococos. Contudo, a pesquisa de bacteriófagos foi pouco informativa no estudo realizado na bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu, particularmente devido à inviabilidade do uso dos bacteriófagos que infectam *Bacteroides fragilis*, que em tese são os mais indicados para estudos de rastreamento de fontes de contaminação. Na bacia do rio Ouse, a utilização de bacteriófagos indicou que a maior parte do material fecal carregado para os corpos hídricos é proveniente da exploração de bovinos e suínos nas áreas da bacia, sendo menos expressiva a contribuição do material fecal humano. Análises moleculares de caracterização genotípica permitiram a identificação de *C. parvum* nas amostras de água coletadas nas duas bacias hidrográficas estudadas, o que reforça a hipótese da influência maior da exploração animal para a contaminação das águas superficiais estudadas.

ABSTRACT

ANDRADE, Rosane Cristina de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December of 2015. **Non-conventional indicators for tracking of fecal contamination sources in river catchments.** Adviser: Rafael Kopschitz Xavier Bastos. Co-adviser: Paula Dias Bevilacqua.

This work aimed at evaluating the use of bacteriophage and genotyping of *Cryptosporidium* spp. oocysts in an attempt to identify the fecal contamination sources in two quite distinct catchments: i) that of São Bartolomeu stream, located in Viçosa, MG, Brazil and ii) of River Ouse located in southeast England, United Kingdom. Somatic coliphages, F-RNA coliphages and bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* were used due to their methodological simplicity, low cost and because they are, in thesis, highly specific in recognizing host bacteria. As a matter of comparison, the most traditionally used fecal indicator bacteria were also monitored – thermotolerant coliforms, *E. coli* and enterococci judging by the concentrations of coliforms and enterococci, the results demonstrated that the studied areas are impacted by faecal pollution, showing relatively high levels of fecal contamination, both of human and animal origin. However, the bacteriophage study carried out in the São Bartolomeu catchments was not very informative, mainly due to the fail of using the bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis*, which are the most indicated for microbial source tracking. At River Ouse catchment, the use of bacteriophages indicated that the most of the fecal material carried into the water bodies come mainly from bovine and swine farming, whereas human fecal contribution was less important;. Molecular analyses for *Cryptosporidium* genotyping identified *C. parvum* in the water samples collected from both catchments, reinforcing the hypothesis that animal farming is the main source of water contamination there.

1. INTRODUÇÃO

A água é uma das principais preocupações mundiais no que diz respeito aos seus usos preponderantes e à sua manutenção como um bem de todos, em quantidade e qualidade adequadas, que garantam que sua utilização não vá acarretar danos à saúde da população, em curto ou longo prazo. Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), água e saúde das populações são consideradas inseparáveis (OPAS, 2010)¹.

Como medidas para assegurar a qualidade da água para consumo humano, são criadas diretrizes internacionais, como o *Guidelines for Drinking-Water Quality* da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2011), além de leis ou decretos nacionais que estabelecem valores máximos para diversas variáveis que definem a potabilidade e da água.

O objetivo das diretrizes da OMS é recomendar critérios gerais para prevenção de riscos à saúde causados por elementos radiológicos, físicos, químicos e microbiológicos, potencialmente presentes na água, estando, entretanto, a critério de cada país adequar as recomendações à própria realidade sociocultural, econômica e ambiental. Além disso, a OMS enfatiza que as ferramentas de avaliação e gerenciamento de riscos, aplicados de forma abrangente e integrada, desde a captação até o consumo, são as medidas mais efetivas para garantir a segurança da qualidade da água para consumo humano. Essa abordagem, desde a terceira edição dos guias da OMS, recebeu a denominação de Planos de Segurança da Água (*Water Safety Plans*) (WHO, 2004).

¹ Disponível em <<http://www.opas.org.br/ambiente/temas.cfm?id=29&area=Conceito>>. Acesso em: 2 out. 2013.

No Brasil, a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), que *Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências*, apresenta as diretrizes para garantir a qualidade da água a ser distribuída e consumida pela população, e estabelece a competência do responsável pelo sistemas, ou soluções alternativas coletiva de abastecimento de água para consumo humano, de manter a avaliação sistemática das formas de abastecimento, sob a perspectiva dos riscos à saúde, com base na ocupação da bacia contribuinte ao manancial, no histórico das características de suas águas, nas características físicas do sistema, nas práticas operacionais e na qualidade da água distribuída, conforme os princípios dos Planos de Segurança da Água (PSA) recomendados pela Organização Mundial de Saúde ou definidos em diretrizes vigentes no País (BRASIL, 2011).

Do ponto de vista microbiológico, considerando o atual estágio de conhecimento da microbiologia sanitária e da epidemiologia, torna-se redundante reafirmar o papel da transmissão hídrica de diversos patógenos (bactérias, vírus, protozoários e helmintos) causadores de inúmeras doenças. Segundo dados da OMS (2013), em 2012 a diarreia foi responsável pela morte de cerca de 2 milhões de pessoas no mundo, predominantemente entre crianças menores de 5 anos. No Brasil, segundo dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade, doenças diarreicas agudas foram responsáveis pela morte de aproximadamente 15 mil pessoas, no período de 2012 a setembro de 2015. Essa situação tem se agravado nos últimos anos devido à contaminação frequente das águas recreacionais, de irrigação e de consumo humano, sendo o aporte de material fecal, humano e animal, em corpos hídricos o responsável pela introdução, nesses ambientes, de microrganismos patogênicos.

A contaminação microbiológica da água pode ser classificada, de acordo com o seu lançamento nos cursos d'água, como pontual, quando o lançamento da carga poluidora é feito de forma concentrada, em um local determinado, ou não pontual (difusa), quando os poluentes alcançam um manancial de modo disperso, ou seja, quando um ponto específico de introdução não é determinado. Em geral, a contribuição das fontes pontuais, como estações de tratamento de esgoto ou efluentes industriais, é regulamentada por legislação específica, sendo mais fácil o controle desses lançamentos. Por outro lado, as fontes não pontuais, que incluem a agropecuária, agricultura, animais

silvestres e escoamento superficial, são de difícil controle e, na maior parte dos casos, responsáveis por impactos importantes sobre a qualidade da água.

Em muitos países, a prevenção da poluição da água tem sido tradicionalmente centrada no controle de fontes pontuais de contaminação fecal. Melhorias na tecnologia e na gestão das instalações de tratamento de esgoto e águas residuárias têm minimizado as contribuições fecais dessas fontes em países industrializados. No entanto, em algumas situações os níveis de contaminação fecal não foram significativamente reduzidos por essas melhorias, e em uma série de estudos as fontes não pontuais de poluição fecal foram identificadas como contribuintes dominantes para o problema da poluição da água (SCHNAUDER *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2011).

É evidente, a partir das estatísticas da OMS, que águas contaminadas com fezes humanas implicam risco potencial à saúde da população, pois são suscetíveis à presença de patógenos entéricos humano-específicos, que podem causar infecções (FONG; LIPP, 2005). Entretanto, é sabido que outros animais também podem servir como reservatórios para uma variedade de patógenos humanos e que vários patógenos podem infectar, simultaneamente, humanos e animais – os agentes de zoonoses, como *Campylobacter*, *Salmonella*, *Cryptosporidium* e *Giardia*.

A distinção da origem e natureza da contaminação fecal, ou seja, se provém de humanos ou animais, propicia estimativas mais bem fundamentadas do risco do abastecimento de água à saúde humana, de forma que pode constituir detalhamento mais preciso para se realizar a identificação dos perigos e a caracterização dos riscos dos Planos de Segurança da Água (PSA), assim como orientar prioridades em termos de adoção de medidas preventivas ou corretivas para o problema de contaminação de mananciais de abastecimento.

A preocupação em conhecer a fonte da contaminação já é realidade em muitos países desenvolvidos, como é o caso dos Estados Unidos, que possui requerimento federal de desenvolvimento e execução da quantidade máxima de poluente (TMDL – *total maximum daily load*). O TMDL é uma ferramenta de planejamento para determinar a quantidade máxima de um poluente que o corpo hídrico pode receber, incluída uma margem de segurança, e alocar essa carga de poluentes entre as fontes de poluição pontuais e difusas, de forma a não violar os padrões de qualidade estabelecidos para os usos designados daquele corpo receptor (SANTO DOMINGO *et al.*, 2007).

Sem o conhecimento das fontes de contaminação que atingem um corpo receptor, as análises de risco tornam-se precárias, dificultando também a elaboração de planos de gestão de qualidade eficazes com relação à mitigação de contaminações fecais em águas destinadas ao abastecimento humano. No Brasil, há escassez de publicações de trabalhos que tenham como escopo o rastreamento de fontes de contaminação fecal em recursos hídricos, sendo a maior parte do referencial teórico proveniente de outros países.

Nesta pesquisa foram realizados estudos de rastreamento de fontes de contaminação microbiológica da água (RFCM) em duas bacias hidrográficas mediante a utilização de duas ferramentas de análise – detecção e enumeração de bacteriófagos e genotipagem de oocistos de *Cryptosporidium*, ambas com o intuito de distinguir as fontes de contaminação fecal, humana e animal, em águas superficiais. O trabalho resulta da consolidação de dois estudos. **Estudo 1:** rastreamento de fontes de contaminação na bacia hidrográfica do Ribeirão São Bartolomeu localizada em Viçosa, MG; e **Estudo 2:** rastreamento de fontes de contaminação na bacia do rio Ouse, localizada no sudeste da Inglaterra, Reino Unido.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Qualidade microbiológica da água e indicadores de contaminação fecal

A compreensão de que a água, elemento essencial para a manutenção da vida e das atividades humanas básicas, poderia ser a “causa” de epidemias devastadoras, que mataram milhares de pessoas em diversos episódios da história, foi um passo lento e gradual, mas de profunda transformação no que tange à saúde das populações. Foram necessários séculos para que o ser humano compreendesse que sua percepção sensorial com relação à água não era suficiente para garantir sua qualidade e segurança (CEBALLOS; DANIEL; BASTOS, 2009).

Ainda, segundo Ceballos, Daniel e Bastos (2009), foi no século XIX, com o advento da microbiologia e a proposição da Teoria Microbiana das Doenças, por Louis Pasteur, que finalmente a associação da qualidade da água com a ocorrência de doenças humanas ganhou embasamento científico e se iniciou ampla investigação e desenvolvimento de técnicas de tratamento da água para consumo, visando assegurar a saúde pública. Atualmente, considerando o estágio de conhecimento da microbiologia sanitária e da epidemiologia, torna-se redundante afirmar o papel da transmissão hídrica de agentes biológicos, como bactérias, vírus, protozoários e helmintos. Esses agentes são causadores de inúmeras patologias em humanos, as quais, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, têm sido responsáveis pela morte de cerca de dois milhões de pessoas no mundo a cada ano, sendo as crianças o grupo mais afetado (WHO, 2000).

Segundo Gray (2005), as inúmeras doenças fortemente correlacionadas com a água podem ser classificadas de acordo com a forma de transmissão e infecção: i) as de transmissão fecal-oral que ocorrem via ingestão de água contaminada, como cólera, disenterias e hepatites; ii) as que resultam de transmissão fecal-oral direta, ou de pessoa a pessoa, devido à carência de suprimento adequado de água para medidas de higiene básicas, onde se enquadram as diarreias; iii) aquelas causadas por patógenos que completam partes de seu ciclo de vida em organismos aquáticos, como é o caso da esquistossomose; e iv) doenças cujos agentes causadores são transmitidos por insetos que vivem e se reproduzem na água, como a dengue.

O Quadro 1 apresenta, de forma resumida, informações sobre os principais microrganismos patogênicos da rota fecal-oral elencados como possíveis agentes causadores de doenças de veiculação hídrica (WHO, 2011). Observa-se nesse quadro que, excetuando-se as bactérias *Burkholderia pseudomallei*, *Pseudomonas aeruginosa* e as Micobactérias não agentes de tuberculose, todos os demais microrganismos foram classificados como de alto significado ou importância à saúde. Isso indica a diversidade de perigos possíveis de serem identificados na água de abastecimento. c.

Outros fatores importantes de serem observado no Quadro 1 são a persistência ambiental do microrganismo e sua resistência à desinfecção. Naturalmente, longa permanência da forma infecciosa do agente patogênico no ambiente e elevada resistência à desinfecção, contribuem para que o perigo seja traduzido em risco, isto é, aumenta a probabilidade de que o microrganismo seja veiculado pela água de consumo e eventualmente provoque infecção ou doença.

As doenças transmitidas via ingestão de água contaminada e as transmitidas por carência de água para higiene são muito recorrentes em locais com total ausência ou precariedade de sistemas de saneamento básico e de políticas de segurança em saúde pública. Problemas sanitários que vão da coleta à distribuição de água para abastecimento, tratamento e destinação dos efluentes domésticos e industriais, e ainda a má gestão dos resíduos sólidos, têm contribuído historicamente para a manutenção dos elevados índices de mortalidade, principalmente em países em desenvolvimento, devido a enfermidades cujos agentes causadores são provenientes principalmente de material fecal humano e animal dissipado na água (MIERZWA *et al.*, 2008).

Quadro 1 – Principais microrganismos patogênicos sugeridos como causa de doenças transmitidas pela água

Microrganismo	Significado à Saúde	Persistência em Água ^a	Resistência ao Cloro ^b	Infecciosidade Relativa ^c	Reservatório Animal
Bactérias					
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Baixo	Pode multiplicar	Baixa	Baixa	Não
<i>Campylobacter jejuni</i> ,	Alto	Moderada	Baixa	Moderada	Sim
<i>Escherichia coli</i> (EPEC, ETEC, EIEC)	Alto	Moderada	Baixa	Baixa	Sim
<i>E. coli</i> (EHEC)	Alto	Moderada	Baixa	Alta	Sim
<i>Legionella sp</i>	Alto	Multiplica	Baixa	Moderada	Não
Micobactéria ^d	Baixo	Multiplica	Alta	Baixa	Não
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^e	Moderado	Pode multiplicar	Moderada	Baixa	Não
<i>Salmonella enterica</i>	Alto	Moderada	Baixa	Baixa	Não
Outras salmonelas	Alto	Pode multiplicar	Moderada	Baixa	Não
<i>Shigella spp</i>	Alto	Curta	Baixa	Moderada	Não
<i>Vibrio cholerae</i>	Alto	Curta	Baixa	Baixa	Não
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Alto	Longa	Baixa	Baixa	Sim
Vírus					
Adenovirus	Alto	Longa	Moderada	Alta	Não
Enterovirus	Alto	Longa	Moderada	Alta	Não
Hepatite A	Alto	Longa	Moderada	Alta	Não
Hepatite E	Alto	Longa	Moderada	Alta	Potencial
Noro/Sapovirus	Alto	Longa	Moderada	Alta	Potencial
Rotavirus	Alto	Longa	Moderada	Alta	Não
Protozoários					
<i>Acanthamoeba spp</i>	Alto	Longa	Alta	Alta	Não
<i>Cryptosporidium</i>	Alto	Longa	Alta	Alta	Sim
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Alto	Longa	Alta	Alta	Não
<i>Entamoeba histolytica</i>	Alto	Moderada	Alta	Alta	Não
<i>Giardia intestinalis</i>	Alto	Moderada	Alta	Alta	Sim
<i>Naegleria fowleri</i>	Alto	Pode ^f multiplicar	Alta	Alta	Não
<i>Toxoplasma gondii</i>	Alto	Longa	Alta	Alta	Sim

Nota: os microrganismos patogênicos de veiculação hídrica listados acima têm sido confirmados por estudos epidemiológicos e relatos de casos. Parte da demonstração da patogenicidade envolve a reprodução da doença em hospedeiros suscetíveis aos agentes patogênicos. Estudos experimentais, em que voluntários adultos são expostos para definição do número de microrganismos, proveem informação relativa sobre a dose-resposta. Como a maioria desses estudos é realizada com voluntários imunocompetentes, adultos e saudáveis, os dados relativos à dose-resposta são aplicáveis a apenas parte da população exposta, e a extrapolação para grupos com diferentes perfis de imunidade exige estudos específicos.

Obs.:

- Período de detecção do estágio infeccioso em água, a 20 °C: duração: até uma semana; moderada: de uma semana a um mês; e longa: acima de um mês.
- Quando o estágio infeccioso do microrganismo está livremente suspenso em água, nas dosagens e nos tempos de contato usuais. Na caracterização moderada para resistência, a população do agente não é completamente inativada.
- Dados obtidos a partir de experimentos com voluntários humanos adultos, imunocompetentes ou de evidências epidemiológicas.
- Micobactérias não agentes da tuberculose, ocorrentes em biofilmes de sistemas de distribuição de água.
- A principal rota de infecção é feita pelo contato com a pele, mas pode ser assimilada por ingestão e desenvolver processo infeccioso em pessoas com neoplasias e com quadro de imunodeficiência.
- Em águas com temperaturas medianamente elevadas.

Fonte: adaptado de WHO (2011).

Mesmo com o consenso e o vasto conhecimento científico com relação à importância da água como veiculadora de organismos patogênicos, a situação no Brasil de gestão dos serviços de saneamento básico ainda deixa a desejar. Segundo a Pesquisa de Informações Básicas Municipais (2014), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), dos 5.570 municípios da União, 31,7% (1.763) possuíam Planos de Saneamento Básico que contemplam o serviço de abastecimento de água, 30,0% (1.669) contemplam o serviço de limpeza urbana e manejo de resíduos sólidos e apenas 27,7% (1.545) incluem em seus planos o serviço de esgotamento sanitário. Presume-se assim que estratégias preventivas e corretivas para garantia da qualidade da água que abastece grande parte da população brasileira não estejam sendo realizadas com eficácia.

No entanto, há no Brasil diversos instrumentos legais de controle de qualidade da água em mananciais de abastecimento, por exemplo, a Resolução Conama nº 357/2005, que “dispõe sobre a classificação dos corpos d’água (...), bem como estabelece as condições e os padrões de lançamento de efluentes”. Além disso, a qualidade da água para consumo humano é normatizada, de forma bastante detalhada pela Portaria nº 2/1914, Ministério da Saúde de 12 de dezembro de 2011, que “dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade”.

Em tese, estes instrumentos garantiriam que os corpos hídricos não recebam carga poluidora, em especial de material fecal, incompatível com os usos preponderantes da água, e que, ao ser destinado ao consumo humano, todos os indicadores de qualidade microbiológica da água sejam atendidos.

A pesquisa de organismos indicadores de contaminação fecal tem sido usada há décadas em programas de monitoramento e controle de qualidade ambiental (LÓPEZ-PILA; SZEWZYK *et al.*, 2000; YOUN-JOO; KAMPBELL; BREIDENBACH, 2002; ALM; BURKE; SPAIN, 2003; LEBARON *et al.*, 2005), pois, por limitações de ordem técnica e econômica, é praticamente impossível investigar, de forma rotineira, todos os organismos patogênicos potencialmente presentes na água.

Na avaliação da qualidade da água *in natura*, a interpretação básica do emprego de organismos indicadores é de que sua presença atesta o contato da água com material fecal, portanto indica a presença potencial de organismos patogênicos de transmissão

fecal-oral. Partindo do pressuposto de que existe uma relação proporcional entre a presença de organismos indicadores e patogênicos, entende-se que a concentração de organismos indicadores forneça também informações sobre o grau de contaminação da água (BASTOS *et al.*, 2000). Além disso, o uso de organismos indicadores permite verificar a eficiência de processos de tratamento de água e de esgotos (BASTOS *et al.*, 2000).

Para o microrganismo ser considerado indicador de contaminação fecal, é preciso que atenda a uma série de atributos, como: i) não ser patogênico; ii) ser detectável por métodos simples e rápidos; iii) ocorrer quando os patógenos estiverem presentes e não ocorrer nem se multiplicar naturalmente em águas não poluídas; iv) apresentar-se em concentrações maiores que as dos patógenos; v) não possuir taxa de sobrevivência menor que a dos patógenos de interesse, nem ser menos resistente à desinfecção; vi) ser membro exclusivo da microbiota intestinal de animais homeotérmicos; vii) ser correlacionado a riscos à saúde; e viii) ser específico de fontes fecais (SCOTT *et al.*, 2002; USEPA, 2015).

Os indicadores bacteriológicos de contaminação fecal mais empregados na avaliação da qualidade da água (inclusive em instrumentos normativos ou regulatórios como a Portaria nº 2.914/2011) são as bactérias do grupo coliforme (coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli*) e os enterococos.

De acordo com as definições da Portaria MS nº 518/2004 (BRASIL, 2004), os coliformes totais (bactérias do grupo coliforme) são bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de se desenvolverem na presença de sais biliares ou agentes tensoativos que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído, a $35,0 \pm 0,5$ °C, em um período de 24 a 48 horas e que podem apresentar atividade da enzima β -galactosidase. A maioria das bactérias do grupo coliforme pertence aos gêneros *Escherichia* sp., *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp., embora vários outros gêneros e espécies pertençam ao grupo.

Os coliformes fecais, denominação utilizada durante muitos anos, ou coliformes termotolerantes, são bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes totais, caracterizados 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 essa característica de termotolerância, porém somente *E. coli* tem como *habitat* primário o intestino humano e de animais homeotérmicos (BRASIL, 2005).

O grupo dos coliformes totais inclui vários gêneros e espécies de vida livre, portanto sua utilização como indicador de contaminação da água fica comprometida. O grupo dos coliformes termotolerantes também inclui bactérias de origem não exclusivamente fecais, embora em menor proporção que as do grupo dos coliformes totais. A contagem de *E. coli* tem sido extensivamente utilizada nos monitoramentos da qualidade das águas e é considerada indicador específico de qualidade de água destinada à potabilidade e balneabilidade (LÓPEZ-PILA; SZEWZYK *et al.*, 2000; YOUN-JOO; KAMPBELL; BREIDENBACH, 2002; ALM; BURKE; SPAIN, 2003; LEBARON *et al.*, 2005).

Outro grupo utilizado como indicador de contaminação são os enterococos. Os enterococos são bactérias Gram-positivas, anaeróbios facultativos, caracterizam-se pela alta tolerância às condições adversas de crescimento, como a capacidade de sobreviverem na presença de 6,5% de cloreto de sódio (halotolerantes), em pH 9,6 e em ampla faixa de temperatura, de 10 a 45 °C. A maioria das espécies de enterococos é de origem fecal humana, embora eles possam ser isolados de fezes de animais (BRASIL, 2000; FORSYTHE, 2002; GRIFFO; PEREIRA; MOTTA, 2006). Enterococos têm uma série de vantagens como indicadores sobre coliformes totais e *E. coli*, por exemplo, o fato de geralmente não se reproduzirem no ambiente e demonstrarem tempo maior de sobrevivência na água (McFETERS; BISSONNETTE; JEZESKI, 1974; WHO, 1993). Apesar de serem menos numerosos do que coliformes fecais e *E. coli* em fezes humanas, enterococos ainda são numerosos o suficiente para serem detectados com relativa facilidade.

No entanto, o papel de indicador de contaminação desses dois grupos de organismos tem sido questionado devido a aspectos como: i) definição incerta desses organismos como grupo; e ii) relação frágil com a presença de patógenos, em especial de organismos mais resistentes, como os vírus e os protozoários (WHO, 2004; BASTOS *et al.*, 2009). Assim, é importante considerar outros indicadores na avaliação microbiológica das águas, os quais podem exibir relação mais estreita com a presença de maior variedade de microrganismos patogênicos na água, particularmente aqueles que podem persistir por mais tempo no ambiente (SOUZA; DANIEL, 2008).

Muitos indicadores potenciais de contaminação fecal alternativos ao grupo dos coliformes totais têm sido propostos, como o *Clostridium perfringens* (WHO, 2000) e bacteriófagos – colifagos somáticos (KOTT, 1981; IAWPRC, 1991), bacteriófagos RNA F-específicos (HAVELLAR, 1991; IAWPRC, 1991) e os fagos que infectam *Bacteroides fragilis* (JOFRE *et al.*, 1986; TARTERA; LUCENA; JOFRE, 1989; IAWPRC, 1991). Scott *et al.* (2004) também elencam métodos químicos potencialmente indicadores de contaminação fecal, como a análise da concentração de cafeína e coprostanol, que são compostos comumente presentes no esgoto humano.

Na ausência de um indicador ideal, ou de aplicação universal, deve-se trabalhar com o(s) indicador(es) que retrate(m) da forma mais fidedigna a real estrutura da comunidade de microrganismos patogênicos possivelmente presente na água. Outro fator complicador na análise da contaminação fecal da água é que, devido à natureza ubíqua dos organismos patogênicos, não fica clara a distinção da origem da contaminação, ou seja, se as fezes contaminantes são de origem humana ou animal (LEMARCHAND; LEBARON, 2003; MEAYS *et al.*, 2004; JIANG, *et al.*, 2007; EBDON *et al.*, 2012).

Compreender a origem da poluição fecal é, portanto, fundamental na avaliação dos riscos à saúde, bem como na definição das ações necessárias para sanar o problema.

2.2. Rastreamento de Fontes de Contaminação Microbiológica

O termo rastreamento de fonte de contaminação microbiológica (RFCM), do inglês *Microbial Source Tracking*, refere-se a um grupo de métodos químicos, fenotípicos, genotípicos e microbiológicos que busca identificar a origem da contaminação fecal presente em corpos d'água (SIMPSON *et al.*, 2002; SCOTT *et al.*, 2004).

Um dos primeiros estudos que pode ser interpretado como RFCM foi realizado por Gordom (1905), no qual foram constatadas características diferenciadas no processo de fermentação realizada por estreptococos isolados de fezes humanas e de animais.

Na década de 1960, na tentativa de estabelecer critérios para inferência sobre as fontes de poluição de um corpo hídrico, o uso da relação entre coliformes fecais e estreptococos fecais (CF:EF) passou a receber ampla aceitação (USEPA, 2005; SARGEANT; KAMMIN; COLLYARD, 2011). Razão de CF:EF maior ou igual a 4 era

associada à contaminação fecal humana e menor que 0,7 indicava a presença de fezes de animais (SINTON; FINLAY; HANNAH, 1998). Contudo, a partir de meados da década de 1970, a validade dessa relação passou a ser questionada (SARGEANT; KAMMIN; COLLYARD, 2011) e concluiu-se que o cálculo não era informativo devido às diferentes taxas de sobrevivência dos dois grupos de microrganismos no ambiente-os enterococos apresentam maior sobrevivência que os coliformes fecais, dependendo das condições ambientais (FEACHEM, 1983). A razão é também afetada pela escolha dos métodos para enumeração dos dois grupos de bactérias, podendo resultar em conclusões incorretas sobre a fonte de contaminação. Por essas questões, o uso da razão CF: EF não é mais recomendado (APHA, 1998; SCOTT *et al.*, 2002; RANGDALE; MEIJER; RINCÉ, 2003).

Atualmente os métodos de RFCM podem ser separados em dois grandes grupos, segundo Sargeant, Kammin e Collyard. (2011): i) técnicas moleculares (genotípicas) e bioquímicas (fenotípicas); e ii) métodos químicos. As técnicas moleculares e bioquímicas se baseiam na suposição de que a disponibilidade de nutrientes, as diferenças de pH e outras condições químicas e ambientais entre os sistemas digestivos e intestinais dos seres humanos e dos animais selvagens ou domésticos selecionam diferentes populações de microrganismos (SCOTT *et al.*, 2004; SANTO DOMINGO *et al.*, 2007). Sendo assim, inferências sobre a provável fonte de contaminação são embasadas na comparação entre microrganismos isolados em ecossistemas aquáticos e, ou, em fontes conhecidas de poluição fecal (SCOTT *et al.*, 2004; SANTO DOMINGO *et al.*, 2007; SANTO DOMINGO; EDGE, 2010; SARGENT; KAMMIN; COLLYARD, 2011).

Essas técnicas podem ser agrupadas em duas categorias principais: dependentes ou independentes de biblioteca (SCOTT *et al.*, 2004; SARGENT; KAMMIN; COLLYARD, 2011; JOFRE *et al.*, 2014). Os métodos independentes de biblioteca têm sido mais recomendados para o desenvolvimento de estudos de RFCM (SANTO DOMINGO *et al.*, 2007; SARGENT; KAMMIN; COLLYARD, 2011), pois consistem no cultivo ou na análise molecular dos microrganismos presentes em uma amostra ambiental, já conhecidos como sendo provenientes de hospedeiros ou fontes de contaminação fecal específicos. Em outras palavras, as principais técnicas independentes de biblioteca podem ser cultivo-dependentes, com o uso de bacteriófagos (GOURMELON *et al.*, 2007; PURNELL; EBDON; TAYLOR, 2011; JOFRE *et al.*,

2014); ou cultivo-independentes, como uso de PCR para identificação bacteriana (BONJOCH; BALLESTE; BLANCH, 2004; LAMENDELLA *et al.*, 2008; HARWOOD *et al.*, 2009; SANTO DOMINGO; EDGE, 2010) e PCR para identificação viral (McQUAIG *et al.*, 2006; HARWOOD *et al.*, 2009).

As técnicas de análise molecular baseiam-se na detecção de marcadores moleculares, que geralmente envolvem o enriquecimento de genes-alvo, a extração de ácido nucleico e, em seguida, a amplificação de genes-alvo por PCR convencional ou PCR quantitativa (qPCR) (WUERTZ *et al.*, 2011). A vantagem do enriquecimento é que viabiliza a análise de RFCM mesmo quando o organismo-alvo do rastreamento é encontrado em baixas concentrações. Esses métodos são muitas vezes mais rápidos, sensíveis e menos caros do que os métodos dependentes de bibliotecas. Como o enriquecimento é, normalmente, feito em condições que favorecem o organismo-alvo e os métodos utilizados costumam se basear na ausência ou presença do organismo-alvo ou do gene, não é preciso que haja uma biblioteca no estudo (USEPA, 2005).

Os padrões moleculares utilizam características genotípicas do organismo ou da célula isolada, por meio de técnicas como a ribotipagem (PARVEEN *et al.*, 1999; NELSON *et al.*, 2008), a PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*) (CASAREZ; PILLAI; GIOVANNI *et al.*, 2007) e a rep-PCR (*Repetitive Element Sequence PCR*) (DOMBEK *et al.*, 2000; MOHAPATRA *et al.*, 2007). Já os métodos que utilizam padrões bioquímicos consistem na observação de características fenotípicas, por exemplo, os métodos de análise de resistência a antibióticos (ARA) (JIANG *et al.*, 2007; PRINCE *et al.*, 2007), de análise do perfil de utilização de fontes de carbono (HARWOOD *et al.*, 2003; MOUSSA; MASSENGALE, 2008) e MALDI-TOF-MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) (SIEGRIST *et al.*, 2007). A eficácia dessa abordagem é, portanto, diretamente relacionada com a capacidade da biblioteca de representar e caracterizar adequadamente as fontes fecais presentes em uma bacia hidrográfica (USEPA, 2005).

Os métodos dependentes de biblioteca são baseados na identificação de fontes de contaminação fecal na água a partir de sua correspondência direta com uma biblioteca ou base de dados de isolados bacterianos de fontes conhecidas de material fecal, seja diretamente de fezes animais ou então de fontes tais como lagoas de resíduos animais, tanques sépticos e estações de tratamento de esgotos. Em todo caso, a coleta direta do material de referência do local de armazenamento ou logo após a sua excreção é o mais

recomendado, devido à menor suscetibilidade a contaminações externas. Nesses métodos, os padrões bioquímicos e moleculares funcionam como uma impressão digital única para cada isolado microbiano (RANGDALE; MEIJER; RINCÉ, 2003; USEPA, 2005; SARGEANT; KAMMIN; COLLYARD, 2011).

Os métodos dependentes de biblioteca têm sido menos recomendados justamente por causa da dificuldade de criar bibliotecas robustas para assegurar o sucesso na identificação das fontes de contaminação. Segundo o *Microbial Source Tracking Guide Document* (USEPA, 2005), uma biblioteca precisa: i) ser grande o suficiente para identificar a diversidade total presente dentro da população de bactérias de um dado animal hospedeiro; e ii) ser de tamanho suficiente para que isolados ambientais possam ser identificados de forma confiável para o hospedeiro-origem. Atender a ambos os requisitos elencados é, portanto, um processo oneroso, complexo e moroso para o estabelecimento de uma técnica que, contudo, não tem apresentado bom desempenho em estudos comparativos do método RFCM (SARGEANT; KAMMIN; COLLYARD, 2011). Além disso, a estabilidade geográfica, temporal e ambiental dos organismos isolados para fomentar as bibliotecas, a padronização de técnicas de coleta e os métodos analíticos têm sido questionados (USEPA, 2005; SARGEANT; KAMMIN; COLLYARD, 2011).

Apesar do rápido avanço nos estudos de RFCM, principalmente nos últimos 15 anos, nenhuma das técnicas tem sido capaz de atender, com rigor, os objetivos de identificação e caracterização de todas as possíveis fontes de contaminação microbianas de origem fecal em bacias hidrográficas (MEAYS *et al.*, 2004; SANTO DOMINGO *et al.*, 2007; SARGEANT; KAMMIN; COLLYARD, 2011). Esse fato confere à abordagem de RFCM o caráter de ciência experimental, requerendo um trabalho de padronização de métodos e de certificação de laboratórios para realização de trabalhos que contenham níveis aceitáveis de precisão e reprodutibilidade em seus resultados (SARGEANT; KAMMIN; COLLYARD, 2011).

Diante desse cenário atual, Sargeant, Kammin e Collyard (2011) indicam o uso de duas ou mais técnicas em estudos de RFCM, o que tornaria a pesquisa bastante enriquecedora para auxiliar nos planos de ações para o gerenciamento da qualidade das águas.

2.3. Bacteriófagos como método de rastreamento de fontes de contaminação microbiológica da água

Os bacteriófagos (comumente referidos como fagos) são vírus que infectam e se multiplicam dentro de organismos procariontes (ABEDON, 2008). Foram descritos independentemente por Twort, na Inglaterra, em 1915 e por D'Herelle, na França, em 1917, que observaram e descreveram, pela primeira vez, o fenômeno da lise bacteriana (BROCK *et al.*, 1994). Basicamente, os fagos são constituídos de ácido nucleico, que pode ser DNA ou RNA de fita simples ou de fita dupla, envolto por uma capa proteica denominada capsídeo (ou proteínas estruturais), cuja função principal é proteger o material genético, podendo ou não estar envolto por envelope lipoproteico. Assim como todos os vírus, os fagos são parasitas intracelulares obrigatórios, que utilizam, parcial ou integralmente, o metabolismo da célula hospedeira para sua reprodução (WITHEY *et al.*, 2005; JONCZYK *et al.*, 2011).

Quanto à sua morfologia, os fagos exibem ampla variedade, podendo ser icosaédricos, helicoidais ou filamentosos, de acordo com a disposição das proteínas, geralmente em torno de material genético (MATHUR; VIDHANI; MEHNDIRATTA, 2003; CLARK; MARCH, 2006), e com base em seu tamanho e sua morfologia são classificados em 10 famílias filogenéticas diferentes (ACKERMANN; PRANGISHVILLI, 2012). Cerca de 96% dos fagos isolados até o momento, possuem estrutura morfológica similar, portanto pertencem a uma única ordem, *Caudovirales*, que congrega vírus icosaédricos, que apresentam DNA de fita dupla como material genético. Possuem como característica diferencial a cauda, uma estrutura única na natureza, responsável pelo reconhecimento dos hospedeiros e pela injeção do material genético (ACKERMANN, 1999). Aproximadamente 60% dos fagos com cauda longa e não contrátil pertencem à família *Siphoviridae*, 25% dos fagos com cauda contrátil são *Myoviridae* e os de cauda curta e não contrátil são *Podoviridae*. Os outros 4% de fagos isolados revelam uma diversidade morfológica maior, apresentando capsídeo cúbicos, filamentosos e pleomórficos. Esses fagos são classificados em dez famílias distintas, que diferem nas suas propriedades mais básicas e provavelmente constituem grupos ou linhagens filogenéticas independentes (GREGORACCI; SILVEIRA; BROCCHI, 2006; MADIGAN; MARTINKO, 2006; ACKERMANN; PRANGISHVILLI, 2012).

Os bacteriófagos são considerados a forma mais abundante de organismos na biosfera terrestre e podem ser encontrados em todos os ambientes em que as bactérias estão distribuídas, incluindo o solo, a água e dentro de outros organismos (por exemplo, seres humanos) que abrigam bactérias hospedeiras de fagos (por exemplo, a bactéria *E. coli*) (CLOKIE *et al.*, 2011; DÍAZ-MUÑOZ; KOSKELLA, 2014; DUTILH *et al.*, 2014). São facilmente encontrados em fezes e em ambientes aquáticos, geralmente presentes em densidades que variam de 10^4 a 10^8 partículas.mL⁻¹ (WITHEY *et al.*, 2005).

Desde 1959 cerca de 6.300 fagos já foram observados por critérios morfológicos, usando microscopia eletrônica (ACKERMANN; PRANGISHVILLI, 2012). Estima-se que existam aproximadamente 2 bilhões de fagos no mundo (ROHWER, 2003), no entanto, até o momento só foram identificados e sequenciados aproximadamente 337 bacteriófagos com cauda (CASJENS, 2008; GROSE; CASJENS, 2014). No Banco de Genoma Viral do NCBI encontram-se, atualmente, 4.691 genomas virais completos, dos quais 1.498 são de vírus hospedeiro-específicos de bactérias e 66 de Archeas, fundamentalmente bacteriófagos. Considerando que as estimativas de diversidade global de bacteriófagos estejam corretas, ainda há muito a ser estudado, sequenciado e descrito nessa área de pesquisa.

Diante da inexistência de indicadores ideais de contaminação fecal, diversos autores sugerem o uso dos bacteriófagos como organismos indicadores alternativos ao grupo dos coliformes, por exibirem muitos dos atributos importantes de um bom indicador (USEPA, 2015). Os bacteriófagos apresentam elevada resistência no meio ambiente e em processos de tratamento de água e de águas residuárias, simplicidade e baixo custo nas análises de detecção e enumeração, não são patogênicos ao ser humano e, ainda, apresentam estrutura, morfologia, tamanho e composição semelhantes aos dos vírus entéricos humanos (CHUNG; SOBSEY, 1993; GRABOW *et al.*, 1995; JOFRE *et al.*, 1995; DURAN *et al.*, 2002; LUCENA; BLANCH; JOFRE, 2005; MANDILARA *et al.*, 2006; BONILLA *et al.*, 2010; VIJAYAVEL; FUJIOKA; EBDON, 2010; PURNELL; EBDON; TAYLOR, 2011; SANTIAGO-RODRIGUEZ *et al.*, 2013). A *American Public Health Association* (APHA) também recomenda a quantificação de colifagos para avaliar a qualidade microbiológica da água, assim como para indicação de presença de vírus entéricos humanos. A maioria das pesquisas sobre o uso de bacteriófagos como

indicadores fecais foi conduzida com colifagos, que são bacteriófagos que infectam *E. coli* (USEPA, 2005).

A elevada especificidade no reconhecimento das bactérias hospedeiras (ABEDON, 2003; GOODE; ALLEN; BARROW, 2003) torna os bacteriófagos bons candidatos a serem utilizados como ferramentas na distinção de fontes de contaminação fecal humana e animal (PAYAN *et al.*, 2005). Atualmente, uma grande variedade de métodos está disponível para a detecção de bacteriófagos, os quais incluem métodos baseados em cultura ou métodos rápidos, que utilizam dados moleculares ou baseados em imunologia. Dentre todos esses métodos estão os publicados pela Organização Internacional de Normalização (ISO) para bacteriófagos F-RNA específicos, colifagos somáticos e bacteriófagos infectantes de *Bacteroides fragilis* (ANON, 1998a, 1998b, 1998c; GRABOW, 2001; USEPA, 2005).

Dos fagos comumente utilizados como indicadores na avaliação da qualidade de água, três tipos são mais recomendados: i) colifagos somáticos, que adsorvem a receptores situados na parede celular (receptores somáticos); ii) colifagos F-RNA específicos, que adsorvem especificamente ao pili bacteriano ou pili sexual; e iii) fagos que infectam *Bacteroides fragillis* (TARTERA; LUCENA; JOFRE, 1989; GRABOW, 2001; SCOTT *et al.*, 2002; MOCE-LLIVINA; LUCENA; JOFRE, 2005; EBDON; MUNIE; TAYLOR, 2007). Algumas pesquisas indicam vantagens no uso de colifagos somáticos comparado ao uso dos RNA F-específicos, por serem excretados por humanos e animais em maiores concentrações e serem mais persistentes na água do que os demais (GRABOW, 2001; SCHAPER; DURAN; JOFRE, 2002).

2.3.1. Colifagos somáticos

Colifagos somáticos são os fagos que infectam *E.coli* e certos membros da família *Enterobacteriaceae*. Constituem um grupo heterogêneo de vírus, com morfologia muito variada, sendo os mais estudados de todos os fagos (TORANZOS; McFETERS; BORREGO, 2002).

A maioria dos estudos que investigam colifagos somáticos como indicadores fecais são conduzidos em ambientes que possam estar contaminados com fezes humanas e animais (BONILLA *et al.*, 2010; CHARLES *et al.*, 2009; HARAMOTO *et al.*, 2009; PAYMENT; LOCAS, 2011; ZHU *et al.*, 2011; DAVIES *et al.*, 2013). Em fezes de

animais, as contagens variam entre <10 - 10^8 Unidades Formadoras de Placas por grama de amostra (UFP/g), sendo as maiores contagens normalmente encontradas em fezes de porcos, bezerros e galinhas. Em fezes humanas, os colifagos somáticos estão em números mais baixos (normalmente 10^3 UFP/g) (FURUSE, 1983; GRABOW, 2001).

A eficácia do uso de colifagos somáticos como indicadores de contaminação fecal ainda é controversa. Ainda que sua presença nos cursos d'água seja, na maioria das vezes, correlacionada com a presença de fezes de animais de sangue quente, incluindo o ser humano, os fagos são também detectados em áreas não sujeitas à poluição fecal (LECLERC *et al.*, 2000). Leclerc *et al.* (2000) relatam que os colifagos somáticos não são específicos de replicação em *E. coli*, uma vez que também podem se multiplicar em outras espécies da família *Enterobacteriaceae*, como *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloaca*, que são geralmente encontradas associadas com a vegetação e com a formação de biofilmes, ou seja, em fontes não fecais.

Alguns autores questionam a utilização de colifagos somáticos como indicadores de contaminação fecal devido à possibilidade de ocorrência de fagos que se multiplicam em hospedeiros existentes no ambiente (JONCZYK *et al.*, 2011; BERTRAND *et al.*, 2012). Consequentemente, alguns colifagos detectados e enumerados podem ter sido originados fora do intestino de animais, não refletindo rigorosamente a poluição fecal (HOT *et al.*, 2003; GERBA, 2006; JIANG *et al.*, 2007). Contudo, argumentação contrária é apresentada em trabalhos de Muniesa e Jofre (2004), Jofre (2009) e USEPA (2015), cujos dados revelam que a concentração esperada desses vírus no ambiente natural é extremamente baixa e sua replicação muito rara, o que não afetaria seu uso como indicadores.

Em levantamento bibliográfico realizado pela USEPA (2015), constata-se que cerca da metade dos trabalhos realizados com esses indicadores nos últimos 14 anos evidencia correlação positiva com vírus humanos no ambiente, enquanto a outra metade aponta para a ineficácia deste tipo de fagos para indicar contaminação fecal nos corpos hídricos analisados. Hot *et al.* (2003) não constataram associação estatística entre a concentração de colifagos somáticos e a detecção genômica de vírus patogênicos humanos em amostras de águas superficiais analisadas. Payment e Locas (2011), analisando aquíferos canadenses, observaram que os colifagos somáticos não foram preditivos da presença ou ausência de vírus humanos, sendo os colifagos detectados em frequência menor do que os indicadores bacterianos de contaminação fecal. No ano

anterior, no entanto, Lodder *et al.* (2010) observaram significativa associação entre as densidades de colifagos somáticos e enterovírus encontrados em análises de águas de rios na Holanda.

Como os colifagos somáticos constituem um grupo heterogêneo, apresentam reações variadas à processos de inativação (GERBA, 2006). A USEPA (2015) aponta que muitos pesquisadores têm avaliado a sobrevivência de colifagos, além de vírus entéricos, em condições ambientais variadas. Fatores físicos, como temperatura e radiação solar, fatores químicos, como substâncias desinfetantes, e fatores biológicos, como degradação enzimática e predação, têm demonstrado maior ou menor influência sobre a sobrevivência desses vírus no ambiente e isso irá interferir nos estudos em que são utilizados como indicadores.

Em resumo, apesar de os colifagos somáticos serem encontrados em altas densidades nas fezes e em águas poluídas e poderem ser isolados por técnicas relativamente simples, rápidas e de baixo custo, sua utilização como indicadores de contaminação fecal e qualidade da água, em geral, deve ser mais bem investigada. Em estudos de RFCM, os colifagos somáticos não são os mais indicados para distinguir entre fontes de contaminação fecal humana e animal (SARGEANT; KAMMIN; COLLYARD, 2011).

2.3.2. Colifagos F-RNA específicos

Colifagos F+RNA ou F-RNA específicos são bacteriófagos que apresentam RNAss (material genético constituído por RNA de fita-simples senso negativo) que adsorvem a célula hospedeira, especificamente pelo pili F bacteriano ou pili sexual de *E. coli* (estrutura longa presente na superfície de algumas bactérias, que permite a transferência de material genético de uma bactéria doadora para uma receptora). O pili sexual é codificado pelo gene do plasmídeo F ou sexual, um elemento genético extra cromossômico encontrado em cepas masculinas ou F+ de *E. coli* (SOBSEY *et al.*, 1995).

Os fagos F-RNA específicos são possivelmente um dos mais adequados indicadores de vírus entéricos, porque alguns desses fagos, com base em estudos de ecologia, são classificados em quatro diferentes tipos sorológicos (grupos I a IV) e esses sorogrupos podem revelar-se úteis em estudos de rastreamento da fonte de contaminação fecal: os grupos I e IV têm sido detectados apenas em fezes de animais, enquanto os

sorogrupos II e III têm sido quase exclusivamente detectados em fezes humanas (FURUSE *et al.*, 1983; HSU *et al.*, 1995; GRABOW, 2001). Diversos estudos revelaram que essas associações são estatisticamente significativas (SCHAPER; DURAN; JOFRE, 2002; VERGARA *et al.*, 2015).

Havelaar, Vanolphen e Drost (1993) e Jiang, Noble e Chu *et al.* (2001), ao analisarem uma variedade de tipos de água, relataram boa correlação entre os fagos F-RNA específicos e os vírus entéricos. A ausência de colifagos F-RNA específicos também pode evidenciar ausência de vírus entéricos humanos (HAVELAAR; NIEUWSTAD, 1985; IAWPRC, 1991). Love *et al.* (2014) constataram associação positiva entre os colifagos F-RNA específicos e a probabilidade de detecção de adenovírus em águas marinhas recreacionais. Resultados positivos também foram obtidos por Lodder *et al.* (2010), com associação significativa de colifagos F-RNA específicos e enterovírus de um rio na Holanda, e por Rezaeinejad *et al.* (2014), que observaram associação positiva dos colifagos com a densidade do vírus NoV GII.

No entanto, em alguns estudos, como o realizado por Muniesa *et al.* (2009), foram demonstradas fragilidades do uso de fagos F-RNA específicos como ferramenta de RFCM, por exemplo, devido à sobrevivência e à persistência diferenciadas desses sorogrupos diante dos processos de tratamento de águas residuais, ou mesmo após a inativação por estressores naturais (incluindo luz solar, pH e temperatura), o que pode levar à incorreta identificação da origem da contaminação fecal.

Outra desvantagem do uso de fagos F-específicos como indicadores de poluição fecal é que esses organismos estão presentes em menor número em fezes humanas (FUJIOKA, 2002), além de haver alguns relatos de que esses fagos não sobrevivem no meio ambiente pelo mesmo tempo que muitos vírus entéricos (JOFRE, 2009). Sargeant, Kammin e Collyard (2011) apontam como desvantagem do uso de colifagos RNA F o fato de que embora possibilitem distinguir fontes de contaminação animal de fontes humanas, não permitem a distinção entre grupos ou espécies de animais. Harwood (2011) *apud* Sargeant, Kammin e Collyard (2011) também ressaltam como limitação a baixa sobrevivência desses colifagos em águas com temperaturas mais elevadas. Por sua vez, Payment e Locas (2011) constataram que os fagos F-RNA específicos não permitiram prever a presença ou ausência de vírus humanos. Resultado negativo também foi apresentado no trabalho de Boehm *et al.* (2009), no qual os colifagos F-RNA específicos não apresentaram associação com adenovírus e enterovírus.

2.3.3. Bacteriófagos que infectam bacteroides

Bacteroides são bactérias anaeróbicas obrigatórias, gram-negativas, que constituem parte importante da biota bacteriana do trato intestinal humano e animal (contagens maiores que 10^9 - 10^{10} por grama de fezes). Existe uma variedade de espécies de bacteroides conhecidas: *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. uniformis*, *B. stercoris*, *B. eggerthii*, *B. merdae*, *B. caccae* (GHERNA; WOESE, 1992), *B. oralise*, *B. Melaninogenicus* (KELLER; TRAUB, 1974). São reconhecidas como sendo altamente hospedeiro-específicas, característica que despertou o uso de fagos que infectam bacteroides, principalmente *B. fragilis*, como marcadores em estudos de RFCM (SIMPSON; SANTO DOMINGO; REASONER, 2002; GOMEZ-DONATE *et al.*, 2011). *B. fragilis* é uma das espécies de bactérias mais numerosas no intestino e nas fezes humanas e são rapidamente inativadas no ambiente, mediante processos aeróbios (BALLESTÉ; BLANCH, 2010).

Os primeiros fagos que infectam bacteroides propostos como indicadores de contaminação fecal humana foram os que infectam *B. fragilis* HSP-40, isolados em Barcelona, Espanha, por Jofre e colaboradores em 1986. Esses autores também sugeriram que esses fagos são incapazes de se replicarem no ambiente, tornando-os potenciais indicadores de contaminação fecal e marcadores de RFCM. A presença de fagos com capacidade de infectar HSP-40 em águas contaminadas com fezes humanas, bem como sua ausência em águas poluídas com fezes de outros animais, foram também constatadas por Tartera e Jofre, em 1987. No entanto, o isolamento de fagos que infectam bacteroides a partir de esgoto sanitário já tinha sido demonstrado em estudos anteriores (SABISTON; COHL, 1969; PRÉVOT *et al.*, 1970; NACESCU; BRANDIS; WERMER, 1972).

Atualmente, a validade do uso de fagos que infectam bacteroides como indicadores de contaminação fecal humana é refletida na norma ISO 10705-4 (*International Organization for Standardization*), e diversos estudos de recuperação de fagos que infectam *B. fragilis* foram realizados (EBDON; TAYLOR, 2006; GERBA, 2006; GOMEZ-DONATE *et al.*, 2011; JOFRE *et al.*, 2014; CASANOVAS-MASSANA *et al.*, 2015).

Há também sugestões de que essa especificidade de hospedeiros possa apresentar variações regionais e que estudos de RFCM possam ter validade apenas local (EBDON;

MUNIE; TAYLOR, 2007). Os fagos que infectam bacteroides em determinada região não são necessariamente detectados em amostras de origem semelhante em outras localidades (PUIG *et al.*, 1999). Por exemplo, o uso de *B. fragilis* HSP-40 mostrou-se bem-sucedido na região do Mediterrâneo (TARTERA; JOFRE, 1987; TARTERA *et al.*, 1989; CORNAX *et al.*, 1990; SUN *et al.*, 1997; DURAN *et al.*, 2002) e no sul da África (GRABOW *et al.*, 1995), porém não foi possível detectar um número significativo de bacteriófagos no norte da Europa (PUIG *et al.*, 1999) e nos Estados Unidos (KATOR; RHODES, 1992). Essa diferença pode ser atribuída às diferenças regionais na microbiota intestinal humana, o que evidencia que diferentes cepas de bacteroides devem ser testadas como hospedeiros específicos em diferentes bacias ou regiões geográficas (EBDON; MUNIE; TAYLOR, 2007). Portanto, estudos têm sido realizados na busca de novas cepas hospedeiras de fagos que infectam bacteroides. Payan *et al.* (2005) identificaram três cepas, GA-17 e HB-13, na Espanha e na Colômbia, respectivamente, e GB-124, na Inglaterra, como promissoras ferramentas em estudos de RFCM para rastreamento de contaminação fecal humana.

2.4. Genotipagem de oocistos de *Cryptosporidium* spp. como ferramenta para rastreamento de fontes de contaminação microbiológica de águas superficiais

Cryptosporidium é um protozoário parasita intracelular obrigatório que se desenvolve preferencialmente nas microvilosidades de células epiteliais do trato gastrointestinal, respiratório e urinário, podendo atingir uma variedade de hospedeiros, inclusive o ser humano, infectando tanto indivíduos imunocomprometidos como imunocompetentes (KOTHAVADE, 2012; THOMPSON; MONIS, 2012).

A primeira espécie do gênero, *Cryptosporidium muris*, foi descrita por Ernest Edward Tyzzer, em 1910, após observar esse organismo em glândulas gástricas de camundongos assintomáticos. Em 1912 uma nova espécie, *Cryptosporidium parvum*, com tamanho inferior ao da primeira, foi identificada pelo mesmo autor, localizada em células intestinais de camundongos de laboratório. Em 1955 foi documentada outra espécie, *Cryptosporidium meleagridis*, seguida do reconhecimento do *Cryptosporidium* como o agente causador da diarreia bovina, em 1971 (XIAO; RYAN, 2004; FAYER; SANTÍN; XIAO, 2005).

Atualmente são reconhecidas pelo menos 26 espécies do gênero *Cryptosporidium*, classificadas de acordo com alguns componentes básicos, como hospedeiro natural, morfologia dos oocistos, caracterização genotípica e conformidade com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) (Tabela 1) (ASSIS *et al.*, 2013; CHALMERS; KATZER, 2013; SHARMA *et al.*, 2013). Embora *Cryptosporidium* seja ainda considerado relativamente hospedeiro-específico, estudos de transmissão cruzada e estudos moleculares de investigações epidemiológicas revelam que a transmissão de algumas espécies e de alguns genótipos entre diferentes hospedeiros pode ocorrer, o que tem gerado certa divergência entre pesquisadores quanto ao número de espécies reconhecidas. Em geral, as espécies de *Cryptosporidium* são agrupadas como aquelas que infectam mamíferos, aves, peixes, répteis e anfíbios. Dessas, seis espécies são reconhecidas como causadoras de criptosporidiose humana: *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium parvum*, seguidas em ordem de importância por *Cryptosporidium meleagridis* e, ocasionalmente, *Cryptosporidium cuniculus*, *Cryptosporidium felis* e *Cryptosporidium canis* (XIAO, 2010).

Segundo Tzipori e Ward (2002), é possível mencionar três momentos que ressaltam a relevância desses microrganismos na saúde pública: o primeiro em 1980, quando *Cryptosporidium* foi confirmado como sendo o agente etiológico de surtos e casos esporádicos de diarreia em alguns mamíferos; o segundo em 1983, com a ocorrência de infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos, principalmente devido à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS); e o terceiro, em 1993, com grande repercussão, com o surto de Milwaukee, nos Estados Unidos.

Algumas características do parasita *Cryptosporidium* reforçam seu potencial de transmissão por meio da água: i) seu ciclo biológico é desenvolvido em um único hospedeiro que excreta grande número de oocistos nas fezes, por exemplo, um único bezerro infectado pode eliminar de 10^9 - 10^{10} oocistos/semana (FAYER, DUBEY; LINDSAY, 2004); ii) a transmissão zoonótica aumenta o potencial para ocorrência de infecção no ser humano e, conseqüentemente, sua eliminação no ambiente; e iii) os oocistos são resistentes às condições ambientais, portanto podem chegar às estações de tratamento de água (ETAs) e nestas precisam ser removidos, no entanto apresentam também resistência acentuada à ação dos agentes desinfetantes frequentemente empregados no tratamento de água, particularmente ao cloro (CAREY; LEE; TREVORS, 2004; MONIS; KING; KEEGAN, 2014). Sua remoção depende basicamente

Tabela 1 – Espécies de *Cryptosporidium*, respectivos hospedeiros principais, tamanho dos oocistos e infectividade para o ser humano

Espécie	Hospedeiro Principal	Infeccioso para o Ser Humano	Tamanho dos Oocistos (µm)	Referência
<i>C. hominis</i>	Ser humano	Sim	4,5 x 5,4	Morgan-Ryan <i>et al.</i> (2002)
<i>C. parvum</i>	Ruminantes	Sim	4,5 x 5,5	Tyzzer (1912)
<i>C. andersoni</i>	Bovinos	Sim	5,5 x 7,4	Lindsay <i>et al.</i> (2000)
<i>C. muris</i>	Roedores	Sim	5,6 x 7,4	Tyzzer (1907)
<i>C. suis</i>	Suínos	Sim	4,4 x 4,9	Ryan <i>et al.</i> (2004)
<i>C. felis</i>	Felinos	Sim	4,5 x 5,0	Iseki (1979)
<i>C. canis</i>	Canídeos	Sim	3,68 x 5,88	Fayer <i>et al.</i> (2001)
<i>C. bovis</i>	Bovinos	--	4,63 x 4,89	Fayer, Santín e Xiao (2005)
<i>C. ryanae</i>	Bovinos	--	3,16 x 3,73	Fayer <i>et al.</i> (2008)
<i>C. xiaoi</i>	Ovelhas	--	2,94 x 3,44	Fayer e Santín (2009)
<i>C. wairi</i>	Cobaias	--	4,0 x 4,8	Vetterling <i>et al.</i> (1971)
<i>C. baileyi</i>	Aves	Sim	5,2 x 6,3	Current <i>et al.</i> (1986)
<i>C. meleagridis</i>	Aves	Sim	4,5 x 4,6	Slavin (1955)
<i>C. galli</i>	Aves	--	6,2 x 8,5	Ryan <i>et al.</i> (2003)
<i>C. serpentis</i>	Répteis	--	4,8 x 5,6	Levine (1980)
<i>C. fayeri</i>	Cangurus	--	4,3 x 4,9	Ryan <i>et al.</i> (2008)
<i>C. macropodum</i>	Cangurus	--	4,9 x 5,1	Power e Ryan (2008)
<i>C. varanii</i>	Lagartos	--	4,7 x 4,8	Pavlashek e Ryan (2008)
<i>C. ubiquitum</i>	Cervos	Sim	5,04 x 4,66	Fayer <i>et al.</i> (2010)
<i>C. cuniculus</i>	Coelhos	Sim	5,98 x 5,38	Robinson <i>et al.</i> (2010)
<i>C. tyzzeri</i>	Camundongos	--	4,64 x 4,19	Ren <i>et al.</i> (2012)
<i>C. viatorum</i>	Ser humano	Sim	5,35 x 4,72	Elwin <i>et al.</i> (2012)
<i>C. scrofarum</i>	Suínos	Sim	5,16 x 4,83	Kvac <i>et al.</i> (2013)
<i>C. fragile</i>	Sapo	--	6,2 x 5,5	Jirku <i>et al.</i> (2008)
<i>C. molnari</i>	Peixes	--	4,7 x 4,5	Sitja-Bobadilla <i>et al.</i> (2005)
<i>C. scophthalmi</i>	Peixes	--	4,4 x 3,9	Alvarez-Pellitero <i>et al.</i> (2009)

Fonte: adaptada de Franco, Branco e Leal (2012) e Chalmers e Katzer (2013). (--) Ausência de casos em humanos.

das etapas de clarificação dos tratamentos convencionais, ou seja, coagulação, floculação, decantação e filtração, desde que submetidas a rigoroso controle operacional (DUGAN *et al.*, 2001; CAREY; LEE; TREVORS, 2004; KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007; FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012).

O modo de transmissão de *Cryptosporidium* spp. ocorre via fecal-oral, com três possíveis formas de transmissão: contato pessoa-pessoa ou animal-pessoa, alimentos contaminados e transmissão hídrica, sendo esta considerada a principal forma de transmissão (SMITH *et al.*, 2006; GRACZYK *et al.*, 2009).

A capacidade desse protozoário de romper as múltiplas barreiras no tratamento convencional da água e causar surtos em larga escala teve enorme impacto sobre os sistemas de abastecimento de água e sua regulação. *Cryptosporidium* tem sido tomado como protozoário de referência em estudos de avaliação quantitativa de risco

microbiológico (AQRM) aplicado ao abastecimento de água para consumo humano, para apoiar os planos de segurança de água, bem como em normas de qualidade da água para consumo humano (SIGNOR; ASHBOLT; ROSER, 2007; SMEETS, 2008; SIGNOR; ASHBOLT, 2009; WHO, 2011).

Estudos sobre *Cryptosporidium* são essenciais pela sua relevância em saúde pública; e isso não é uma preocupação exclusiva em países em desenvolvimento, com infraestrutura sanitária deficiente, pois países com elevado padrão de abastecimento de água e tratamento de esgotos também enfrentam problemas relacionados à ocorrência de surtos de transmissão via água de consumo.

No Brasil, embora a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) estabeleça a necessidade de avaliação da presença dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em mananciais de abastecimento para consumo humano, vários fatores dificultam o atendimento dessa recomendação em curto prazo, como, por exemplo, a complexidade inerente aos métodos de detecção, o custo das análises e a carência de recursos humanos qualificados para o trabalho laboratorial. Logo, a escassez de informações disponíveis sobre a ocorrência desses agentes patogênicos nos recursos hídricos nacionais ainda prevalece.

Os seres humanos e os animais de criação têm sido considerados as principais fontes de contaminação de oocistos de *Cryptosporidium* em águas superficiais (JIANG *et al.*, 2005b), mas cães e gatos também podem representar risco em termos de saúde pública (BOWMAN; LUCIO-FORSTER, 2010; UEHLINGER *et al.*, 2013). Os animais silvestres também podem ser infectados com oocistos de *Cryptosporidium* e, assim, constituir mais uma fonte de contaminação da água. Contudo, a maioria das espécies de *Cryptosporidium* encontrada em animais selvagens naturalmente infectados é diferente daquelas que afetam os humanos (APEELBEE; THOMPON; OLSON, 2005). De fato, sabe-se que nem todas as espécies conhecidas de *Cryptosporidium* são patogênicas para os seres humanos. Logo, o conhecimento da fonte de contaminação é necessário para uma avaliação efetiva e a para seleção de práticas adequadas de gerenciamento para reduzir a contaminação desses parasitas em águas superficiais (XIAO; RYAN, 2004).

Em nível mundial, protozoários foram a causa de 524 surtos de veiculação hídrica nos últimos anos, destacando-se o período compreendido entre 1984 e 2004 e, posteriormente, de janeiro de 2004 a dezembro de 2010, com 325 e 199 surtos

epidêmicos, respectivamente (FRANCO; BRANCO; LEAL, 2012). No entanto, esse número provavelmente representa apenas uma parcela do número total de surtos ocorridos, uma vez que nem todos os surtos são documentados na literatura científica, devido a fatores como: escassez de dados sobre a ocorrência de protozoários em águas destinadas ao consumo humano; dificuldade de detecção e enumeração com acurácia pelas técnicas empregadas de rotina; e, muitas vezes, associação de surtos seguidos de óbito com outros patógenos. Esse problema decorre, particularmente, das baixas concentrações de protozoários encontradas na água e dos altos custos das técnicas utilizadas (LEMARCHAND; LEBARON, 2003). Assim, o desenvolvimento de ferramentas moleculares tem sido fundamental para melhorar a compreensão da transmissão do *Cryptosporidium* pela água e identificar suas fontes de contaminação no ambiente.

A utilização de análises moleculares para detecção e caracterização de *Cryptosporidium* em nível de espécies tem contribuído significativamente para a compreensão da biologia e epidemiologia das espécies, na estrutura genética de populações, na transmissão do parasita e na especificidade de hospedeiros (THOMPSON; PALMER; O'HANDLEY, 2008). Por apresentarem pequenas diferenças nos genes que codificam proteínas da unidade ribossomal, que é utilizada para caracterizar, mesmo que robustamente, hospedeiros específicos, as espécies do gênero *Cryptosporidium* têm sido sugeridas como marcadores potenciais para possível rastreamento de fontes de contaminação microbiológica da água (XIAO; RYAN, 2004), contando com uma vasta biblioteca já consolidada no GenBank. Resultados da distinção de genótipos patogênicos e não patogênicos para o ser humano podem prevenir alarmes desnecessários, pois, caso contrário, todo oocisto detectado seria considerado de risco potencial à saúde pública.

O emprego de técnicas de biologia molecular, particularmente de métodos baseados na reação em cadeia pela polimerase (RFLP, AFLP *Finger printing* e *qPCR*, sequenciamento) oferece muitas vantagens em relação às demais técnicas na caracterização molecular de oocistos em amostras ambientais por apresentarem maior especificidade e alta sensibilidade. (JENKINS *et al.*, 2010). Os métodos de PCR não apenas podem ser aplicados na detecção de um pequeno número de oocistos (RAMIRES; WARD; SREEVATSAN, 2004), mas também na amplificação de DNA

extraído diretamente de amostras ambientais, sem a necessidade de isolar oocistos intactos (WIDMER; FENG; TANRIVERDI, 2004).

Para aumentar a sensibilidade do método é possível a utilização de técnicas como a *Nested-PCR*, que é um método de PCR no qual o produto amplificado (*amplicon*) é submetido a um segundo processo de amplificação, utilizando um conjunto de iniciadores homólogos nas sequências internas do segmento já amplificado. Esse procedimento torna a reação de PCR mais específica e sensível. Geralmente na primeira PCR é utilizado um iniciador gênero-específico e na segunda, um iniciador espécie-específico do organismo em estudo (ALMEIDA, 2004). No entanto, alguns fatores influenciam a eficiência das técnicas de PCR, como a presença de inibidores na amostra, que interfere na interação entre o DNA e o DNA polimerase, e a dificuldade na liberação (lise celular), extração e purificação do DNA dos oocistos, devido à dificuldade de ruptura da parede dos oocistos, podendo incorrer em resultados falso-negativos (JOHNSON *et al.*, 1997; GOBET *et al.*, 2011).

A dificuldade de ruptura da parede dos oocistos para liberação do material genético representa uma das maiores limitações no uso das técnicas de biologia molecular. A etapa de lise da parede dos oocistos é determinante, já que possui espessura de 40 nm (HARRIS; PETRY, 1999) e é composta por quatro camadas, além da presença de estruturas particuladas e glicoproteína filamentosa (PETRY, 2004). A maioria dos protocolos de extração de DNA utiliza ciclos de congelamento e descongelamento ou pérolas de vidro para ruptura da parede do oocisto, em conjunto ou não com proteinase K (CAREY; LEE; TREVORS, 2004). A sensibilidade de diferentes métodos de extração de DNA genômico de *Cryptosporidium* tem sido avaliada tanto em amostras clínicas como em amostras ambientais. Sabe-se que a eficiência dos protocolos depende da eliminação de inibidores presentes nas amostras, da metodologia utilizada na lise celular e da escolha de iniciadores adequados para reação de amplificação do fragmento de interesse (CHALMERS; KATZER, 2013).

Com a grande diversidade de espécies de *Cryptosporidium* observadas em amostras ambientais, uma ferramenta de genotipagem apropriada deve utilizar um gene-alvo com capacidade de identificar todas as espécies ou genótipos. Ao longo dos anos, uma série de genes-alvo diferentes foi utilizada para detecção e diferenciação de espécies de *Cryptosporidium*, entre eles: *18S RNAr*, *HSP70 (HeatShockProtein)*, *COWP (Cryptosporidium Oocyst Wall Protein)*, *CPRI (Cryptosporidium repetitivewallprotein)*,

o gene *TRAPC-1* e *TRAPC-2* (*Thrombospondin-related Adhesive Proteins*), *GP60 DNA* (60-kDa glycoprotein), *ITS2 RNAr* (second internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal), entre outros (CAREY; LEE; TREVORS, 2004; RAMIREZ; WARD; SREEVATSAN, 2004; XIAO; RYAN, 2004; CHALMERS *et al.*, 2009; CARVALHO-ALMEIDA *et al.*, 2006; FERGUSON *et al.*, 2006). Dentre esses, o *18S RNAr* é o mais utilizado pelos pesquisadores, uma vez que representa o gene com maior capacidade de genotipagem em diferentes isolados de diferentes espécies, inclusive em amostras ambientais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Verificar, em situações específicas - nas bacias hidrográficas do Ribeirão São Bartolomeu (Viçosa, MG) e do Rio Ouse (Reino Unido) – a aplicabilidade do uso de bacteriófagos e *Cryptosporidium* como indicadores de contaminação fecal em estudos de rastreamento de fontes de contaminação microbiológica de mananciais de abastecimento de água para consumo humano.

3.2. Objetivos específicos

- Pesquisar a ocorrência de colifagos somáticos, fagos F-RNA e bacteriófagos que infectam *Bacteroides fragilis* nas bacias hidrográficas do Ribeirão São Bartolomeu e do Rio Ouse;

- Pesquisar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* nas bacias hidrográficas do Ribeirão São Bartolomeu e do Rio Ouse e realizar a caracterização molecular das espécies encontradas;

- Monitorar variáveis físicas e microbiológicas de qualidade da água nas bacias hidrográficas do Ribeirão São Bartolomeu e do Rio Ouse

- Verificar a existência de associação de ocorrência de bacteriófagos e de *Cryptosporidium* com os demais dados de qualidade da água nas bacias hidrográficas do Ribeirão São Bartolomeu e do Rio Ouse

- Verificar a existência de associação de ocorrência de bacteriófagos e de *Cryptosporidium* com o uso e ocupação do solo nas bacias hidrográficas do Ribeirão São Bartolomeu e do Rio Ouse

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Localização e caracterização das áreas de estudo

4.1.1. Bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu, Viçosa, MG

O município de Viçosa está localizado na Zona da Mata mineira entre as coordenadas geográficas 42° 52' 58" W e 42° 50' 56" W de longitude e 20° 43' 42" S e 20° 50' 12" S de latitude, a altitude média de 648 metros e ocupa área de 299,418 km² (ARRUDA, 1997). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população estimada de Viçosa em 2014 era de 76.745 habitantes (INSTITUTO... – IBGE, 2014), com densidade demográfica de 241,2 hab./km², a maioria concentrada na área urbana (aproximadamente 90%). O município apresenta cobertura dos serviços básicos de saneamento superior às médias estadual e nacional: cerca de 90% da população é atendida por sistemas de coleta de esgotos e 98% por abastecimento de água (SAAE, 2014). Viçosa dispõe de dois sistemas principais de abastecimento de água (ETA I e ETA II), operados pelo Serviço Autônomo de Água e Esgotos (SAAE) (uma autarquia municipal), interconectados e que abastecem a população residente na zona urbana do município. Entretanto, o tratamento de esgotos é ainda praticamente inexistente – Laudo da Secretaria Estadual de Meio Ambiente (SEMAD), realizado a pedido do Ministério Público de Minas Gerais, revelou que 97% do esgoto sanitário produzido na cidade de Viçosa é lançado nos cursos d'água do município, sem qualquer tratamento (MINISTÉRIO..., 2014).

A bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu (RSB), componente da bacia do rio Doce, abrange área de 5.500 ha, representando 18% da área do município de Viçosa (Figura 1). Mais especificamente, o estudo foi conduzido na área de drenagem (aqui

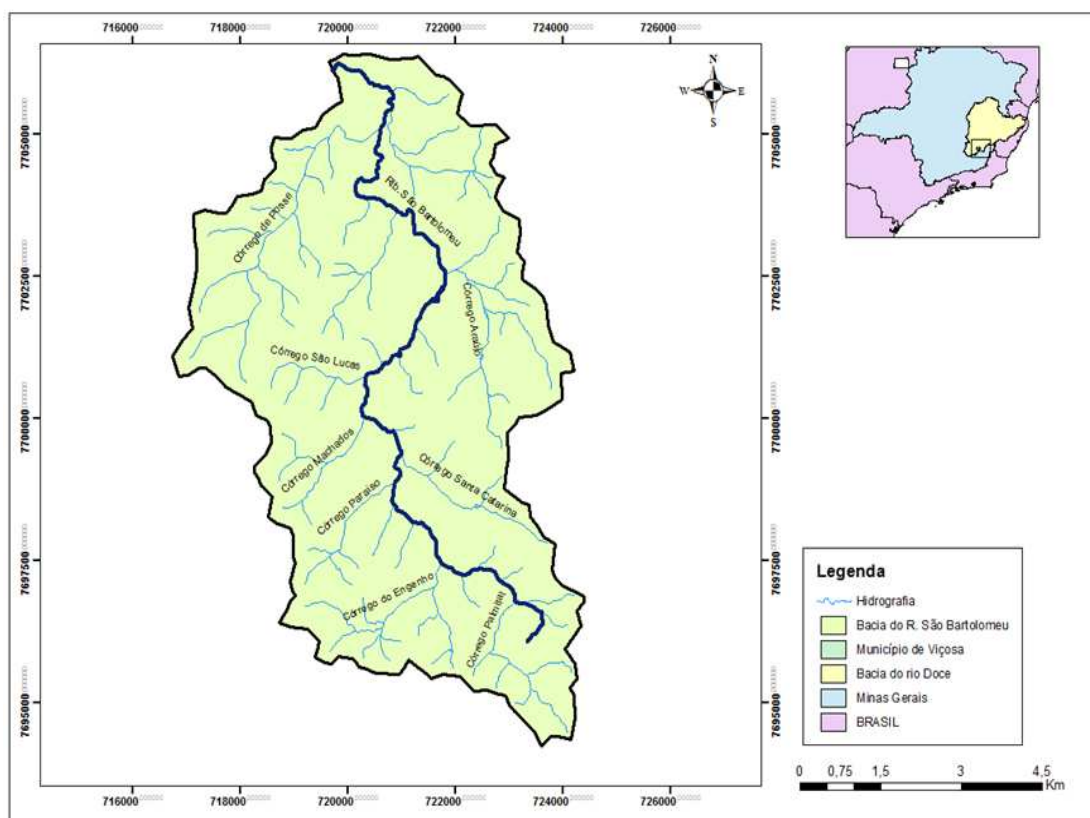


Figura 1 – Delimitação da bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu, Viçosa Minas Gerais, Brasil, 2015.

chamada de bacia de captação) com aproximadamente 2.000 ha situada à montante do ponto de captação de água para abastecimento da população residente em partes da área urbana do município e do público usuário do campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

O RSB é um curso hídrico de reduzida vazão, responsável por cerca de 70% do abastecimento de água de Viçosa no período de chuvas e cerca de 30% do abastecimento no período de estiagem (ETA I) e por 100% do abastecimento no campus universitário da UFV, que possui seu próprio sistema de abastecimento de água. O RSB recebe o aporte hídrico de sete córregos, que definem os fundos de vale das sub-bacias de drenagem correspondentes, as quais serviram como unidade territorial básica no presente estudo. Essas sub-bacias recebem, informalmente, a mesma denominação do respectivo curso d'água principal: sub-bacia 1: 'Ribeirão São Bartolomeu' (referente ao próprio ribeirão São Bartolomeu), sub-bacia 2: córrego "São Lucas", sub-bacia 3: córrego dos Machados, sub-bacia 4: córrego Santa Catarina, sub-bacia 5: córrego Paraíso, sub-bacia 6: córrego Palmital, sub-bacia 7: córrego "Antuérpia", e sub-bacia 8: córrego do Engenho (Figuras 1 e 6).

No campus da UFV o ribeirão São Bartolomeu recebe cinco barramentos consecutivos e segue seu curso pela área urbana de Viçosa. As duas primeiras represas da UFV cumprem a função de reservatórios de regularização de vazões e acumulação de água, sendo que próximo ao eixo da segunda represa se encontram as estruturas de captação de água para abastecimento da ETA UFV e da ETA I do SAAE.

A área de estudo foi caracterizada com base em quatro classificações quanto ao uso e ocupação do solo: urbano, pastagem, mata nativa e solo exposto (Figura 2). A ocupação populacional se dá de forma mais intensa nas regiões mais próximas à área urbana da cidade e ao campus universitário. Cabe ressaltar que o manancial não é protegido da contaminação humana ou animal durante o seu curso até os pontos de captação. Há ainda áreas florestais, entretanto a predominância é de pastagens degradadas, principalmente nos locais com maior declividade.

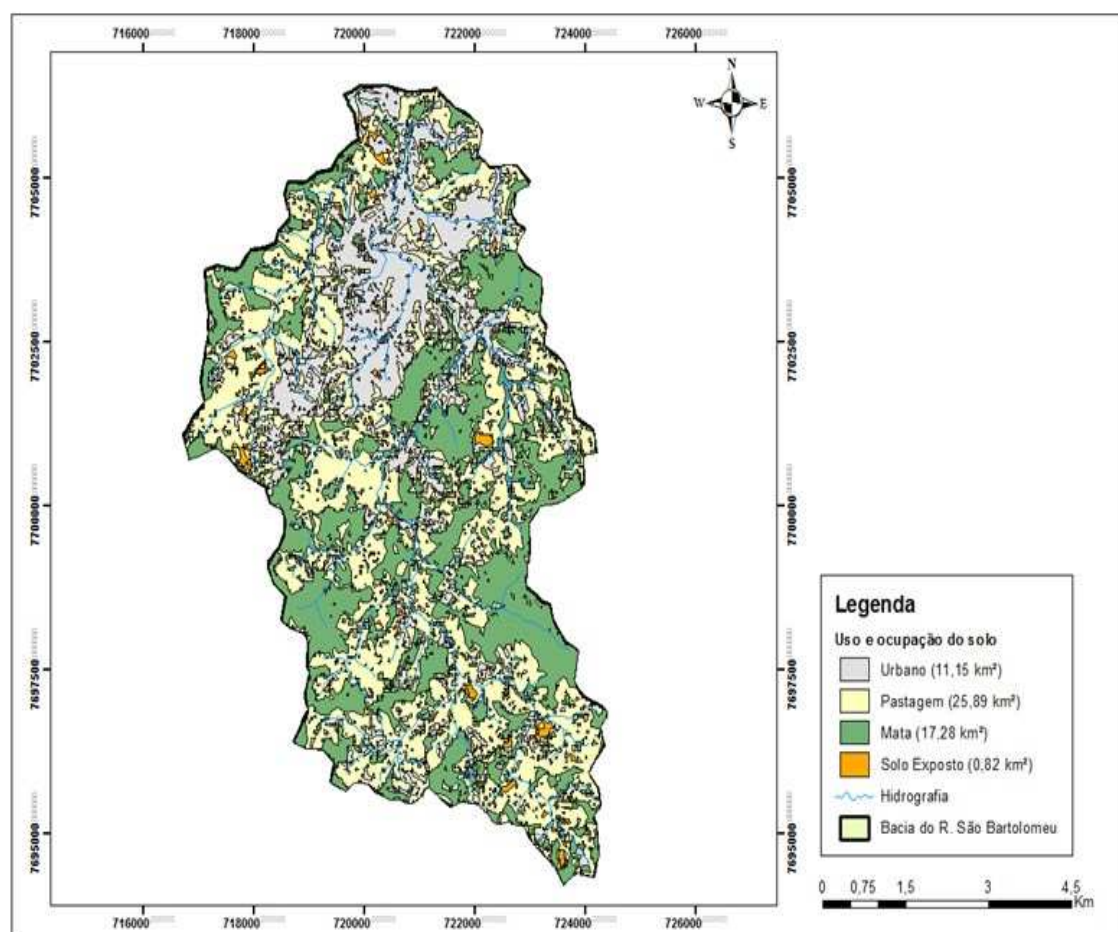


Figura 2 – Mapa de uso e ocupação do solo, bacia de captação do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, 2015.

Informações sobre uso e ocupação do solo e de usos conflitantes da água na bacia do RSB foram levantadas inicialmente por Dias (2007) e confirmadas com boa aproximação no Projeto Plano de Segurança da Água, coordenado pelo orientador deste trabalho e cujos resultados estão em parte expressos em Bezerra (2011). As informações foram obtidas a partir de atividades de campo, por meio da aplicação de questionários orientados para o levantamento de todas as propriedades rurais e comunidades Peri urbanas quanto à exploração animal, aos usos da água, ao tipo de destino dos dejetos, à produção agrícola e, adicionalmente, às principais fontes difusas e pontuais de poluição (por exemplo, os pontos de descargas de esgoto sanitário nos cursos d'água). Para o presente estudo, somente informações das fontes de contaminação mais impactantes foram levantadas, como a criação intensiva de animais e os pontos de lançamento de esgoto sanitário.

Esses estudos indicaram a existência de 249 propriedades rurais e residenciais (Figura 3), devendo ser ressaltado que 25,3% (63/249) das propriedades apresentam potencial para exploração de animais. Constatou-se que a criação de bovinos é a atividade que mais se destacava na bacia, sendo realizada de forma não confinada, com exceção de uma propriedade, localizada na sub-bacia Antuérpia, que possuía uma bovinocultura com um total de 80 animais confinados. No momento da pesquisa, a mesma propriedade possuía ainda uma suinocultura, com criação de aproximadamente 180 suínos. Vale destacar que nenhum tipo de tratamento dos resíduos gerados era realizado, sendo estes, normalmente, utilizados como esterco em áreas de pastagem.

Em outras duas propriedades, localizadas na sub-bacia córrego do Engenho, há criação de suínos, com um total de 140 animais em cada uma. O tratamento de efluentes é realizado por biodigestores e sistemas de lagoas de estabilização. Ainda nessa sub-bacia existe uma caprinocultura, com criação de 20 animais.

Com relação à fonte de água utilizada para criação de animais, na época da pesquisa 47,6% das propriedades utilizavam mina/nascente; 21,4% água de rio/ribeirão; 19,0% água proveniente de poço artesiano; 7,1% água de poço/cisterna e 4,8% água de represa/lago/lagoa (SILVA, 2010). Quanto ao destino do esgoto doméstico, 36,5% das propriedades tinham fossa seca; 16,8% fossa com sumidouro; 2,0% fossa séptica; em 32,9% o esgoto era lançado nos cursos d'água; em 1,6% a céu aberto, e 10% eram atendidas por rede pública.

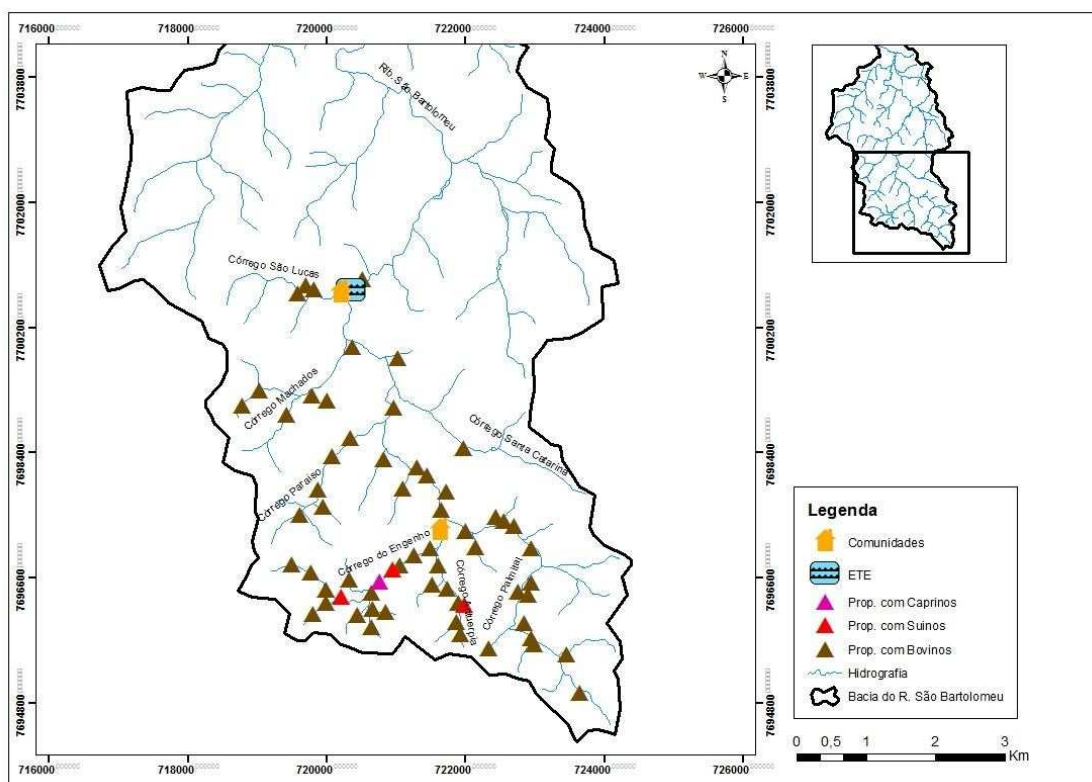


Figura 3 – Localização das fontes pontuais de poluição na bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, 2015.

4.1.2. Bacia hidrográfica do rio Ouse – Sudeste da Inglaterra, Reino Unido

A bacia hidrográfica do rio Ouse, situada no condado de Sussex do Leste, sudeste da Inglaterra, Reino Unido, abrange uma área de aproximadamente 396.000 ha; trata-se da segunda maior bacia em Sussex (Figura 4) e é dividida em quatro sub-bacias: Alto Ouse, Médio Ouse, Baixo Ouse e sub-bacia do rio Uck. O rio Ouse é o principal rio da bacia e possui 273 km de extensão.

A área foi selecionada, por englobar uma gama diversificada de fontes de contaminação potenciais e usos diversos do solo, incluindo áreas urbanas, presença de 37 estações de tratamento de esgoto (ETEs) (Figura 5) que descarregam efluentes parcialmente tratados no sistema fluvial, atividades agropecuárias intensas, com predominância de criação de bovinos, e áreas parcialmente arborizadas (EDBON; MUNIE; TAYLOR, 2007). Das ETEs existentes na bacia, três são bem relevantes devido ao volume de esgoto lançado nos cursos d'água e também por estarem localizadas bem próximas (distância < 3,0 km) aos pontos de coleta: i) Scaynes Hill *waste water treatment works* (WWTW), localizada à jusante dos pontos Goldbridge,

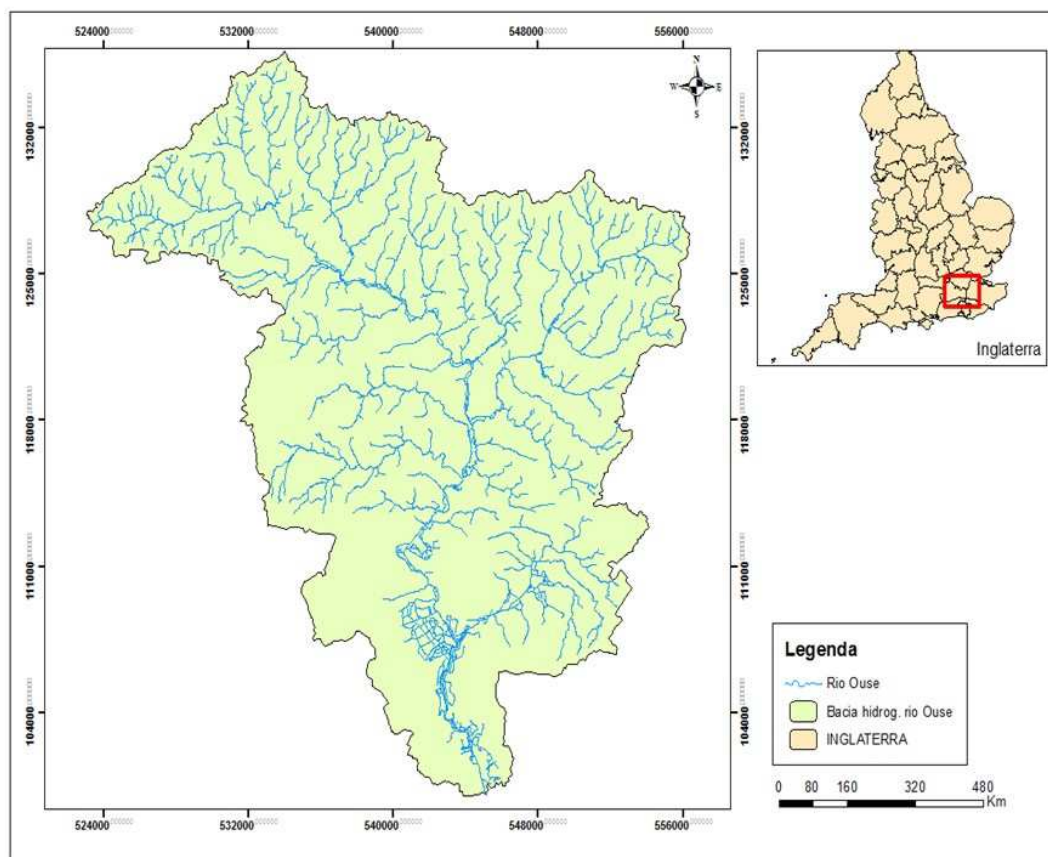


Figura 4 – Bacia do rio Ouse, sudeste da Inglaterra, Reino Unido.

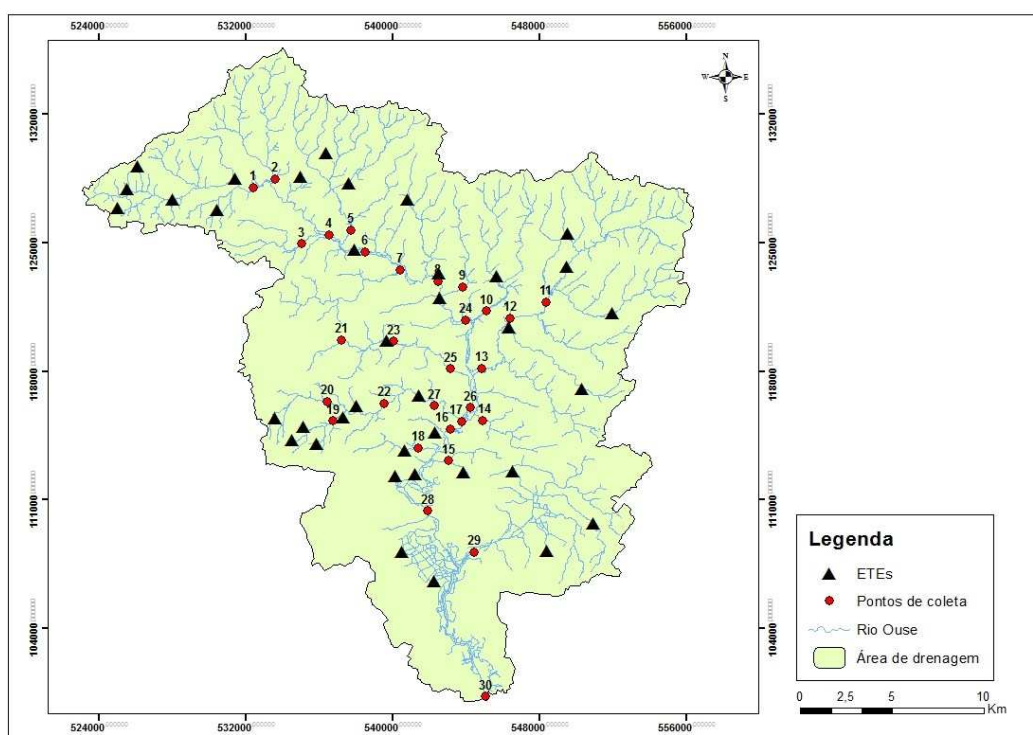


Figura 5 – Localização das estações de tratamento de esgotos na Bacia do rio Ouse, Sudeste da Inglaterra, Reino Unido.

Scaynes Hill; ii) Uckfield WWTW próxima a Isfield e Barcombe Mills; e iii) Ditchling WWTW, à jusante de Isfield and Scaynes Hill.

4.2. Coleta de amostras de água

Na bacia hidrográfica do RSB, o monitoramento foi realizado em cada uma das sub-bacias descritas no item anterior (Figuras 6 e 7) e também no ponto de captação das estações de tratamento de água (ETA -UFV e ETA I -SAAE).

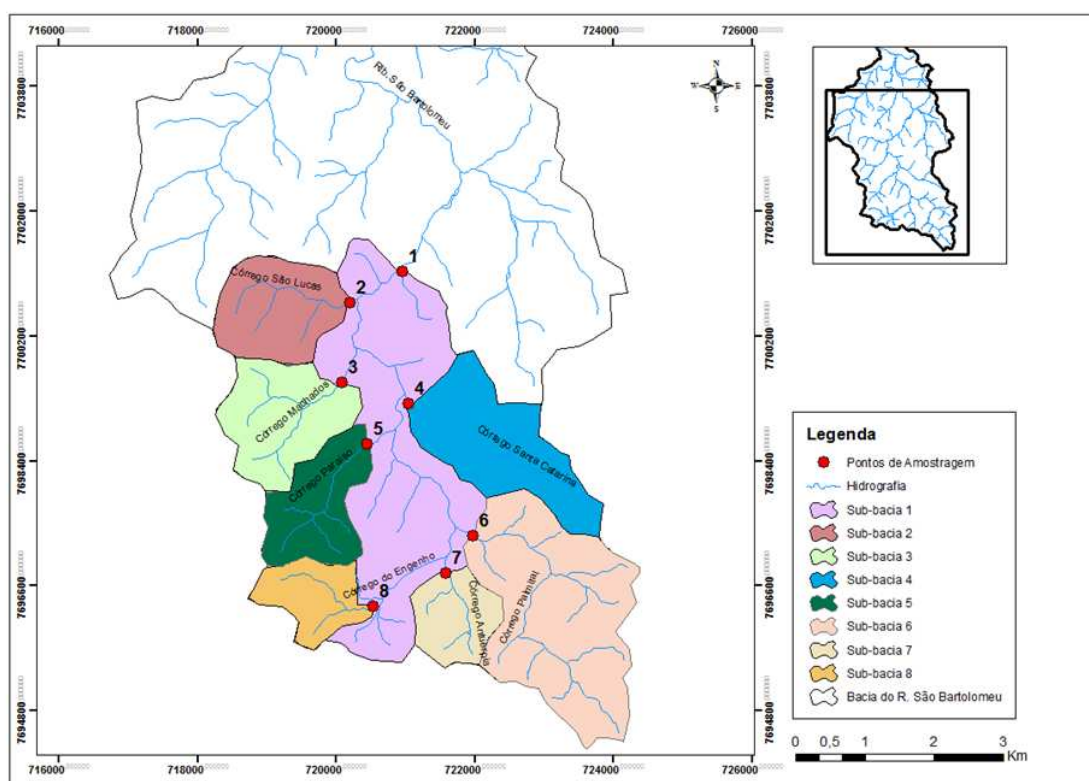


Figura 6 – Localização dos pontos de coleta de água na bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu, Viçosa, MG.

O monitoramento de fagos e das demais variáveis de qualidade foram realizados no período de julho de 2012 a maio de 2014. Nos períodos de fevereiro a julho de 2013 e de fevereiro a agosto de 2014 foi realizado o monitoramento de *Cryptosporidium*.

Na bacia do rio Ouse, inicialmente foram selecionados 27 pontos de amostragem, que buscavam englobar as diferentes atividades antrópicas na bacia que afetam a qualidade microbiológica da água a jusante do rio, permitindo uma visão global da dinâmica da poluição fecal. Posteriormente, mais três pontos foram incluídos (Figura 8).



Figura 7 – Pontos de coleta de água na bacia hidrográfica do RSB. A = ribeirão São Bartolomeu; B = córrego “São Lucas”; C = córrego dos Machados; D =) córrego Santa Catarina; E = córrego Paraíso; F = córrego Palmital; G = córrego “Antuérpia”; e H = córrego do Engenho; Viçosa, MG.

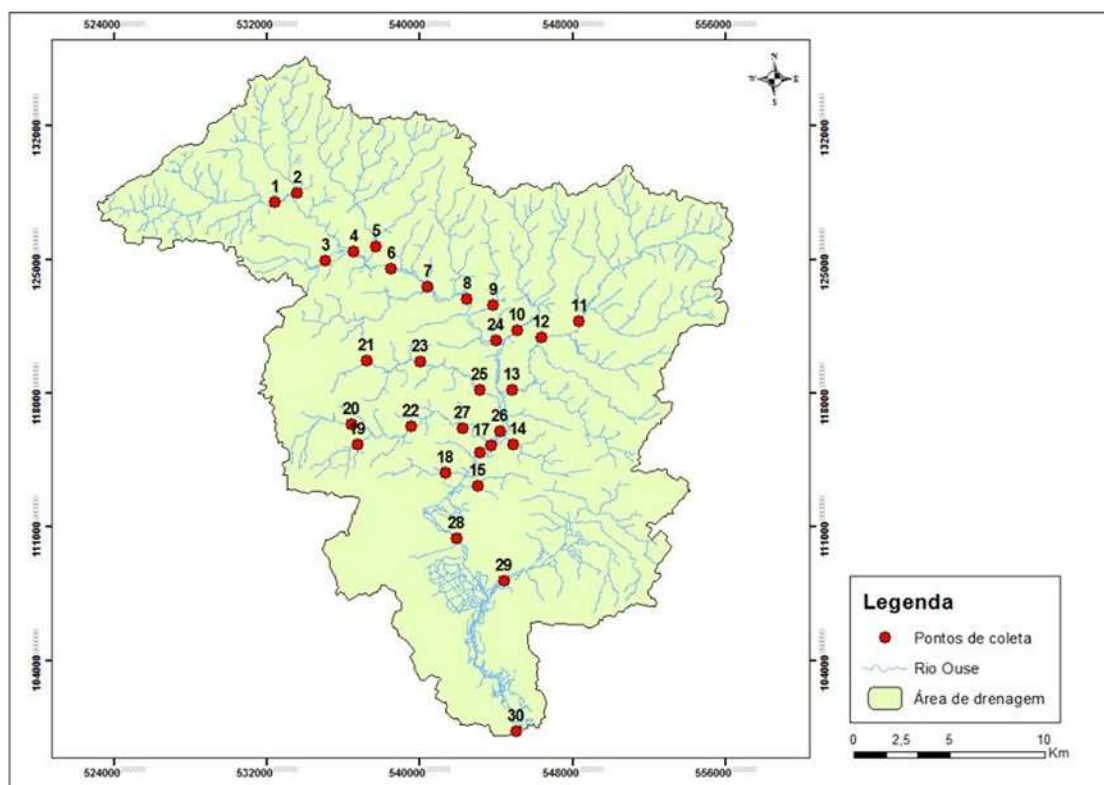


Figura 8 – Localização dos pontos de coleta de água na bacia do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido.

Esses pontos selecionados são continuamente monitorados pela Agência Ambiental Europeia e pela Universidade de Brighton, Unidade de Pesquisa em Meio Ambiente e Saúde Pública (EPHRU).

Para o monitoramento da qualidade da água e detecção e enumeração de bacteriófagos, durante oito meses (de junho 2013 a janeiro de 2014), foram coletadas amostras quinzenalmente; posteriormente, no período de fevereiro a abril de 2014, as amostras foram passaram a ser coletadas mensalmente, principalmente em virtude de limitação de recursos financeiros e ao período de chuvas intensas, com eventos de alagamento de várias áreas da bacia, o que dificultava o acesso aos pontos de amostragem.

Para detecção de protozoários, devido ao custo elevado das análises, somente nove pontos foram monitorados (*Upper Ryelands Bridge, Scaynes Hill, Pellinford Brook, River Uck, Barcombe Mills, Bevern Stream, Longford Stream, Glynde Reach e Newhaven*), no período de agosto de 2013 a janeiro de 2014.

4.3. Análises microbiológicas

4.3.1. Detecção e quantificação de bacteriófagos

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes cepas de bactérias hospedeiras:

- **Grupo 1:** cepas fornecidas pela Universidade de Brighton, UK:
 - Cepa para análise de colifagos somáticos: WG-5.
 - Cepa para análise de bacteriófagos infectando *B. fragilis*: GB-124, HB-73 e S-10.
 - Cepa para análise de colifagos F-específicos: WG-49.
- **Grupo 2:** cepas fornecidas pela CETESB, SP:
 - Cepa para análise de colifagos somáticos: *E. coli* CN-13 (bactéria hospedeira de colifagos somáticos, resistente ao ácido nalidíxico) (ATCC 700609); Fago phi- X174 (13706-B1).
 - Cepa para análise de colifagos F-específico - *E. coli* FAmP (*E. coli* com resistência ao antibiótico ampicilina e com plasmídeo codificador da formação de “pili”) (ATCC 700891) – Fago MS2 (ATCC 15597-B1).

As análises de detecção e enumeração de bacteriófagos foram realizadas utilizando duas metodologias, descritas a seguir:

- Método de plaqueamento em camada simples de ágar (SCA), para o qual foram utilizadas as cepas hospedeiras do grupo 2, de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Wastewater* (APHA, 2005).

Inicialmente, as bactérias mantidas em estoque sólido no laboratório eram inoculadas em 10 mL de meio de cultura líquido (TSB – *Tryptone Soy Broth*, Merck) e incubadas a 37 °C por 18-24 horas para reativação. Essas bactérias constituíram o pré-inóculo, que era preparado um dia antes de ser realizado o procedimento para quantificação dos colifagos.

No dia da análise, 1 mL do pré-inóculo era adicionado em 10 mL de meio líquido de cultura em tubo com tampa de rosca de 12 mL, que por sua vez era incubado por 4 horas ou até se obter densidade óptica de 0,33 a 520 nm. As leituras de densidade óptica foram realizadas em espectrofotômetro previamente calibrado com caldo TSB estéril.

O método, em si, consiste na adição de 100 mL da amostra acrescida de 0,5 mL de cloreto de magnésio (4M), previamente homogeneizada, em erlenmeyer com 100 mL de TSA 2x (*Tryptone Soy Agar* – dobro da quantidade especificada pelo fabricante), estabilizado em banho-maria a 45-48 °C. O cloreto de magnésio mantém a estabilidade do bacteriófago e facilita sua adsorção à bactéria hospedeira. Em seguida, foram adicionados 5 mL da suspensão de bactéria hospedeira em fase exponencial de crescimento e 2 mL de antibiótico (ácido nalidíxico para CN-13 e ampicilina/estrep-tomicina para FAmP) ao erlenmeyer contendo a mistura (TSA 2X + amostra), que foi, então, homogeneizada e mantida em banho-maria. O conteúdo dessa mistura foi dispensado em dez placas de Petri descartáveis, previamente identificadas. Após a solidificação das placas, estas foram invertidas e incubadas por 18-24 horas a $36 \pm 0,5$ °C. Efetuou-se a contagem de todas as placas de lise formadas no ágar, com o auxílio de um contador de colônias.

A densidade de colifagos somáticos determinada por meio da técnica de plaqueamento em camada simples de ágar é expressa como Unidades Formadoras de Placa por 100 mL (UFP/100 mL). O número de colifagos foi obtido pela somatória da contagem das placas de lise nas dez placas de Petri utilizadas.

Todos os componentes foram aquecidos antes do ensaio para evitar solidificação no momento de vertê-los nas placas. Esses processos são críticos, portanto a temperatura foi monitorada cuidadosamente para que os colifagos não fossem inativados, garantindo que o ágar não se solidificasse prematuramente. Além das placas para cada amostra, também era preparada uma placa de controle negativo (amostra livre de colifagos e outros contaminantes).

- Método quantitativo de plaqueamento em camada dupla, descrito pelo ‘Padrão Britânico’ *British Standard* (BS, 2001a; BS, 2001b, BS, 2001c), usado para as cepas hospedeiras do grupo 1. O esquema do procedimento do método encontra-se na Figura 9.

As amostras (1 mL) eram filtradas utilizando seringa e filtro de 0,22 µm, visando à remoção de bactérias que pudessem estar presentes, uma vez que somente os vírus passam pelo filtro. Em tubos com tampas de rosca contendo o meio ágar semissólido de nutrientes juntamente com os aditivos, eram adicionados a amostra filtrada e 1 mL da cepa da bactéria hospedeira em fase log de crescimento (absorbância de 0,30-0,33 a



Figura 9 – Esquema representativo da técnica de ágar de camada dupla descrita pelo ‘Padrão Britânico’ *British Standard* (BS, 2001a; BS, 2001b, BS, 2001c) para detecção e enumeração de bacteriófagos que infectam *Bacteroides fragilis*.

620 nm, correspondente à contagem de células de aproximadamente 2×10^8 UFP/mL). A mistura era agitada em vortex, evitando a formação de bolhas de ar. Todo o conteúdo do tubo era transferido para placas de Petri descartáveis contendo o meio ágar sólido, também evitando a formação de bolhas.

Para análise de colifagos somáticos (WG-5) e F-específicos (WG-49), as placas eram invertidas após repouso para que o conjunto ágar/amostra se estabelecesse (15-25 minutos), sendo em seguida incubadas a 36 ± 1 °C por 18-24 horas. Após o período de incubação efetuava-se a contagem de todas as placas de lise formadas no ágar com auxílio de um contador de colônias.

O mesmo procedimento foi seguido para a análise de fagos que infectam *B. fragilis* (GB-124, HB-73 e S-10), entretanto as placas foram incubadas em jarros anaeróbicos com sachê Anaerogen® a 36 ± 1 °C por 18-24 horas. A quantidade de fagos na amostra foi expressa por unidades formadoras de placas (UFP/100 mL). Além das placas para cada amostra, também foram preparadas placas para controle negativo e positivo.

4.3.2. Detecção, enumeração e genotipagem de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

A técnica utilizada foi baseada em quatro etapas: a) concentração da amostra por filtração em membranas para recuperar o baixo número de oocistos tipicamente encontrados no ambiente; b) separação imunomagnética para separar os oocistos dos resíduos que possam interferir na fase de detecção; c) detecção dos oocistos pela utilização de anticorpos monoclonais, com o uso da microscopia de imunofluorescência, e d) análise molecular, apenas das amostras positivas por microscopia de imunofluo-

rescência, para oocistos de *Cryptosporidium* para diferenciação das espécies. Essas etapas estão descritas a seguir.

a) Concentração das amostras

As amostras foram concentradas pela técnica de membrana filtrante (MF) descrita por Franco *et al.* (2001). A técnica consiste na filtração de 2 L da amostra de água em membranas de acetato de celulose (47 mm de diâmetro e porosidade nominal de 1,2 µm). Após a filtração, as membranas eram cuidadosamente retiradas e colocadas em placas de Petri estéreis, para realizar a etapa de recuperação dos oocistos eventualmente presentes nas amostras. Para tanto, a superfície das membranas era raspada por 20 minutos com alça plástica macia e, então, lavadas manualmente com água ultrapura (MilliQ®). O líquido resultante era centrifugado por 15 min (2.400 rpm), o sobrenadante era em seguida descartado e o sedimento lavado e centrifugado novamente até a obtenção de volume final não superior a 10 mL.

b) Separação Imunomagnética – Sistema Dynal/Biobeads

Após a concentração, a etapa de purificação das amostras foi realizada por meio da técnica de separação imunomagnética (IMS), utilizando o kit comercial Dynabeads® GC-Combo. Esse procedimento é importante para retirada de substâncias que induzem a exames falso-positivos quando se utiliza imunofluorescência direta, bem como para retirada de inibidores da amplificação de PCR.

Essa etapa compreendeu a adição de um conjugado (esferas metálicas - anticorpos anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia*) à amostra que se liga aos antígenos de (oo)cistos. O complexo (oo)cistos-conjugado é arrastado e separado por meio de campo magnético do material particulado restante, que era descartado. Esse complexo era então submetido à dissociação térmica (80 °C/10 min), liberando os (oo)cistos para análise. Na etapa final, para posterior extração do DNA genômico, esse sedimento era armazenado a -20 °C em tubos tipo Eppendorf® de 2,0 mL contendo 300 µL de água ultrapura estéril (MilliQ®).

c) Leitura microscópica

Após a separação imunomagnética, alíquotas de 100 µL da amostra, eram levadas para leitura em microscópio de imunofluorescência direta com a utilização do kit MERIFLUOR® C/G (MeridianDiagnostics, Inc.), de acordo com recomendações do fabricante.

O cálculo do número de oocistos.L⁻¹ (Y) em cada amostra foi feito com a Equação 1.

$$Y = (A \times 10^6 / B) \times (C/D) \quad (1)$$

em que

A = número de oocistos visualizados no poço da lâmina;

B = alíquota do sedimento (µL) colocado no poço da lâmina de fluorescência;

C = volume do sedimento (mL) obtido; e

D = volume da amostra (mL).

d) Análise molecular (extração de DNA, *Nested-PCR* – amplificação do DNA, eletroforese em gel de agarose, purificação do produto da PCR e sequenciamento)

As etapas da análise molecular foram as seguintes:

• Extração de DNA

Nessa etapa, inicialmente foram testados ciclos de congelamento com nitrogênio líquido e descongelamento com banho seco a 80 °C, com variação do número de ciclos entre oito e 15 ciclos, como sugerido em literatura; posteriormente, para aumentar a eficiência da extração de DNA, foram realizados ciclos de congelamento com nitrogênio líquido e descongelamento sob forte agitação em *Tissuelyser* (Invitrogen).

A concentração de DNA nas amostras foi mensurada por fluorimetria com o uso do Qubit (Fluorometer Qubit® 2.0. Invitrogen). Esse equipamento permite a quantificação de DNA, RNA e proteínas utilizando corantes fluorescentes. Esses corantes são específicos para cada tipo de biomolécula mesmo em baixas concentrações, o que confere alta especificidade e sensibilidade a essa metodologia. Para quantificação do

DNA foi utilizado o kit Qubit® dsDNA HS. Para verificar qual o melhor procedimento a ser adotado, foram também realizados *Nested-PCR* e a visualização em gel de agarose.

Após a quantificação do DNA extraído e a visualização do gel, padronizou-se o seguinte protocolo de extração do DNA das amostras com a utilização do kit comercial QIAmp DNA Stool Mini kit (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações: i) para a ruptura da parede dos oocistos eram adicionados 200 µL de solução-tampão de lise presente no kit a 200 µL de amostra (após a etapa de separação imunomagnética), juntamente com uma *bead* metálica; ii) a mistura era congelada em nitrogênio líquido a -196 °C e colocada no TissueLyser (Invitrogen), com velocidade de agitação de 50 Hertz por 5 min.; esse processo era repetido por três vezes; e (iii) em seguida eram adicionados 20 µL de proteinase K e a mistura era incubada em banho-maria a 65 °C, por 30 min.. As demais etapas foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante do kit.

- **Amplificação do DNA pela reação em cadeia pela polimerase dupla - Nested PCR**

Para detecção molecular da presença de *Cryptosporidium* spp. nas amostras ambientais, foram realizadas amplificações do gene da região 18S RNAr comum a todas as espécies, utilizando os oligonucleotídeos descritos por Xiao *et al.* (1999; 2000). Na primeira reação de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos externos, o direto (5'-TTCTAGTAATACATGCG-3') e o reverso (5'- CCTAATCCTTCGAAACAGGA-3'), amplificando um fragmento de aproximadamente 1.325 pares de bases.

A reação foi realizada em volume final de 50 µL, contendo: 30 µL de DNA (5 ng/µL), 5 µL de tampão 10X sem MgCl₂ (Phoneutria), 2,5 µL de BSA (10 mg/mL), 4 µL de dNTPs (solução-estoque de 2,5 mM de cada um), 1,0 µM de cada oligonucleotídeo (solução estoque 10 µM de cada um) e 0,5 µL HotStarTaq polimerase (5 U/µL). A reação foi conduzida em termociclador (*Veriti/96 well – Applied Biosystems*) e as condições de tempo e temperatura submetidas foram: um ciclo para desnaturação inicial a 94 °C, por 3 minutos; 35 ciclos compostos de desnaturação a 94°C, por 45 segundos; emparelhamento a 55 °C, por 45 segundos; extensão a 72 °C, por 1 minuto, e um ciclo para extensão final a 72 °C por 7 minutos e 4 °C por tempo indeterminado, até serem retiradas do termociclador.

Para a segunda reação da PCR foram utilizados os oligonucleotídeos direto SSU 1(5'-GAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3') e reverso SS (5'-AGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'), amplificando um fragmento de aproximadamente 819 a 825 pares de bases. Para a reação foram utilizados 5 µL do produto da primeira reação, 5 µL de tampão 10X sem MgCl₂ (Phoneutria), 2,5 µL de BSA (10 mg/mL), 4 µL de dNTPs (solução estoque de 2,5 mM de cada um), 1,0 µM de cada oligonucleotídeo (solução estoque 10 µM de cada um) e 0,5 µL HotStarTaq polimerase (5 U/µL). O volume final da reação foi de 50 µL. As condições para a amplificação foram idênticas às da primeira PCR. Após este período os produtos foram armazenados a -20°C.

Como controle-positivo foram utilizados oocistos de *Cryptosporidium parvum* fornecidos pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro, com a colaboração da Prof^ª Dr^ª Marcia Benedita de Oliveira Silva. Esses oocistos foram obtidos de fezes de bezerros neonatos infectados experimentalmente por via oral e purificados de acordo com os protocolos descritos por Ortega-Mora *et al.* (1992), com modificações, segundo Silva (2010), estocados em PBST com antibióticos (500 UI/mL de penicilina e 0,024 mg/mL de estreptomicina), quantificados e mantidos em geladeira.

- **Eletroforese em gel de agarose**

Após a obtenção dos produtos da PCR, foi realizada a eletroforese das amostras em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). A eletroforese era realizada com 10 µL do produto amplificado, adicionados a 5 µL tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol) e conduzida em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,30; o marcador utilizado foi o Ladder (1 kb – Invitrogen). O tempo de eletroforese era de aproximadamente 40 min, aplicando voltagem de 65 V. Após o tempo de migração, o gel era retirado da cuba (MinisubCell GT – Bio-Rad) e submetido ao transiluminador UV (DyNA Light Dual Intensity UV – LabNet – National Labnet Company), para visualização do DNA. Em seguida, era documentado em foto documentador (Canon filtros UV e Colorido – Lab Tarde). Os fragmentos de aproximadamente 800 pb eram excisados do gel e purificados usando o kit GeneJet Gel Extraction (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante, e encaminhados para sequenciamento.

- **Sequenciamento e análise filogenética do gene 18S RNAr**

As amostras foram sequenciadas usando os primers direto e reverso da segunda reação da Nested-PCR. O procedimento foi realizado no Centro de Genômica da Universidade Católica de Brasília. Para reação de sequenciamento foram utilizados 2 µL do produto da segunda reação de PCR (15 ng/µL), 2 µL do primer (1,5 µM) e 3 µL de água ultrapura. O sequenciamento utilizado foi o automático, com base no método descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977). Uma placa de 96 poços foi sequenciada, utilizando dideoxynucleotídeos com fluorescência, eletroforese capilar para separação e excitação com laser, para detecção do fluoróforo em sequenciador automático 3130XL *Genetic Analyser da Applied Biosystems* – HITACHI.

As sequências obtidas foram, inicialmente, alinhadas manualmente com o auxílio do *software* BioEdit (*Biological Sequence Alignment Editor*) e, posteriormente, submetidas ao sistema BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*), para comparação com sequências homólogas disponíveis de *Cryptosporidium* no banco de dados GenBank.²

O alinhamento das sequências foi feito com o programa Clustal X e as análises evolutivas filogenéticas e moleculares foram realizadas utilizando o programa MEGA versão 6 (TAMURA *et al.*, 2013). A análise estatística foi feita pelo teste *Neighbor-Joining*, com simulação de 1.000 *bootstrap* e *cut-off* de 70 %.

4.4. Análise de organismos indicadores de contaminação fecal

A quantificação de coliformes totais, *E. coli* e enterococos nas amostras coletadas na bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu foi realizada com a técnica do substrato definido (cromogênico-fluorogênico) utilizando os seguintes meios: Colilert® (Quanti-tray®, Idexx Laboratories Inc, US) para coliformes totais e *E. coli* e Chromocult® Enterococci Broth (Merck® KGaA, Darmstadt, Germany) para enterococos (APHA, 2005). Os resultados foram expressos como Número Mais Provável/100 ml (NMP/100 mL). Na bacia do rio Ouse as amostras foram analisadas segundo a técnica de membrana filtrante, utilizando os meios: *m*-FC agar (Difco, BDMS, Reino Unido) para coliformes e *m*-Enterococcus agar (Difco, BDMS, Reino Unido) para enterococos,

² Disponível em: <<http://www.ncbi-nml.nih.gov/genbank/>>.

conforme descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* - Seções 9221-B e 9221-E (FEDERATION; AMERICAN... – APHA, 2005).

4.5. Análises físicas e químicas

As variáveis físicas e químicas da qualidade da água analisadas foram: turbidez, oxigênio dissolvido, salinidade, potencial redox, temperatura, pH, condutividade elétrica e demanda química de oxigênio, de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (FEDERATION; AMERICAN... – APHA, 2005).

4.6. Análise dos dados

Para delimitar as sub-bacias foi utilizado o Modelo Digital de Elevação (MDE) da missão de mapeamento do relevo terrestre ASTER (*Advanced Spaceborne Thermal Emission and Reflection Radiometer*), com resolução espacial com 30 x 30 m por pixel e coordenadas geográficas em WGS84. Os pontos de coleta de água foram georreferenciados por meio de GPS (*Global Position System*), realizados em estudos anteriores (DIAS, 2007; EBDON; TAYLOR, 2006).

Os resultados da pesquisa de detecção e quantificação de bacteriófagos no período de junho de 2012 a maio de 2014 foram, inicialmente, sistematizados utilizando técnicas da estatística descritiva (cálculo de medidas de posição e dispersão: primeiro e terceiro quartis, valores máximos e mínimos, média, desvio-padrão, coeficiente de variação, média geométrica).

Para verificar se os dados seguiam distribuição normal e se apresentavam homogeneidade de variância, foram aplicados os testes de normalidade de Kolmogorov e Smirnov e de homocedasticidade de Bartlett. Como as suposições não foram válidas optou-se por utilizar testes não paramétricos.

O teste de Kruskal-Wallis foi então utilizado para comparação de três ou mais amostras independentes, testando a hipótese nula de que todas as populações apresentavam funções de distribuição iguais, contra a hipótese alternativa de que pelo menos duas das populações apresentavam funções de distribuição diferentes.

Procurou-se verificar a associação entre variáveis por meio de testes de correlação de Spearman. A escolha desse teste não paramétrico se deu pelo fato de poder ser aplicado em banco de dados relativamente limitados e independentemente da distribuição dos dados. O coeficiente varia entre -1 e 1, sendo que quanto mais próximo estiver destes extremos, maior será a associação entre as variáveis. O sinal negativo da correlação significa que as variáveis variam em sentido contrário, isto é, as categorias mais elevadas de uma variável estão associadas a categorias mais baixas da outra variável. Dancey e Reidy (2006), apontam a seguinte classificação para a força de associação entre duas variáveis: $r = 0,10$ até $0,39$ (fraca); $r = 0,40$ até $0,69$ (moderada); $r = 0,70$ até 1 (forte); logo quanto mais perto de 1 (independente do sinal) for o coeficiente de correlação, maior é o grau de dependência estatística.

As análises estatísticas foram conduzidas com a utilização dos programas *Statistical Package for the Social Sciences, version 17.0* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e Minitab, versão 17. Os resultados foram interpretados tomando como referência 5% de nível de significância quando foi analisada a área total da bacia e 10% de nível de significância quando foi analisado cada ponto de amostragem separadamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo 1 – Rastreamento de fontes de contaminação na bacia de captação do ribeirão São Bartolomeu - Viçosa, MG

A bacia de captação do ribeirão São Bartolomeu configura-se como um sistema problemático em todos os seus componentes: manancial desprotegido, com pressões de ocupação urbana e de atividades agropecuárias relativamente intensas, usos conflitantes de água na bacia de captação, balanço crítico entre disponibilidade e demanda de água nos períodos de estiagem, ausência histórica de políticas de proteção das nascentes e de disciplina de uso do solo e da água, deterioração da qualidade da água e limitações de infraestrutura de saneamento básico.

Apesar da importância da bacia e do desenvolvimento de diversos estudos contemplando as fragilidades e o monitoramento da qualidade da água na bacia do ribeirão São Bartolomeu (por exemplo, DIAS, 2007; SILVA, 2010; BEZERRA, 2011), pouco se sabe sobre a origem das fontes de contaminação fecal, se provenientes de excretas humanas ou de animais. Sendo assim, buscou-se realizar, por meio deste trabalho, o rastreamento das fontes de contaminação fecal na bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu, para verificar qual a participação das explorações animais e das populações humanas, utilizando como ferramentas a detecção e quantificação de bacteriófagos e a genotipagem de oocistos de *Cryptosporidium* spp. Os resultados estão apresentados a seguir.

5.1.1. Quantificação de bacteriófagos e de bactérias indicadoras de contaminação fecal (BICF) na bacia do ribeirão São Bartolomeu

O monitoramento da qualidade da água, incluindo a detecção e enumeração de bacteriófagos foram realizados no período de julho de 2012 a maio de 2014. O número de amostras analisadas por ponto amostrado variou entre 17 e 19, devido a problemas de contaminação durante o procedimento de análise.

Inicialmente, estava prevista a utilização das cepas de bactérias hospedeiras fornecidas pela CETESB e das cepas fornecidas pela Universidade de Brighton, Reino Unido. Entretanto, diversas dificuldades foram enfrentadas com as cepas fornecidas pela Universidade de Brighton ao longo de várias as tentativas realizadas no período de outubro de 2013 a fevereiro de 2014. As primeiras dificuldades se deram com o envio do material por correio. Nas duas tentativas, o prazo de entrega foi de aproximadamente 40 dias e o material entregue encontrava-se totalmente contaminado devido ao derramamento dos meios líquidos contendo as bactérias hospedeiras. A partir daí novas remessas foram feitas por meio de pessoas vindas da Inglaterra para Viçosa.

Eliminado os problemas relacionados ao envio das cepas hospedeiras, diversos eventos de coleta e análise das amostras para cada sub-bacia foram realizados. Durante os procedimentos de análise das amostras, em alguns casos não ocorreu crescimento das bactérias hospedeiras em meio líquido específico, não atingindo a densidade ótica recomendada na metodologia (0,30-0,33 a 620 nm, que corresponde a uma contagem de células de aproximadamente $2,0 \times 10^8$ UFP/mL), impossibilitando a continuidade da análise.

Em outros eventos, não ocorreu detecção de fagos, uma vez que as placas de lise estiveram ausentes no final do procedimento, mesmo em amostras de controle positivo, onde o fago foi adicionado às amostras. Além disso, em quase todas as tentativas foram verificados problemas de contaminação durante o procedimento.

Também foram realizadas análises utilizando as cepas hospedeiras (GB-124, HB-73, S-10, WG-5 e WG-49) em amostras de esgoto bruto coletado em três estações de tratamento de esgoto (ETEs Romão dos Reis, Barrinha e Violeira), além de efluentes de suinocultura e bovinocultura (efluentes concentrados). Esperava-se que nessas amostras

a presença de fagos seria detectada, mas novamente os resultados encontrados foram negativos, com ausência de placas de lise.

Dificuldades semelhantes, como o não crescimento das cepas hospedeiras e a ausência de placas de lise na análise de amostras de esgoto sanitário e de efluentes de bovinocultura e suinocultura, foram enfrentadas por Glenister (2011) ao avaliar a possibilidade de utilização das cepas de *B. fragilis* (GB-124, HB-73 e S-10) para detecção de fagos na bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu.

As dificuldades nas análises de detecção de fagos nas amostras da bacia do RSB podem estar relacionadas com o fato de as cepas hospedeiras serem provenientes de isolamentos realizados em região geográfica distante (Reino Unido), e de fontes fecais distintas daquelas encontradas na área da bacia do RSB. Essa limitação geográfica na habilidade de determinada cepa hospedar fagos de fontes fecais distintas foi observada e analisada por Payan *et al.* (2005). Esses pesquisadores identificaram grande potencial no uso de fagos que infectam bacteroides na detecção de fontes de contaminação fecal, porém afirmaram que a sensibilidade do método está associada à cepa hospedeira isolada, sendo necessário realizar isolamento de diferentes cepas, em diferentes regiões geográficas. Essa diferença tem sido atribuída à especificidade na composição da microbiota fecal humana e animal em diferentes regiões (EBDON; MUNIE; TAYLOR, 2007). Diante disso, diversos pesquisadores têm investido esforços no isolamento de bacteroides, para que possam ser utilizados com sucesso no rastreamento de fontes de contaminação fecal em regiões geográficas específicas (PAYAN *et al.*, 2005; GÓMEZ-DOÑATE *et al.*, 2011; PURNELL, 2012).

Considerando todas as dificuldades enfrentadas, optou-se por trabalhar somente com as bactérias hospedeiras fornecidas pela CETESB. Entretanto, por essas cepas não serem hospedeiro-específicas, os resultados permitiram apenas discutir a presença de contaminação fecal nos corpos hídricos analisados, não sendo possível distinguir fontes animais e humanas.

Nas Tabelas 2 e 3 está apresentada a estatística descritiva dos resultados de quantificação de colifagos CN-13 e FAm, respectivamente, nas amostras de água coletadas em cada ponto da bacia do RSB selecionado para o estudo. Ambos os bacteriófagos foram detectados durante o período de estudo com expressiva variabilidade, demonstrada pelo alto coeficiente de variação. As contagens médias de

Tabela 2 – Estatística descritiva dos resultados de colifagos somáticos (CN-13) em amostras de água da bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, julho de 2012 a maio de 2014

Sub-Bacia	N ⁽¹⁾	Colifagos Somáticos (CN-13) (UFP/100mL)					
		Min ⁽²⁾	25%	Média	75%	Max ⁽³⁾	DP ⁽⁴⁾
SB1 - Ribeirão São Bartolomeu	17	ND	ND	75,10	103,50	395,00	118,50
SB2 - córrego “São Lucas”	19	ND	ND	5,42	4,00	49,00	11,72
SB3 - córrego dos Machados	19	ND	ND	5,53	7,00	46,00	11,13
SB4 - córrego Santa Catarina	17	ND	ND	2,47	3,50	14,00	4,78
SB5 - córrego Paraíso	18	ND	ND	2,83	1,00	39,00	9,15
SB6 - córrego Palmital	19	ND	ND	3,05	1,00	41,00	9,41
SB7 - córrego “Antuérpia”	19	ND	ND	18,30	10,00	210,00	48,30
SB8 - Córrego do Engenho	17	ND	ND	55,50	131,50	250,00	88,80

Notas: ⁽¹⁾ número de amostras; ⁽²⁾ valor mínimo; ⁽³⁾ valor máximo; ⁽⁴⁾ desvio-padrão; e ND: não detectado.

Tabela 3 – Estatística descritiva dos resultados de colifagos F-RNA (Famp) em amostras de água da bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, julho de 2012 a maio de 2014

Sub-Bacia	N ⁽¹⁾	Colifagos F-RNA (Famp) (UFP/100mL)					
		Min ⁽²⁾	25%	Média	75%	Max ⁽³⁾	DP ⁽⁴⁾
SB1 - Ribeirão São Bartolomeu	19	ND	ND	10,32	8,00	102,00	25,35
SB2 - córrego “São Lucas”	19	ND	ND	1,00	1,00	8,00	2,49
SB3 - córrego dos Machados	18	ND	ND	1,06	0,25	11,00	2,73
SB4 - córrego Santa Catarina	18	ND	ND	0,06	0,00	1,00	0,24
SB5 - córrego Paraíso	19	ND	ND	2,00	4,00	11,00	3,22
SB6 - córrego Palmital	19	ND	ND	4,19	3,00	35,00	9,45
SB7 - córrego “Antuérpia”	18	ND	ND	3,56	1,00	50,00	11,79
SB8 - Córrego do Engenho	18	ND	ND	2,28	ND	35,00	8,29

Notas: ⁽¹⁾ número de amostras; ⁽²⁾ valor mínimo; ⁽³⁾ valor máximo; e ⁽⁴⁾ desvio-padrão; ND: não detectado.

CN-13 oscilaram entre 2,47 e 75,1 UFP/100 mL e as de Famp entre 0,06 e 10,32 UFP/100 mL.

Ao longo de todo o período de monitoramento, a sub-bacia córrego do Engenho destacou-se por apresentar a maior contagem média de colifagos somáticos (CN-13) (55,5 UFP/100 mL) e a maior variabilidade dos resultados (DP = 88,8 UFP/100 mL).

Na sub-bacia córrego Antuérpia registrou-se a segunda maior média de colifagos somáticos (18,3 UFP/100 mL e DP = 48,3 UFP/100 mL). A sub-bacia córrego Santa Catarina apresentou a menor concentração média de colifagos somáticos (3,5 UFP/100 mL) e também a menor variabilidade dos resultados (DP = 14,0 NMP/100 mL).

Em relação aos colifagos F-RNA (Famp), todos os pontos monitorados apresentaram concentrações menores que as dos colifagos somáticos. As maiores concentrações médias foram observadas nas sub-bacias córrego Palmital (4,19

UFP/100 mL) e córrego Antuérpia (3,56 UFP/100 mL). Nos pontos de coleta nas sub-bacias córrego dos Machados e córrego São Lucas foram verificadas as menores concentrações de colifagos F-RNA (Famp), sendo as contagens de 1,0 e 1,06 UFP/100 mL, respectivamente.

O teste estatístico Kruskal-Wallis para análise de diferença de médias entre as concentrações de colifagos não apontou diferença significativa na ocorrência tanto de CN-13 quanto de Famp entre quaisquer sub-bacias. Entretanto, algumas características das sub-bacias, destacadas a seguir, podem auxiliar o entendimento da ocorrência diferenciada dos colifagos, mesmo que não estatisticamente significativa.

Na Figura 10 estão apresentadas as concentrações médias (log 10) de coliformes totais, *E. coli*, enterococos e de colifagos CN-13 e Famp nos pontos de coleta da bacia do ribeirão São Bartolomeu, em todo o período analisado. As concentrações médias de coliformes totais, *E. coli* e enterococos foram bem mais elevadas que as dos colifagos. A julgar pelos valores de *E. coli* e enterococos, as sub-bacias córrego dos Machados (SB3), córrego Santa Catarina (SB4) e o ponto de captação apresentaram, de modo geral, o menor grau de contaminação; por outro lado, o córrego Palmital (SB6) e o córrego do Engenho (SB8) foram as sub-bacias que apresentaram o maior grau de contaminação. Cabe lembrar que o ponto de captação se dá na segunda de duas represas em série, o que certamente acentua o decaimento microbiano no ambiente aquático.

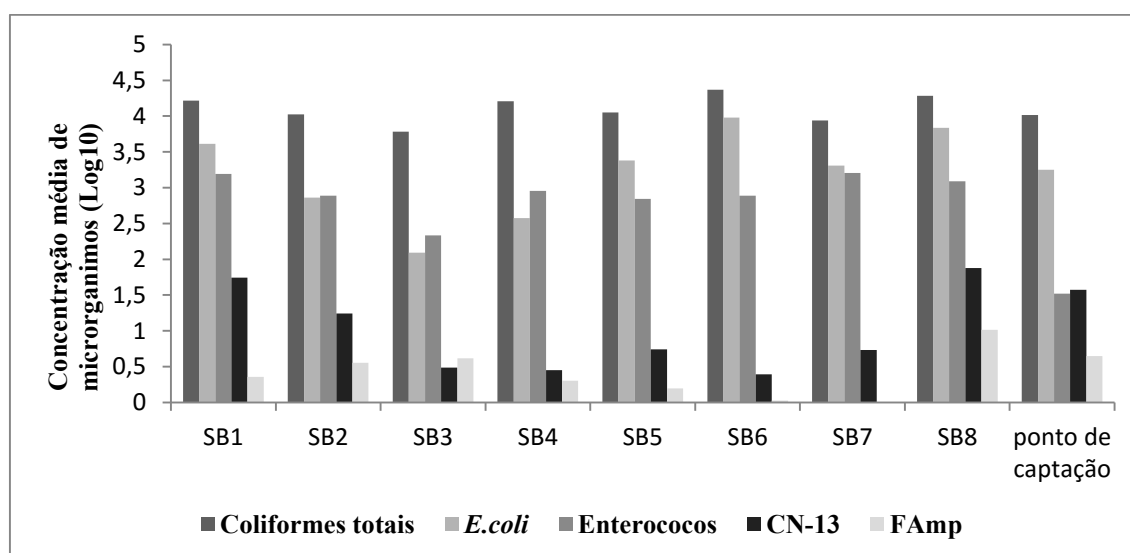


Figura 10 – Concentração média (log 10) de coliformes totais, *E. coli*, enterococos, colifagos somáticos (CN 13) e colifagos F-RNA (Famp) nos pontos de coleta na bacia do ribeirão São Bartolomeu, Viçosa, MG.

5.1.2. Correlação entre colifagos, bactérias indicadoras de contaminação fecal (BICF) e as variáveis físicas e químicas de qualidade da água - análise dos dados na bacia do RSB como um todo

Inicialmente buscou-se verificar se os colifagos (somáticos e F-RNA) são bons indicadores de contaminação microbiológica em águas superficiais. Para tal, foram realizados estudos de correlação entre esses fagos e os organismos tradicionalmente utilizados como indicadores fecais, isto é, as bactérias do grupo coliformes e os enterococos.

Os testes de correlação não revelaram associações fortes e, ou, estatisticamente significantes entre a ocorrência dos colifagos e a dos demais organismos indicadores investigados (coliformes totais, *E. coli* e enterococos) (Tabela 4). Os baixos coeficientes de correlação obtidos apontam para a independência em relação ao comportamento dos microrganismos indicadores e dos colifagos analisados nos pontos de coleta de água na bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Correlação estatisticamente significativa somente foi verificada entre coliformes totais e *E. coli*.

Tabela 4 – Matriz de correlação – coeficiente de correlação de Spearman (rs) e valores de p (entre parênteses) – entre colifagos somáticos (CN-13), colifagos F-RNA (Famp) e coliformes totais, *E. coli* e enterococos na bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, julho de 2012 a maio de 2014

Variáveis	Colifagos Somáticos (CN-13)	Colifagos F_RNA (Famp)	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>	Enterococos
Colifagos somáticos (CN-13)	NA	0,588 (0,473)	-0,099 (0,254)	0,072 (0,408)	-0,111 (0,387)
Colifagos F_RNA (Famp)	0,588 (0,473)	NA	-0,010 (0,912)	0,009 (0,919)	-0,072 (0,576)
Coliformes totais	-0,099 (0,254)	-0,010 (0,912)	NA	0,640 (0,001)	-0,420 (0,744)
<i>E. coli</i>	0,072 (0,408)	0,009 (0,919)	0,640 (0,001)	NA	0,056 (0,660)
Enterococos	-0,111 (0,387)	-0,072 (0,576)	-0,420 (0,744)	0,056 (0,660)	NA

Células destacadas em cinza indicam correlação estatisticamente significativa ($\alpha \leq 0,05$).

NA = não se aplica pelo fato de a associação entre variáveis não fazer sentido.

Conforme citado na revisão de literatura, Payment e Locas (2011), estudando águas subterrâneas do Canadá, relataram que nas amostras com presença de *E. coli* e enterococos a ocorrência de colifagos somáticos e F-RNA apareceu em menor

frequência e em menor número do que as bactérias indicadoras. Os autores ainda argumentam que, uma vez que as bactérias encontradas indicam claramente a ocorrência de contaminação fecal das águas subterrâneas, os colifagos não se mostraram bons indicadores para detecção de presença ou ausência de vírus humanos.

No entanto, o emprego desses fagos não deve ser de todo descartado, pois estudos têm indicado que a probabilidade de multiplicação de colifagos somáticos e F-específicos no ambiente contaminado é extremamente baixa ou nula, ou seja, a sua ocorrência pode, em geral, estar relacionada a presença de contaminação fecal (MUNIESA; JOFRE, 2004; JOFRE, 2009; USEPA, 2015). Levando-se em conta as elevadas concentrações de bactérias indicadoras como primeiro indício de contaminação fecal, a detecção de colifagos em todas as sub-bacias reforça essa possibilidade. (JOFRE, 2009).

Alguns autores têm discutido a ausência de correlação entre colifagos e bactérias indicadoras de contaminação fecal. De acordo com Tavares *et al.* (2005), não é esperado mesmo que haja correlação significativa e relação proporcional quantitativa entre colifagos e organismos indicadores tradicionais, como as bactérias do grupo coliformes e enterococos e citam que as razões mais importantes da falta de correlação clara entre o número de coliformes e o de colifagos estão associadas às diferenças na sobrevivência e multiplicação de fagos e bactérias em diferentes ambientes aquáticos.

Muniesa *et al.* (2012) ressalta que muitos organismos são bons indicadores de contaminação fecal recente, mas é preciso ter cautela na interpretação de resultados quantitativos; ressaltam essa autores que é preciso levar em conta a contribuição, proporcional ou não, de diversas fontes fecais lançadas no ambiente, assim como as particularidades de cada indicador em sua sobrevivência, persistência e resposta a variações ambientais, como radiação solar, salinidade, turbidez e temperatura da água, assim como a processos de desinfecção e inativação natural aos quais possam ser submetidos.

Variáveis físicas e químicas também podem ser utilizadas para auxiliar na interpretação da qualidade da água e de impactos da introdução de cargas poluidoras, eventualmente de origem fecal (contaminação). Entretanto, neste estudo não foram verificadas correlações estatisticamente significativas entre os colifagos e as variáveis físicas e químicas de qualidade da água analisadas (Tabela 5). A única exceção foi o

Tabela 5 – Matriz de correlação – coeficiente de correlação de Spearman (rs) e valores de p (entre parênteses) – entre colifagos somáticos (CN-13), colifagos F-RNA (Famp) e variáveis físicas e químicas de qualidade da água na bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu, Viçosa, MG, julho de 2012 a maio de 2014

Variáveis	Turbidez	pH	Condutividade	OD	DQO
Colifagos somáticos (CN-13)	0,032 (0,694)	-0,051 (0,535)	-0,104 (0,416)	0,100 (0,474)	0,003 (0,984)
Colifagos F_RNA (Famp)	-0,057 (0,484)	0,005 (0,947)	0,128 (0,319)	0,281 (0,040)	-0,248 (0,070)
Turbidez	NA	-0,074 (0,366)	0,170 (0,184)	0,266 (0,052)	-0,037 (0,789)
pH	-0,074 (0,366)	NA	0,065 (0,611)	0,167 (0,228)	-0,068 (0,628)
Condutividade elétrica	0,170 (0,184)	0,065 (0,611)	NA	0,127 (0,359)	-0,083 (0,549)
OD	0,266 (0,052)	0,167 (0,228)	0,127 (0,359)	NA	0,379 (0,003)
DQO	-0,037 (0,789)	-0,068 (0,628)	-0,083 (0,549)	0,379 (0,003)	NA

Células destacadas em cinza indicam correlação estatisticamente significativa ($\alpha \leq 0,05$).

NA = não se aplica pelo fato de a associação entre variáveis não fazer sentido.

oxigênio dissolvido, que se mostrou significativamente correlacionado com a ocorrência de colifagos F-RNA e de DQO, mas essas correlações se mostraram fracas e positivas, o que não faz sentido, considerando a possibilidade dos fagos indicarem ocorrência de poluição fecal.

5.1.3. Potencialidade do uso de colifagos somáticos e F-específicos no rastreamento de fontes de contaminação fecal na bacia do RSB - análise dos dados por sub-bacia.

Os dados do monitoramento da qualidade da água nos sete córregos e no RSB, além dos dados coletados no ponto de captação das ETAs (UFV e SAAE), encontram-se nas Tabelas 6 a 14.

Com relação à turbidez, o córrego Santa Catarina (SB4) e o córrego Paraíso (SB5) foram as sub-bacias que mais se diferenciaram, em média, das demais, apresentando os menores valores, 9,3 e 12 uT, respectivamente. Embora sem se destacarem das demais, por não apresentarem diferenças estatisticamente significantes, o córrego Antuérpia (SB7) e o córrego do Engenho (SB8) apresentaram as maiores médias de turbidez: 16,6 e 20,8 uT, respectivamente.

Tabela 6 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 1, ribeirão São Bartolomeu, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014

Parâmetro	n ⁽¹⁾	Média ⁽²⁾	Valor Máximo	Valor Mínimo	Desvio-Padrão
Turbidez ⁽³⁾	19	17,6	93,3	2,9	22,30
pH	18	6,7	7,3	6,4	0,18
Condutividade elétrica ⁽⁴⁾	8	85,7	152,4	54,4	36,60
Temperatura ⁽⁵⁾	5	21,5	27,4	17,4	4,78
Oxigênio dissolvido ⁽⁶⁾	7	5,7	7,0	3,7	1,49
DQO ⁽⁷⁾	7	26,7	58,6	1,2	18,90
Coliformes totais ⁽⁸⁾	16	2,03×10 ⁴	9,80×10 ⁴	5,3×10 ¹	2,44×10 ⁴
<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	16	9,56×10 ³	2,41×10 ⁴	1,5×10 ¹	9,07×10 ³
Enterococos ⁽⁸⁾	8	1,22×10 ³	1,6×10 ³	7,2×10 ¹	6,96×10 ²
CN-I3 ⁽⁹⁾	17	75,1	395	ND	118,50
<i>Famp</i> ⁽⁹⁾	18	10,3	102	ND	25,53

Notas: ⁽¹⁾ número de amostras; ⁽²⁾ médias aritméticas; ⁽³⁾ uT; ⁽⁴⁾ µs/cm²; ⁽⁵⁾ °C; ⁽⁶⁾ mg/L; ⁽⁷⁾ mg O₂/L; ⁽⁸⁾ NMP/100 mL; e ⁽⁹⁾ UFC/100 mL. ND = não detectado

Tabela 7 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 2, sub-bacia córrego do São Lucas, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014

Parâmetro	n ⁽¹⁾	Média ⁽²⁾	Valor Máximo	Valor Mínimo	Desvio-Padrão
Turbidez ⁽³⁾	19	13,7	68,9	2,3	18,3
pH	18	6,6	7,0	6,3	0,2
Condutividade elétrica ⁽⁴⁾	8	136,9	334,0	46,3	94,8
Temperatura ⁽⁵⁾	5	20,6	25,4	16,9	3,5
Oxigênio dissolvido ⁽⁶⁾	7	5,3	8,0	3,4	1,6
DQO ⁽⁷⁾	7	38,1	90,4	11,2	33,0
Coliformes totais ⁽⁸⁾	16	9,0×10 ³	2,5×10 ⁴	1,8×10 ¹	9,4×10 ³
<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	16	2,0×10 ³	2,4×10 ⁴	1,2×10 ¹	6,0×10 ³
Enterococos ⁽⁸⁾	8	1,6×10 ²	9,2×10 ³	2,2×10 ¹	3,1×10 ³
CN-I3 ⁽⁹⁾	19	5,4	49,0	ND ⁽⁹⁾	11,7
<i>Famp</i> ⁽¹⁰⁾	19	1,0	8,0	ND	2,5

Notas: ⁽¹⁾ número de amostras; ⁽²⁾ médias aritméticas; ⁽³⁾ uT; ⁽⁴⁾ µs/cm²; ⁽⁵⁾ °C; ⁽⁶⁾ mg/L; e ⁽⁷⁾ mg O₂/L; ⁽⁸⁾ NMP/100 mL; e ⁽⁹⁾ Não detectado ⁽¹⁰⁾ UFC/100 mL.

Tabela 8 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 3, sub-bacia córrego dos Machados, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014

Parâmetro	n ⁽¹⁾	Média ⁽²⁾	Valor Máximo	Valor Mínimo	Desvio-Padrão
Turbidez ⁽³⁾	19	10,4	22,6	3,5	5,51
pH	18	6,7	7,3	6,2	0,26
Condutividade elétrica ⁽⁴⁾	8	62,5	140,3	43,0	31,90
Temperatura ⁽⁵⁾	5	20,9	24,3	17,9	2,42
Oxigênio dissolvido ⁽⁶⁾	7	6,1	7,8	4,8	1,07
DQO ⁽⁷⁾	7	21,8	52,7	6,7	17,16
Coliformes totais ⁽⁸⁾	16	2,4×10 ⁴	1,4×10 ⁴	5,5×10 ¹	3,91×10 ⁴
<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	16	1,8×10 ³	9,8×10 ⁴	3,5×10 ¹	2,47×10 ⁴
Enterococos ⁽⁸⁾	8	7,7×10 ²	1,7×10 ³	3,2×10 ¹	7,28×10 ²
<i>CN-I3</i> ⁽⁹⁾	19	2,4	14,0	ND ⁽⁹⁾	4,78
<i>Famp</i> ⁽⁹⁾	18	1,1	11,0	ND	2,73

Notas: ⁽¹⁾ número de amostras; ⁽²⁾ médias aritméticas; ⁽³⁾ uT; ⁽⁴⁾ µs/cm²; ⁽⁵⁾ °C; ⁽⁶⁾ mg/L; e ⁽⁷⁾ mg O₂/L; ⁽⁸⁾ NMP/100 mL; e ⁽⁹⁾ Não detectado; e ⁽¹⁰⁾ UFC/100 mL.

Tabela 9 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 4, sub-bacia córrego Santa Catarina, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014

Parâmetro	n ⁽¹⁾	Média ⁽²⁾	Valor Máximo	Valor Mínimo	Desvio-Padrão
Turbidez ⁽³⁾	19	9,3	30,4	2,2	6,6
pH	18	6,7	7,2	6,4	0,2
Condutividade elétrica ⁽⁴⁾	8	96,4	275,0	40,8	78,9
Temperatura ⁽⁵⁾	5	21,6	25,2	18,9	2,5
Oxigênio dissolvido ⁽⁶⁾	7	5,0	7,2	3,0	1,6
DQO ⁽⁷⁾	7	27,4	62,3	11,9	16,7
Coliformes totais ⁽⁸⁾	16	1,2×10 ⁴	4,5×10 ⁴	1,9×10 ¹	1,4×10 ⁴
<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	16	2,4×10 ³	2,4×10 ⁴	3,0×10 ¹	6,3×10 ³
Enterococos ⁽⁸⁾	8	6,9×10 ²	1,6×10 ³	3,7×10 ¹	6,1×10 ²
<i>CN-I3</i> ⁽⁹⁾	19	2,8	14,0	ND ⁽⁹⁾	4,9
<i>Famp</i> ⁽⁹⁾	18	0,1	1,0	ND	0,2

Notas: ⁽¹⁾ número de amostras; ⁽²⁾ médias aritméticas; ⁽³⁾ uT; ⁽⁴⁾ µs/cm²; ⁽⁵⁾ °C; ⁽⁶⁾ mg/L; e ⁽⁷⁾ mg O₂/L; ⁽⁸⁾ NMP/100 mL; e ⁽⁹⁾ Não detectado ⁽¹⁰⁾UFC/100 mL.

Tabela 10 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 5, sub-bacia córrego Paraíso, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014

Parâmetro	n ⁽¹⁾	Média ⁽²⁾	Valor Máximo	Valor Mínimo	Desvio-Padrão
Turbidez ⁽³⁾	19	12,	36,9	3,4	7,9
pH	18	6,7	7,0	6,3	0,2
Condutividade elétrica ⁽⁴⁾	8	80,7	134,8	50,3	29,8
Temperatura ⁽⁵⁾	5	20,7	23,1	19,3	1,5
Oxigênio dissolvido ⁽⁶⁾	7	5,3	7,9	3,6	1,4
DQO ⁽⁷⁾	7	33,5	68,2	4,9	20,8
Coliformes totais ⁽⁸⁾	16	1,6×10 ⁴	6,1×10 ⁴	5,7×10 ¹	1,7×10 ⁴
<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	16	3,7×10 ²	1,5×10 ³	6,0	4,2×10 ²
Enterococos ⁽⁸⁾	8	9,0×10 ²	1,6×10 ³	2,0×10 ¹	6,9×10 ²
CN-13 ⁽⁹⁾	19	2,8	39,0	ND ⁽⁹⁾	9,1
Famp ⁽⁹⁾	18	2,0	11,0	ND	3,2

Notas: ⁽¹⁾ número de amostras; ⁽²⁾ médias aritméticas; ⁽³⁾ uT; ⁽⁴⁾ µs/cm²; ⁽⁵⁾ °C; ⁽⁶⁾ mg/L; e ⁽⁷⁾ mg O₂/L; ⁽⁸⁾ NMP/100 mL; ⁽⁹⁾ Não detectado; e ⁽¹⁰⁾ UFC/100 mL.

Tabela 11 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 6, sub-bacia córrego Palmital, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014

Parâmetro	n ⁽¹⁾	Média ⁽²⁾	Valor Máximo	Valor Mínimo	Desvio-Padrão
Turbidez ⁽³⁾	19	13,9	84,3	6,8	18,6
pH	18	6,8	7,1	6,1	0,2
Condutividade elétrica ⁽⁴⁾	8	80,3	172,7	43,0	49,4
Temperatura ⁽⁵⁾	5	21,2	25,8	18,9	2,8
Oxigênio dissolvido ⁽⁶⁾	7	5,7	8,0	3,8	1,6
DQO ⁽⁷⁾	7	24,3	44,5	7,11	13,7
Coliformes totais ⁽⁸⁾	16	6,4×10 ³	2,4×10 ⁴	1,0×10 ¹	6,9×10 ³
<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	16	1,2×10 ²	5,6×10 ²	7,5	1,6×10 ²
Enterococos ⁽⁸⁾	8	2,6×10 ²	1,3×10 ³	4,0	4,4×10 ²
CN-13 ⁽⁹⁾	19	3,0	41,0	ND ⁽⁹⁾	9,4
Famp ⁽⁹⁾	18	4,1	35,0	ND	9,4

Notas: ⁽¹⁾ número de amostras; ⁽²⁾ médias aritméticas; ⁽³⁾ uT; ⁽⁴⁾ µs/cm²; ⁽⁵⁾ °C; ⁽⁶⁾ mg/L; e ⁽⁷⁾ mg O₂/L; ⁽⁸⁾ NMP/100 mL; ⁽⁹⁾ Não detectado; e ⁽¹⁰⁾ UFC/100 mL.

Tabela 12 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 7, sub-bacia córrego Antuérpia, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014

Parâmetro	n ⁽¹⁾	Média ⁽²⁾	Valor Máximo	Valor Mínimo	Desvio-Padrão
Turbidez ⁽³⁾	19	16,6	30,1	2,9	6,6
pH	18	6,7	7,21	5,9	0,3
Condutividade elétrica ⁽⁴⁾	8	72,7	122,8	48,9	22,3
Temperatura ⁽⁵⁾	5	20,9	22,8	19,0	1,4
Oxigênio dissolvido ⁽⁶⁾	7	5,9	7,1	3,3	1,3
DQO ⁽⁷⁾	7	24,1	41,9	13,8	9,2
Coliformes totais ⁽⁸⁾	16	1,1×10 ⁴	2,4×10 ⁴	2,0×10 ¹	1,1×10 ⁴
<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	16	7,2×10 ³	8,2×10 ³	2,0×10 ¹	2,1×10 ³
Enterococos ⁽⁸⁾	8	7,7×10 ²	5,4×10 ³	1,7×10 ¹	1,8×10 ³
CN-13 ⁽⁹⁾	19	18,3	210,0	ND ⁽⁹⁾	48,3
Famp ⁽⁹⁾	18	3,6	50,0	ND	11,8

Notas: ⁽¹⁾ número de amostras; ⁽²⁾ médias aritméticas; ⁽³⁾ uT; ⁽⁴⁾ µs/cm²; ⁽⁵⁾ °C; ⁽⁶⁾ mg/L; e ⁽⁷⁾ mg O₂/L; ⁽⁸⁾ NMP/100 mL; ⁽⁹⁾ Não detectado; e ⁽¹⁰⁾ UFC/100 mL.

Tabela 13 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 8, sub-bacia córrego do Engenho, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014

Parâmetro	n ⁽¹⁾	Média ⁽²⁾	Máximo	Mínimo	Desvio-Padrão
Turbidez ⁽³⁾	19	20,8	40,5	4,1	10,7
pH	18	6,8	7,6	5,9	0,4
Condutividade elétrica ⁽⁴⁾	8	85,1	184,9	59,6	42,5
Temperatura ⁽⁵⁾	5	21,6	23,7	20,2	1,6
Oxigênio dissolvido ⁽⁶⁾	7	5,9	7,9	4,4	1,2
DQO ⁽⁷⁾	7	37,3	66,8	22,7	16,1
Coliformes totais ⁽⁸⁾	16	9,6×10 ⁴	6,1×10 ⁵	7,5×10 ¹	1,6×10 ⁴
<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	16	4,1×10 ³	2,4×10 ⁴	3,4×10 ¹	7,9×10 ³
Enterococos ⁽⁸⁾	8	6,0×10 ³	5,4×10 ³	2,7×10 ¹	1,7×10 ³
CN-13 ⁽⁹⁾	17	55,5	250,0	ND ⁽⁹⁾	88,6
Famp ⁽⁹⁾	18	2,3	35,0	ND	8,3

Notas: ⁽¹⁾ número de amostras; ⁽²⁾ médias aritméticas; ⁽³⁾ uT; ⁽⁴⁾ µs/cm²; ⁽⁵⁾ °C; ⁽⁶⁾ mg/L; e ⁽⁷⁾ mg O₂/L; ⁽⁸⁾ NMP/100 mL; ⁽⁹⁾ Não detectado; e ⁽¹⁰⁾ UFC/100 mL.

Tabela 14 – Caracterização física, química e microbiológica da qualidade da água no ponto de coleta 9, ponto de captação de água para abastecimento das ETA-UFV e ETA1 SAAE, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, junho de 2012 a maio de 2014

Parâmetro	n ⁽¹⁾	Média ⁽²⁾	Máximo	Mínimo	Desvio-Padrão
Turbidez ⁽³⁾	19	18,14	85,2	3,5	25,2
pH	18	6,8	7,7	6,4	0,3
Condutividade elétrica ⁽⁴⁾	8	70,1	86,7	63,0	8,8
Temperatura ⁽⁵⁾	5	22,9	26,6	20,7	2,7
Oxigênio dissolvido ⁽⁶⁾	7	5,6	6,7	3,9	0,9
DQO ⁽⁷⁾	7	24,2	46,7	4,5	16,7
Coliformes totais ⁽⁸⁾	16	$9,5 \times 10^3$	$3,4 \times 10^4$	$6,6 \times 10^1$	$1,2 \times 10^4$
<i>E. coli</i> ⁽⁸⁾	16	$1,8 \times 10^2$	$2,4 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1$	$5,9 \times 10^3$
Enterococos ⁽⁸⁾	8	$3,3 \times 10^1$	$1,1 \times 10^2$	4,5	$3,3 \times 10^1$
CN-13 ⁽⁹⁾	18	37,3	318,0	ND ⁽⁹⁾	103,3
Famp ⁽⁹⁾	19	4,4	42,0	ND	10,3

Notas: ⁽¹⁾ número de amostras; ⁽²⁾ médias aritméticas; ⁽³⁾ uT; ⁽⁴⁾ $\mu\text{S}/\text{cm}^2$; ⁽⁵⁾ °C; ⁽⁶⁾ mg/L; e ⁽⁷⁾ mg O₂/L; ⁽⁸⁾ NMP/100 mL; ⁽⁹⁾ Não detectado; e ⁽¹⁰⁾ UFC/100 mL.

Em relação aos coliformes totais, o córrego do Engenho apresentou o maior valor médio ($9,6 \times 10^4$ NMP/100 mL). No que diz respeito à *Escherichia coli*, as médias do córrego Paraíso ($3,75 \times 10^2$ NMP/100 mL) e do córrego Palmital ($1,24 \times 10^2$ NMP/100 mL) foram as que mais diferiram das demais, bem como a do ponto de coleta Ribeirão São Bartolomeu, com o maior valor médio ($9,56 \times 10^3$ NMP/100 mL). O resultado observado era esperado, uma vez que neste ponto o RSB recebe todo o aporte hídrico dos demais cursos d'água e à montante do ponto de coleta situa-se a descarga do efluente da ETE do bairro Romão dos Reis.

Com relação aos enterococos, as maiores médias foram observadas na sub-bacia do córrego do Engenho e no RSB, com valores de $6,0 \times 10^3$ NMP/100 mL e $1,22 \times 10^3$ NMP/100 mL, respectivamente.

Devido às características distintas de cada sub-bacia quanto ao uso e à ocupação do solo, principalmente em relação às atividades agropecuárias, procurou-se verificar a existência de correlações entre as variáveis de qualidade da água e o número de animais existentes em cada sub-bacia (Tabela 16).

Na Tabela 15 se apresenta a distribuição proporcional das propriedades com criação de animais, o número de animais existentes e a densidade de animais por sub-bacia. Notam-se ocupações diferenciadas, sendo as sub-bacias córrego Palmital e córrego do Engenho as que apresentam o maior número de propriedades (22,0% e

Tabela 15 – Distribuição proporcional das propriedades e dos animais segundo a sub-bacia, bacia hidrográfica ribeirão São Bartolomeu

Sub-Bacia	Propriedades		Área	Animais	
	N	%	ha	n ⁽¹⁾	Densidade de animais (n/ha)
Ribeirão São Bartolomeu	3	4,8	118,2	88	0,8
Córrego São Lucas	3	4,8	60,8	64	1,1
Córrego dos Machados	6	9,5	100,1	63	0,6
Córrego Santa Catarina	1	1,6	116,9	22	0,2
Córrego Paraíso	12	19,1	49,0	14	0,3
Córrego Palmital	14	22,2	227,9	133	0,1
Córrego Antuérpia	7	11,1	66,9	262 (180) ⁽²⁾	6,6
Córrego do Engenho	17	26,98	139,53	408 (280) ⁽³⁾ (20) ⁽⁴⁾	5,07
Total	63	100	879,3	1.054 (460) (20)	1,8

⁽¹⁾ os dados entre parênteses se referem à distribuição proporcional dos animais; ⁽²⁾ 180 suínos das duas suinoculturas existentes; ⁽³⁾ 288 suínos da suinocultura existente nessa área; e ⁽⁴⁾ 20 caprinos da caprinocultura existente.

Tabela 16 – Matriz de correlação entre as variáveis de qualidade da água e o número de animais existentes em cada sub-bacia, bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu. Viçosa, MG, julho de 2012 a maio de 2014

Variáveis	Coeficiente de Spearman (rs) e valores de p (entre parênteses)							
	Número de Animais							
	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7	SB8
CN-13	-0,74 (0,33)	-0,06 (0,92)	-0,54 (0,42)	-0,06 (0,92)	-0,21 (0,92)	0,89 (0,08)	0,95 (0,08)	0,95 (0,08)
FAmp	0,26 (0,75)	0,82 (0,33)	-0,54 (0,42)	-0,24 (0,92)	-0,06 (0,92)	0,65 (0,78)	0,26 (0,75)	-0,33 (0,75)
Coliformes totais	0,95 (0,08)	-0,74 (0,33)	0,95 (0,08)	-0,74 (0,33)	-0,21 (0,92)	0,95 (0,08)	0,40 (0,75)	1,00 (0,08)
<i>E. coli</i>	0,95 (0,08)	-0,74 (0,33)	0,95 (0,08)	-0,74 (0,33)	-0,74 (0,33)	0,95 (0,08)	0,32 (0,75)	0,60 (0,42)
Enterococos	0,95 (0,08)	0,95 (0,08)	0,95 (0,08)	0,95 (0,38)	-0,33 (0,75)	-0,21 (0,92)	0,95 (0,08)	0,89 (0,08)
Turbidez	0,33 (0,75)	-0,33 (0,75)	1,00 (0,08)	-0,78 (0,33)	-0,74 (0,33)	0,33 (0,75)	-0,32 (0,75)	-0,74 (0,33)
pH	1,00(0,08)	1,00 (0,08)	0,82 (0,33)	1,00 (0,08)	0,78 (0,33)	-0,33 (0,75)	0,11 (0,92)	-0,95 (0,08)
Condutividade	-0,11 (0,92)	-0,63 (0,42)	-0,95 (0,08)	-0,11 (0,92)	-0,95 (0,08)	-0,74 (0,33)	0,20 (0,92)	0,40 (0,75)
Oxigênio dissolvido	0,74 (0,33)	0,32 (0,75)	0,74 (0,33)	0,21 (0,92)	-0,95 (0,08)	-0,95 (0,08)	0,40 (0,75)	-0,80 (0,33)
DQO	-0,63 (0,42)	-0,11 (0,92)	0,21 (0,92)	-0,95 (0,08)	-0,21 (0,92)	-0,74 (0,33)	0,40 (0,75)	0,40 (0,75)

Células destacadas em cinza indicam correlação estatisticamente significativa ($\alpha \leq 0,10$).

NA = não se aplica pelo fato de a associação entre variáveis não fazer sentido.

26,0%, respectivamente). Em relação à densidade de animais, as sub-bacias Córrego do Engenho, córrego Antuérpia e córrego São Lucas foram as que apresentaram as maiores densidades, 6,6 animais/ha, 5,07 animais/ha e 1,06 animais/ha, respectivamente.

A sub-bacia córrego do Engenho (SB8) destacou-se por apresentar a maior contagem de colifagos somáticos (CN-13) ao longo de todo o período de monitoramento, com concentração média de 55,5 UFP/mL. Verificou-se que a concentração detectada apresentou correlação significativa forte e positiva com o número de animais presentes na área. Atualmente, existem nessa sub-bacia duas suinoculturas, com um total de 288 suínos. Os efluentes dessas suinoculturas são tratados por um sistema de lagoas de estabilização e depois utilizados para irrigação de pastagens. É importante ressaltar também que essa sub-bacia apresenta área considerável de solo exposto (45,5%), o que favorece o processo de escoamento superficial. Os níveis de coliformes totais e enterococos também apresentaram correlação significativa forte e positiva com o número de animais.

Na sub-bacia córrego Antuérpia (SB7) também foi detectada elevada concentração de colifagos somáticos, a segunda maior média, 18,3 UFP/mL. É importante salientar que embora apenas 11% das propriedades estejam localizadas nessa área, existe ali uma suinocultura com capacidade para 180 suínos, cujos dejetos não recebem nenhum tipo de tratamento e são lançados no córrego ou utilizados na agricultura. Verificou-se nesta sub-bacia correlação forte e positiva das concentrações de colifagos somáticos (CN-13) e de enterococos com o número de animais presentes.

Correlações significantes e fortemente positivas foram também observadas entre as concentrações de colifagos somáticos (CN-13), de coliformes totais e de *E. coli* e o número de animais presentes na sub-bacia córrego Palmital (SB6).

A correlação entre número de animais e colifagos somáticos (CN-13) nas sub-bacias Palmital (SB6), Antuérpia (SB7) e Engenho (SB8), bem como a não significância na correlação com Famp nas mesmas sub-bacias, podem ser explicadas por trabalhos que confirmam existência de diferenças na sobrevivência de cada um desses bacteriófagos (MUNIESA *et al.*, 2009) e em sua concentração em fezes de animais (GRABOW, 2001; SCHAPER; DURAN; JOFRE, 2002).

Tendo em vista que essas mesmas sub-bacias (SB6 SB7 e SB8) apresentaram as maiores médias de turbidez, vale ressaltar que a intensidade e a duração da precipitação podem influenciar a qualidade da água superficial, pois na sequência de chuvas intensas o material fecal de áreas agrícolas e urbanas pode ser carregado junto com partículas em

suspensão para os cursos d'água, o que impactaria diretamente na turbidez da amostra (OGORZALY *et al.*, 2009). Alguns estudos têm destacado a relação entre eventos de chuvas intensas e aumento da contaminação fecal provenientes de fontes não pontuais em águas superficiais (COULLIETTE; NOBLE, 2008; SCHILLING *et al.*, 2009). Entretanto, neste estudo não foi verificada correlação estatisticamente significativa entre os níveis de colifagos (CN-13 e Famp) e a precipitação ocorrida no período da coleta ($r_s = 0,082$ e $p = 0,698$).

Enfim, mesmo que os resultados apresentados neste trabalho para a bacia do RSB não permitam inferências mais conclusivas sobre a eficácia dos colifagos somáticos e F-específico como indicadores de rastreamento de fontes de contaminação fecal, sua ocorrência em todas as sub-bacias, bem como a de bactérias indicadoras de contaminação tradicionalmente utilizadas, pode estar relacionada aos diversos usos e ocupação da bacia.

5.1.4. Detecção e genotipagem de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

5.1.4.1. Detecção de *Cryptosporidium*

Para obter informações sobre a ocorrência de espécies de *Cryptosporidium* na bacia hidrográfica do RSB amostras de água foram coletadas nos meses de fevereiro a julho de 2013 e de maio a novembro de 2014.

No total, 117 amostras foram analisadas por microscopia de imunofluorescência e em 43% amostras foi verificada a presença de oocistos de *Cryptosporidium*, sendo que em todos os pontos monitorados verificou-se a ocorrência de resultados positivos. As concentrações observadas variaram de não detectadas a 14 oocistos/L (Figura 11) e acompanham resultados similares relatados por outros autores nesta mesma bacia hidrográfica (BASTOS *et al.*, 2004; BRAGA, 2007; DIAS, 2007; LOPES, 2008; VIANA, 2010; BEZERRA, 2011).

As sub-bacias Córrego do Engenho (SB08) e Córrego Antuérpia (SB07) apresentaram concentrações elevadas de oocistos de *Cryptosporidium* quando comparadas às demais sub-bacias, 4,87 e 4,69 oocistos/L, respectivamente. Já a sub-bacia do Córrego Santa Catarina (SB04) foi a que apresentou menor grau de contaminação (Figura 11).

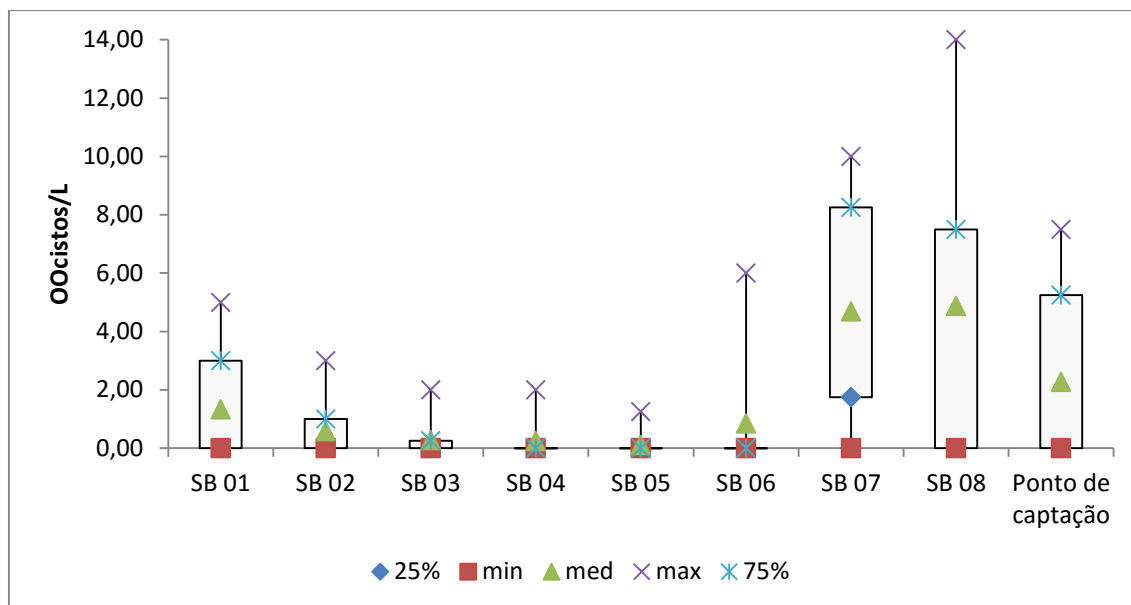


Figura 11 – Estatística descritiva das concentrações de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nos pontos amostrados na bacia do ribeirão São Bartolomeu, Viçosa, MG, 2013 e 2014

Em que pese o fato de que, de acordo com o teste estatístico e o nível de significância utilizados (Kruskal-Wallis, 5%), as diferenças entre as concentrações de oocistos verificadas nas sub-bacias não tenham se mostrado estatisticamente significantes, com se discute a seguir há indícios que a ocorrência de *Cryptosporidium* nas águas da bacia do RSB esteja ao uso e ocupação do solo.

De acordo com os dados de pesquisas realizadas, por meio de aplicação de questionários (DIAS, 2007; BASTOS; BEVILACQUA; MIERZWA, 2009) e com o levantamento informal realizado durante a realização deste estudo, se pode observar que as sub-bacias Córrego do Engenho e Córrego Antuérpia apresentam as maiores densidades de animais (bovinos, suínos e caprinos), 5,07 e 6,60 animais/ha (Tabela 15). Além disso, a suinocultura (180 animais) e a bovinocultura (80 animais) localizadas na sub-bacia Córrego Antuérpia não realizam tratamento dos efluentes gerados e fazem aplicação direta destes em áreas de pastagens. Além disso, Dias (2007) registrou prevalência média de propriedades positivas para oocistos nesta sub-bacia de 18%. Tudo isso indica, na verdade, um entendimento já bastante consolidado na literatura, que a exploração animal desempenha importante fonte de contaminação de cursos d'água com *Cryptosporidium*. Por exemplo, segundo Phillip *et al.* (2008), animais selvagens e domésticos são os principais tipos de fontes de contaminação com oocistos de *Cryptosporidium* em águas superficiais, ao passo que a contribuição da agricultura é menor. Essa conclusão surgiu a partir de um estudo comparativo entre três bacias, com

distintos usos do solo, sendo que a bacia caracterizada com a maior presença de animais foi também a com maior número de amostras positivas para oocistos de *Cryptosporidium*. Keeley e Faukner (2008) também mostraram que a presença desses protozoários pode ser fortemente influenciada pelo uso do solo, sendo que a maior ocorrência de oocistos foi observada nos locais impactados por criação de animais, principalmente bovinos. Já na sub-bacia do Córrego Santa Catarina (SB04), que apresentou menor grau de contaminação, existe uma área de preservação ambiental de responsabilidade da UFV, o que justifica o reduzido percentual de propriedades com exploração animal (1,59%) e confirma a necessidade de medidas de preservação das áreas de bacias hidrográficas.

Logo, devido à importância dos animais como reservatório e sua capacidade de disseminar oocistos no ambiente foram realizados estudos de correlação entre a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* e o número de animais presentes em cada sub-bacia. O ponto de coleta “ribeirão São Bartolomeu” não foi considerado nesta análise, pois recebe o aporte hídrico de todas as outras sub-bacias e isso interferiria na interpretação dos resultados.

Os resultados demonstraram que a variável “densidade de animais” (incluindo a população suína) parece ser a que melhor explicaria ($r_s = 0,67$; $p = 0,08$) a ocorrência de oocistos na água. Considerando nível de significância de 10%, essa correlação é estatisticamente significativa, indicando que as sub-bacias com maior densidade de animais são também aquelas com maior ocorrência de *Cryptosporidium* na água.

Por outro lado, não foram observadas correlações entre a ocorrência de protozoários na água e as das bactérias indicadoras de contaminação fecal – coliformes totais, *Escherichia coli*, enterococos. Esse resultado é interessante pois retoma a discussão sobre as limitações desses grupos bacterianos para refletir a dinâmica de de protozoários na água.

São diversos os trabalhos publicados que buscam correlacionar a detecção de organismos indicadores de contaminação fecal (*E. coli*) com a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em mananciais de abastecimento de água. No entanto, na maioria dos casos, os estudos conduzidos em água superficiais, ou mesmo em águas residuárias, não têm demonstrado tal correlação (SMITH; ROSE, 1998; RYU; ABBASZADEGAN, 2008; PAYMENT; LOCAS, 2011; ZHU *et al.*, 2011).

Com base em nossos resultados pode-se inferir que o aumento do nível de contaminação (sinalizada por altas concentrações de *E. coli*) não indica necessariamente aumento da probabilidade de ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium*. Portanto, infere-se também que o uso de concentrações médias anuais de *E. coli* como alerta para realização de análises de ocorrência de *Cryptosporidium* em mananciais superficiais (tal como sugerido na Portaria nº 2.914/2011) é questionável.

Dito isso, é fato que os dados de quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* revelaram alguma congruência com os dos demais indicadores de contaminação fecal. Dois exemplos são as sub-bacias dos Córregos Antuérpia e do Engenho, que apresentaram as maiores contagens de oocistos. Conforme apresentado anteriormente, nestes pontos houve correlação positiva e forte entre a densidade de animais e as concentrações de colifagos somáticos (CN-13), de *E. coli* e de enterococos. Pode-se, assim, interpretar que um elevado número de animais contribuiu com alta carga de material fecal que, carregado ou diretamente eliminado nesses cursos d'água, culminou na elevada concentração destes microrganismos.

5.1.4.2. Genotipagem de *Cryptosporidium*

Todas as amostras com resultados positivos pelo método de microscopia foram submetidas ao processo de extração de DNA seguindo a metodologia descrita no item 4.3.2 (D). Na Tabela 17 estão apresentados os números de oocistos/L detectados por microscopia de imunofluorescência e a quantificação do material genômico após a etapa de extração de DNA nas amostras coletadas ao longo do período de monitoramento.

De forma geral, é possível observar que quando a concentração de oocistos/L foi menor que 1 não foi possível realizar a quantificação do DNA extraído; Porém, a fim de melhor avaliar essa relação, foi realizada análise de correlação entre os valores de (oo)cistos detectados por microscopia de imunofluorescência e a quantidade de DNA extraído, tendo essa sido significativa (coeficiente de Spearman $r_s = 0,6807$; $p = 0,022$).

Nas Figuras 12 e 13 é possível observar alguns resultados positivos pela Nested PCR.

Tabela 17 – Quantificação do material genético extraído das amostras positivas para *Cryptosporidium* em microscopia de imunofluorescência, com as respectivas datas de coleta e identificação utilizada na etapa de biologia molecular

Identificação	Amostra	Data da Coleta	Número de oocistos/L	Quantidade de DNA (ng/μL)
V01	SB 01	Fev./13	5,00	0,824
V02	SB 02	Fev./13	1,00	0,449
V03	SB 05	Fev./13	0,25	< Limite de detecção
V04	SB 08	Fev./13	3,00	0,542
V05	SB 03	Mar./13	0,50	< Limite de detecção
V06	SB 07	Mar./13	2,50	0,28
V07	SB 01	Abr./13	0,75	< Limite de detecção
V08	SB 02	Abr./13	0,40	< Limite de detecção
V09	SB 07	Abr./13	6,00	0,504
V10	Ponto de captação	Abr./13	1,00	0,229
V11	SB 03	Mai./13	1,05	0,245
V12	SB 07	Mai./13	4,00	< Limite de detecção
V13	Ponto de captação	Mai./13	3,00	0,18
V14	SB 02	Jun./13	8,00	0,843
V15	SB 07	Jun./13	5,40	0,824
V16	SB 08	Jun./13	0,45	< Limite de detecção
V17	SB 06	Jul./13	1,60	0,268
V18	SB 07	Jul./13	7,00	0,504
V19	SB 08	Jul./13	7,50	0,376
V20	Ponto de captação	Jul./13	0,50	< Limite de detecção
V21	SB 01	Mai./14	2,00	0,39
V22	SB 03	Mai./14	2,00	0,344
V23	SB 04	Mai./14	9,00	1,11
V24	SB 07	Mai./14	12,50	1,39
V25	SB 08	Mai./14	1,20	0,11
V26	SB 04	Jun./14	2,00	1,22
V27	SB 07	Jun./14	6,00	0,873
V28	SB 08	Jun./14	2,50	0,699
V29	SB 01	Jul./14	3,00	1,04
V30	SB 02	Jul./14	14,00	0,873
V31	SB 07	Jul./14	3,50	1,82
V32	SB 01	Ago./14	2,00	0,291
V33	SB 02	Ago./14	7,50	0,983
V34	SB 08	Ago./14	6,00	1,34
V35	Ponto de captação	Ago./14	5,00	0,956

Continua...

Tabela 17, cont.

Identificação	Amostra	Data da Coleta	Número de oocistos/L	Quantidade de DNA (ng/μL)
V36	SB 01	Set./14	2,80	0,19
V37	SB 07	Set./14	6,30	0,721
V38	SB 08	Set./14	4,50	0,349
V39	Ponto de captação	Set./14	3,00	0,18
V40	SB 07	Out./14	2,00	0,13
V41	SB 02	Nov./14	1,00	0,612
V42	SB 05	Nov./14	1,25	0,277
V43	SB 06	Nov./14	1,00	0,285
V44	SB 07	Nov./14	1,00	0,304
V45	Ponto de captação	Nov./14	7,50	0,983

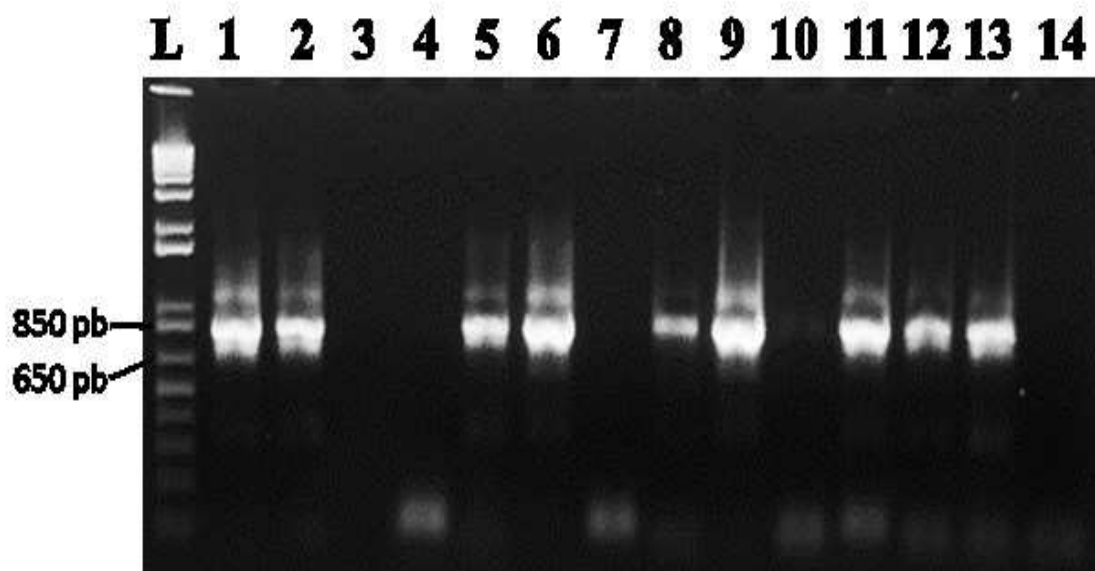


Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados nas reações de Nested PCR para o fragmento de 826 pb. L = marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen); 1 e 2 = controles positivos; 3 = controle negativo; e 4-14 = amostras V3, V4, V6, V7, V9, V10, V12, V13, V15, V16 e V16.

Do total de 117 amostras positivas para oocistos de *Cryptosporidium* por microscopia de imunofluorescência, 28 (o que representa 24% das amostras) foram positivas no Nested-PCR. Em geral esse resultado vai ao encontro dos encontrados por Jellison, Hemond e Schauer (2002) e por Araujo *et al.* (2008), que pesquisaram a ocorrência de *Cryptosporidium* em amostras de águas superficiais com baixo número de oocistos/L e enfrentaram dificuldade semelhante na realização de Nested-PCR.

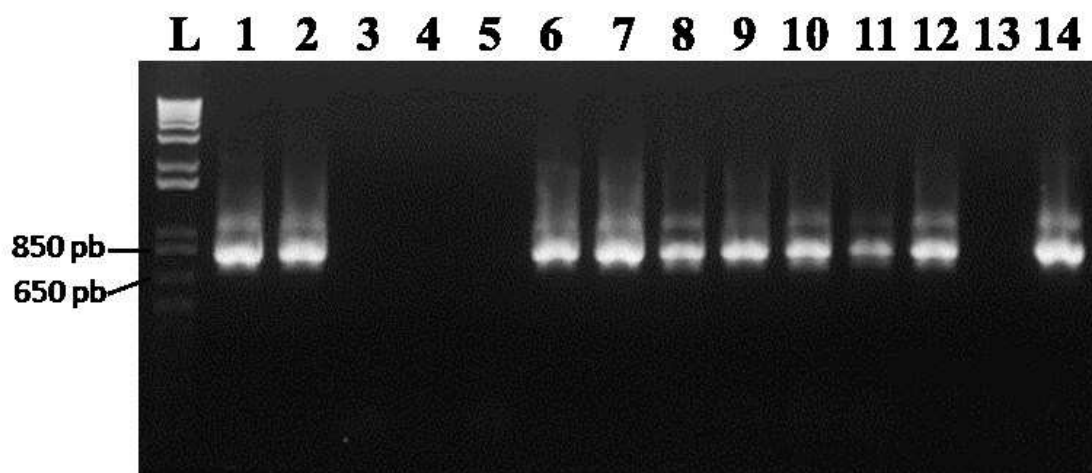


Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados nas reações de Nested PCR para o fragmento de 826 pb. L = marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen); 1-14 = amostras V23, V24, V25, V26, V27, V33, V35, V37, V38, V40, V41, V42, V43, V44 e V45.

As dificuldades de amplificação por PCR podem estar associadas à contaminação com substâncias presentes na água que favorecem a inibição da reação. Substâncias surfactantes, sais, compostos fenólicos, ácidos húmicos e fúlvicos desfavorecem a detecção dos oocistos principalmente quando submetidos aos métodos moleculares por apresentarem propriedades de formação de complexos com ácidos nucleicos e/ou inibição da atividade da enzima polimerase (JIANG *et al.*, 2005a).

A dificuldade de ruptura da parede dos oocistos é outra dificuldade para extração do material genético. Atualmente, existem vários protocolos de extração de DNA que utilizam princípios químicos, como fenol-clorofórmio, digestão alcalina ou princípios físicos como ciclos de congelamento/descongelamento ou uso de kits comerciais de extração de DNA (JELLISON; HEMOND; SCHAUER, 2002; GATEI *et al.*, 2003; XIAO; RYAN, 2004; CARVALHO ALMEIDA *et al.*, 2006; COUPE *et al.*, 2005; HUBER *et al.*, 2007; OSAKI, 2009; ARAUJO, 2015).

Por fim, o baixo número de oocistos de *Cryptosporidium* comumente encontrados em amostras ambientais é em si mais uma restrição, que se vê acentuada nas etapas de concentração das amostras nos métodos de detecção que pode levar à redução adicional na quantidade disponível para análise.

Os produtos amplificados pela Nested-PCR que apresentaram bandas visíveis em gel de agarose (com baixa concentração ou com concentração adequada) foram submetidos a sequenciamento, em ambas as direções, utilizando os iniciadores direto e

reverso empregados na amplificação do fragmento de 826pb para a separação de espécies diferentes que poderiam estar presentes nas amostras. Entretanto, somente em oito amostras (V32, V22, V16, V15, V13, V8, V6 e V5) o sequenciamento mostrou-se de qualidade, gerando sequências de 820 pares de base. As demais, por apresentarem sequências curtas ou ruídos, teriam que ser submetidas à novo sequenciamento em busca de resultados de melhor qualidade.

Na Figura 14 é possível verificar a relação filogenética com todas as amostras positivas pela Nested-PCR no estudo. O sequenciamento das amostras resultou em perfis compatíveis com as espécies *C. parvum* em todas as amostras, quando comparadas a sequências homólogas disponíveis no banco de dados GenBank (100% de identidade).

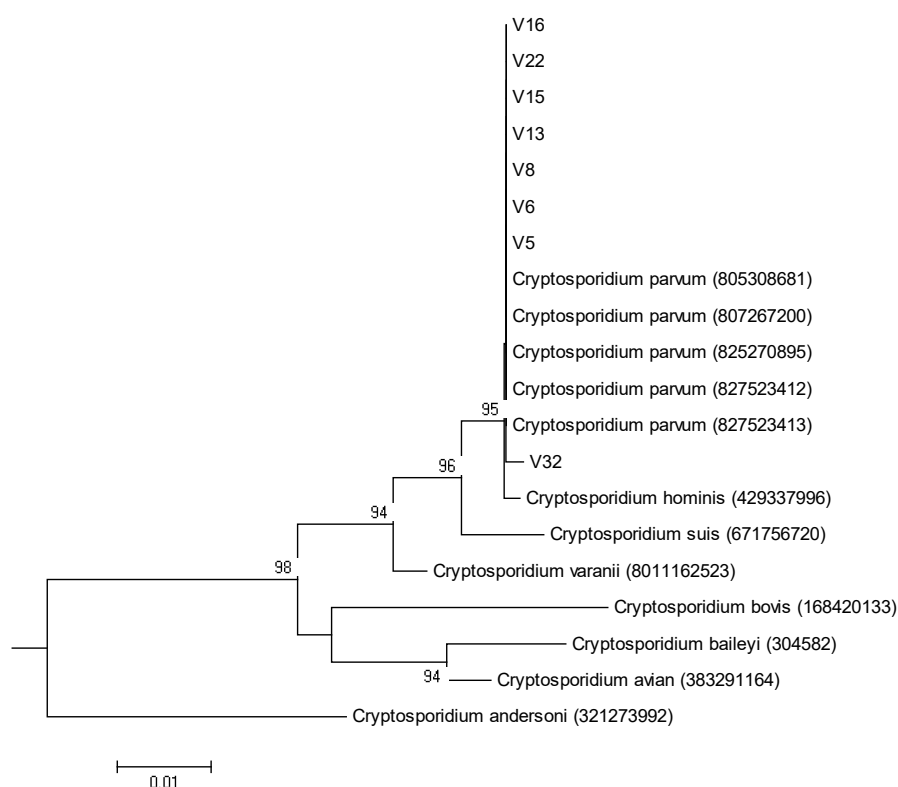


Figura 14 – Relações evolutivas dos táxons baseadas no método de Neighbor-Joining utilizando sequências do gene *18S rRNA* de diferentes espécies de *Cryptosporidium* disponíveis no banco de dados GenBank e os valores de bootstrap após 1.000 réplicas. As demais amostras identificadas pela letra V são amostras positivas de água oriundas deste estudo. O número entre parênteses indica o GenBank Identifier (GI number) da sequência. Os números próximos aos ramos representam a porcentagem em que os taxa se agruparam no teste de bootstrap. *Saccharomyces cerevisiae* (158819369) foi usado como *outgroup*.

Estudo realizado em São Paulo por Araújo (2015) revelou, após amplificação pela Nested-PCR e posicionamento taxonômico, a presença da espécie *C. parvum* em 12% (3/25) das amostras do rio São Lourenço da Serra; na Represa Guarapiranga, das 25

amostras analisadas, *Cryptosporidium* foi detectado em 20% (5/25), apresentando também apresentou sequências compatíveis com *C. parvum*.

A identificação de *C. parvum* neste estudo é resultado relevante para o conhecimento das possíveis fontes de disseminação dessa espécie nos pontos amostrados. A espécie *Cryptosporidium parvum* afeta uma grande variedade de mamíferos, sendo mais comumente encontrada em humanos e ruminantes (XIAO; RYAN, 2004). Contudo, os bovinos são uma das mais importantes fontes de transmissão desse protozoário através da água (WHO, 2004; XIAO, 2010; RYAN; POWER, 2012). Segundo Crockett e Haas (1997), um único bezerro infectado pode excretar mais oocistos por dia que 1.000 indivíduos imunocomprometidos

É importante também para a identificação de perigos e caracterização de riscos à saúde. Segundo Ryan e Power (2012), *C. parvum* está amplamente distribuído no ambiente aquático e a informação sobre a circulação e a identificação dessa espécie é relevante para vigilância da qualidade da água, não só pela sua importância clínica, mas pela quantidade de hospedeiros que, se infectados, podem carrear e disseminar esta espécie. Além do *Cryptosporidium parvum* se revelar preocupante para em termos de infecção em seres humanos, principalmente nos países em desenvolvimento, essa espécie tem despertado grande interesse também na área veterinária por afetar a cadeia produtiva de bovinos e ovinos e provocar prejuízos financeiros.

5.2. Estudo 2 – Rastreamento de fontes de contaminação na bacia hidrográfica do rio Ouse, Reino Unido

5.2.1. Variáveis físicas e químicas de qualidade da água

Os dados do monitoramento das variáveis microbiológicas das amostras coletadas na bacia do rio Ouse estão apresentados na forma de estatística descritiva, em gráficos box-plot, nas Figuras 1A a 7A (Anexo A).

Como pode ser constatado na Figura 1A, a média da contagem de coliformes termotolerantes variou de $7,0 \times 10^1$ UFC/mL a $4,05 \times 10^3$ UFC/mL, sendo as maiores médias observadas nos pontos 3 (*Scrase Stream*, com $4,05 \times 10^3$ UFC/mL) e 27 (*Bevern Stream*, com $3,9 \times 10^3$ UFC/mL) e o menor valor observado no ponto 30 (*Newhaven*, com $7,0 \times 10^1$ UFC/mL), destacando-se que neste ponto as amostras eram provenientes

de água de mar. As contagens máximas de coliformes termotolerantes variaram de $2,6 \times 10^3$ UFC/mL (ponto 29) a $6,97 \times 10^4$ UFC/mL (ponto 17) e $2,76 \times 10^5$ UFC/mL (ponto 14). Os valores mínimos de coliformes encontrados variaram expressivamente, tendo o ponto 30 apresentado o menor valor: 5,0 UFC/mL.

Pela análise dos gráficos pode-se notar que em praticamente todos os pontos houve eventos de aumento expressivo de bactérias do grupo coliformes termotolerantes em algum momento dentro do período monitorado. Considerando os valores médios encontradas, constata-se ainda que em todos os pontos da bacia houve momentos em que não foi atendido o padrão de qualidade “excelente” para águas interiores estabelecidos pela *EU Bathing Water Directive* (2006/7/EC), cujo limite é de 500 UFC/100 mL de coliformes fecais. Também pode ser observado que em 19 dos 30 pontos a média foi maior ou igual a 1.000 UFC/100 mL, mostrando que em 50% das coletas esses corpos hídricos excederam ao padrão menos restritivo estabelecido pela referida diretiva, que considera água de “boa qualidade” aquela com valores de coliformes fecais até 1.000 UFC/100 mL.

Os valores médios de enterococos variaram de $3,75 \times 10^1$ UFC/mL no ponto 30 (*New Haven*) a $2,85 \times 10^3$ UFC/mL no ponto 20 (*Station Road Plumpton*). Os pontos 18 (*Northend Stream*), 21 (*Plumpton Road*) e 23 (*Coppards Bridge*) foram os que apresentaram as concentrações máximas mais elevadas - $3,40 \times 10^4$ UFC/mL, $7,72 \times 10^4$ UFC/mL e $3,86 \times 10^4$ UFC/mL, respectivamente. A regulamentação europeia é mais restritiva em relação à concentração de enterococos, sendo consideradas águas de excelente qualidade aquelas com no máximo 200 UFC/100 mL, de boa qualidade aquelas com até 330 UFC/100 mL e de qualidade suficiente aquelas com no máximo 400 UFC/100 mL. Com base nessa regulamentação, 22 dos 30 pontos (73,3%) tiveram 50% das amostras acima do valor menos restritivo estabelecido (Figura 2A), que é de 400 UFC/100 mL.

Os dados do monitoramento das variáveis físicas e-químicas nas amostras coletadas na bacia do rio Ouse também estão apresentados na forma de estatística descritiva, em gráficos box-plot, nas Figuras 8A a 12A (Anexo A). Com aplicação do teste de Kruskal-Wallis observou-se que somente as variáveis pH e condutividade diferiram, em média, em pelo menos um dos 30 pontos avaliados, com valor de $p \leq 0,05$.

Ao longo do rio Ouse e de seus principais afluentes, os valores de pH variaram entre 4,7 e 9,0 no período amostrado (Figura 9A), tendo a média dos valores de pH sido superior a 7,0 em todos os pontos. Os pontos 3 e 4 (*Scrase Stream* e *East Mascalls*) apresentaram os menores valores de pH - 4,79 e 4,69, respectivamente. No entanto, esses baixos valores de pH ocorreram apenas na última coleta, não se repetindo em nenhuma outra amostragem no período e em nenhum outro ponto. Considerando esses possíveis valores de pH como atípicos (*outliers*), constata-se que em todos os afluentes do rio Ouse o pH apresentou valores médios em torno de 7,5 a 8,5, em praticamente todo o período. Nnane, Ebdon e Taylor (2011), monitorando aspectos microbiológicos e físico-químicos em 14 pontos da mesma bacia, registraram mediana de pH de 7,76, com valores máximos de aproximadamente 8,5 em todas as estações do ano.

As médias dos valores de condutividade (Figura 12A) variaram de 166,50 a 596,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$, nos pontos 11 e 30 (*Hempstead Lane* e *Newhaven*), respectivamente, sendo importante, mais uma vez, destacar que as amostras coletadas no ponto 30 foram provenientes da água do mar. Segundo Baggio (2008), em relação à condutividade, em geral níveis superiores a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ indicam ambientes impactados. Em trabalho realizado no período de 2009 a 2011, na mesma bacia, Purnell (2012) verificou correlação fortemente positiva entre organismos indicadores de contaminação e condutividade, reforçando o sugerido pelos autores acima citados.

A turbidez apresentou médias que variaram de 5,0 a 23,0 uT nos pontos 29 e 5, respectivamente. Em 76,7% dos pontos (23 de 30 pontos), 75% das amostras coletadas apresentaram turbidez máxima de 20 uT, devendo ser ressaltado que nas demais essa porcentagem não ultrapassou 35 uT. Os valores máximos variaram de 17,8 uT no ponto 17 a 98,7 no ponto 14. Conforme pode ser observado na Figura 8A, a maior parte das sub-bacias apresentou pelo menos 25% das amostras com valores elevados de turbidez, o que indica eventos de carreamento de material que permaneceu em suspensão na água. Segundo Nnane, Ebdon e Taylor (2012), o aumento de turbidez na bacia do Ouse ocorreu em períodos de chuva por carreamento de solo, partículas orgânicas e fezes de animais. Nesses períodos, o revolvimento do sedimento do rio também pode ter contribuído com o aumento do material em suspensão. Já em períodos de chuvas menos intensas, os autores levantam hipóteses para o aumento de turbidez devido a retornos de efluentes, processos eólicos, distúrbios localizados no fluxo de sedimentos ou até mesmo à defecação de animais diretamente dentro do rio.

5.2.2. Uso de bacteriófagos no rastreamento de fontes de contaminação microbiológica

Durante todo o período de monitoramento e em todos os pontos de coleta ao longo da bacia do rio Ouse foram detectados colifagos somáticos (WG-5) em concentrações mais elevadas se comparadas com as concentrações de coliformes termotolerantes e enterococos. As médias das concentrações variaram de 2×10^2 UFP/100 mL (ponto 30) a $8,3 \times 10^3$ UFP/100 mL (ponto 13). Os valores mínimos e máximos encontrados foram de não detectados nos pontos 1, 2, 7, 14, 23, 25, 26 e 30 a $4,97 \times 10^4$ UFP/100 mL no ponto 18. Ebdon, Munie e Taylor (2007) também constataram quantidades de colifagos somáticos maiores que a de coliformes fecais, enterococos e fagos GB-124 em amostras do rio Ouse, sobretudo em pontos de coleta localizados a distâncias menores que 0,5 km até mais de 2,0 km a jusante de estações de tratamento de esgotos e diretamente a jusante de fazendas de gado leiteiro. Em trabalho realizado no período de 2009 a 2011 na mesma bacia, Purnell (2012) também detectou a ocorrência de colifagos somáticos (WG-5) em todos os 26 pontos analisados. Nnane, Ebdon e Taylor (2011), monitorando 16 pontos da bacia do rio Ouse, obtiveram mediana em torno de $5,0 \times 10^3$ UFP/100 mL, com valores máximos entre $4,37 \times 10^4$ e $8,91 \times 10^4$ UFP/100 mL para todas as quatro estações do ano analisadas (os valores se referem aos dados dos 16 pontos agrupados). Nnane, Ebdon e Taylor (2012) novamente constataram concentrações de colifagos somáticos maiores que a de fagos GB-124 em três pontos analisados na bacia Bevern Stream, tanto em período de chuva intensa quanto de tempo seco.

Já os colifagos F-RNA foram detectados em 36% das amostras analisadas (170/476), entretanto em concentrações bem menores que as dos colifagos somáticos. Essa menor ocorrência de colifagos WG-49 com relação à contagem de colifagos somáticos também foi verificada por Sundram, Jumanla e Ehlers (2006), em estudo de uma bacia sul-africana. No presente estudo, as médias das concentrações variaram de valores não detectados (em 22 dos 30 pontos) a 100 UFC/100 mL (apenas no ponto 6), sendo a maior concentração, de $6,5 \times 10^2$ UFP/100mL, detectada nos pontos 7 (*Pellingford Brook*) e 17 (*Bevern Stream Farm*). Nos *box-plots* da Figura 4A (Anexo A), é possível observar a grande variação na detecção de colifagos WG-49, ao longo do período e entre cada ponto monitorado.

Com aplicação do teste de Kruskal-Wallis, observou-se que as variáveis coliformes termotolerantes, enterococos, colifagos somáticos (WG-5) e colifagos F-RNA (WG-49) diferiram, em média, em pelo menos um dos 30 pontos avaliados.

Na Figura 15 estão apresentadas as concentrações médias (log 10) nos pontos de coleta na bacia do rio Ouse de coliformes termotolerantes, enterococos e dos colifagos somáticos (WG-5) e F-RNA (WG-49). Consta-se que os colifagos somáticos apresentaram comportamento similar ao das bactérias indicadoras.

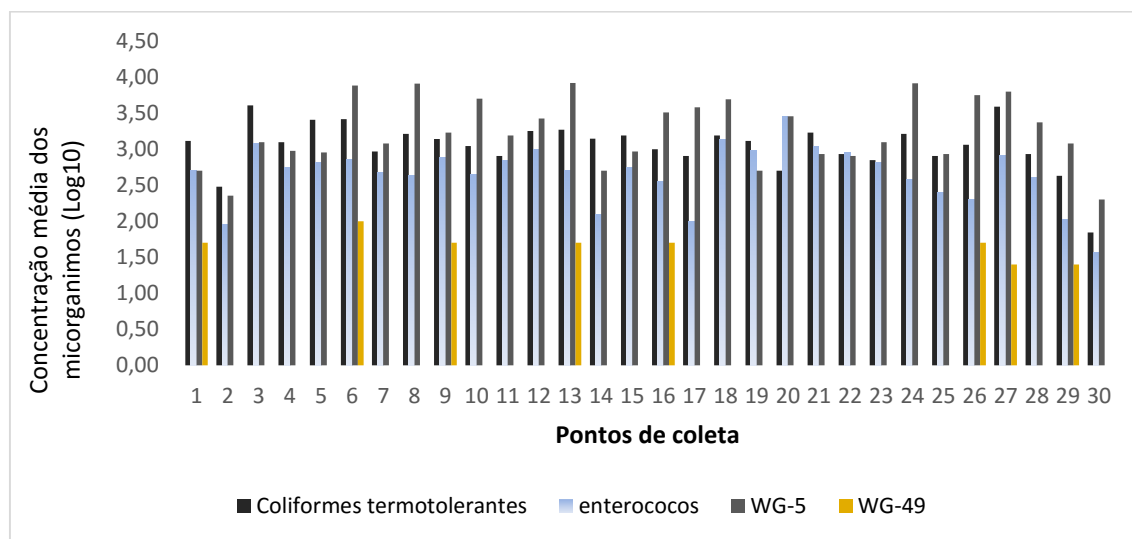


Figura 15 – Concentração média (log 10) de coliformes termotolerantes, enterococos, colifagos somáticos (WG-5) e colifagos F-RNA (WG-49) nos pontos de coleta na bacia do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014.

Esses resultados são consistentes com observações encontradas em outros estudos realizados na mesma bacia hidrográfica (NNANE, 2010) e sugerem que a contaminação fecal verificada na bacia do rio Ouse é, em grande parte, proveniente de fontes animais; isso, porque a bactéria hospedeira WG-5 não é específica de humanos e devido ao fato de a bacia ser predominantemente rural e muitos animais terem acesso livre aos corpos d'água.

Estudos de correlação de Spearman revelaram correlações fortes e positivas entre os colifagos somáticos e as bactérias indicadoras de contaminação fecal (coliformes termotolerantes e enterococos), como pode ser visto na Tabela 19. Correlação significativa entre colifagos somáticos e bactérias indicadoras também foi observada por Nnane, Ebdon e Taylor (2011), ao analisar 16 pontos do rio Ouse. Porém, entre os fagos F-RNA e os indicadores a correlação se mostrou significativa, mas muito fraca ($r_s = 0,091$,

Tabela 18 – Matriz de correlação entre colifagos somáticos (WG-5), colifagos F-RNA (WG-49) e coliformes termotolerantes e enterococos na bacia hidrográfica do rio Ouse. Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014

Coeficiente de correlação de Spearman (rs) e valores de p (entre parênteses)				
Variáveis	WG-5	WG-49	Coliformes Termotolerantes	Enterococos
WG-5	NA	0,070 (0,129)	0,733 (0,000)	0,730 (0,000)
WG-49	0,070 (0,129)	NA	0,091 (0,048)	0,170 (0,020)

Células destacadas em cinza indicam correlação estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$); NA = não se aplica pelo fato de a associação entre as variáveis não fazer sentido.

$p = 0,004$). Não foi verificada correlação significativa entre os colifagos somáticos e os fagos F-RNA.

Apesar da bacia do rio Ouse ser considerada predominantemente rural, existem, em alguns pontos, estações de tratamento de esgoto que lançam seus efluentes total ou parcialmente tratados nos cursos d'água. Para detectar a ocorrência da contaminação fecal humana na bacia foram realizadas análises de detecção de fagos que infectam *Bacteroides fragilis*.

Bacteroides fragilis ganharam reconhecimento como ferramenta de rastreamento de fontes de contaminação fecal por meio de vários estudos que reportaram que essas bactérias apresentam elevada especificidade, mostrando-se adequados para identificação de fontes de contaminação fecal de origem humana em águas superficiais (PAYAN *et al.*, 2005; EBDON; MUNIE; TAYLOR, 2007; REISCHER *et al.*, 2009; KANNAPPAN *et al.*, 2010).

Neste estudo foram utilizados fagos que infectam *B. fragilis*: cepas GB-124 e HB-73. *Bacteroides* GB-124 foram isolados por Payan *et al.* (2005) em amostras de águas residuárias municipais no sudeste da Inglaterra, enquanto HB-73 foram isolados no Hawaii, por Kannappan *et al.* (2010). Entretanto, ainda existem poucos estudos sobre a utilização das cepas HB-73 como indicadoras de contaminação fecal humana e, principalmente, sua aplicabilidade geográfica ainda é questionada.

Um total de 476 amostras de água, coletadas nos pontos selecionados na bacia do rio Ouse, foi analisado ao longo de 12 meses. Os fagos capazes de infectar GB-124 foram detectados e enumerados em 21% das amostras. As concentrações desses fagos foram, em geral, baixas, com médias variando de valores não detectados a

50 UFP/100 mL, sendo os valores máximos observados nos pontos 6 (Scaynes Hill), 13 (Isfield Bridge), 16 (Barcombe Mills) e 24 (Goldbridge), como pode ser observado na Figura 5A (Anexo A). Segundo informações fornecidas pela Agência Ambiental Europeia, existem próximos a esses locais, a menos de 3 km de distância do curso d'água, estações de tratamento de esgoto que despejam seus efluentes parcialmente tratados no sistema fluvial. A estação localizada em *Scaynes Hill* é a maior delas, com equivalente populacional de aproximadamente 38.000 habitantes e que contribui com cerca de 30% das descargas no corpo receptor. A Figura 16 permite a visualização da distribuição espacial de ocorrência dos fagos que infectam GB-124 em toda a bacia hidrográfica e a localização das ETEs existentes na bacia.

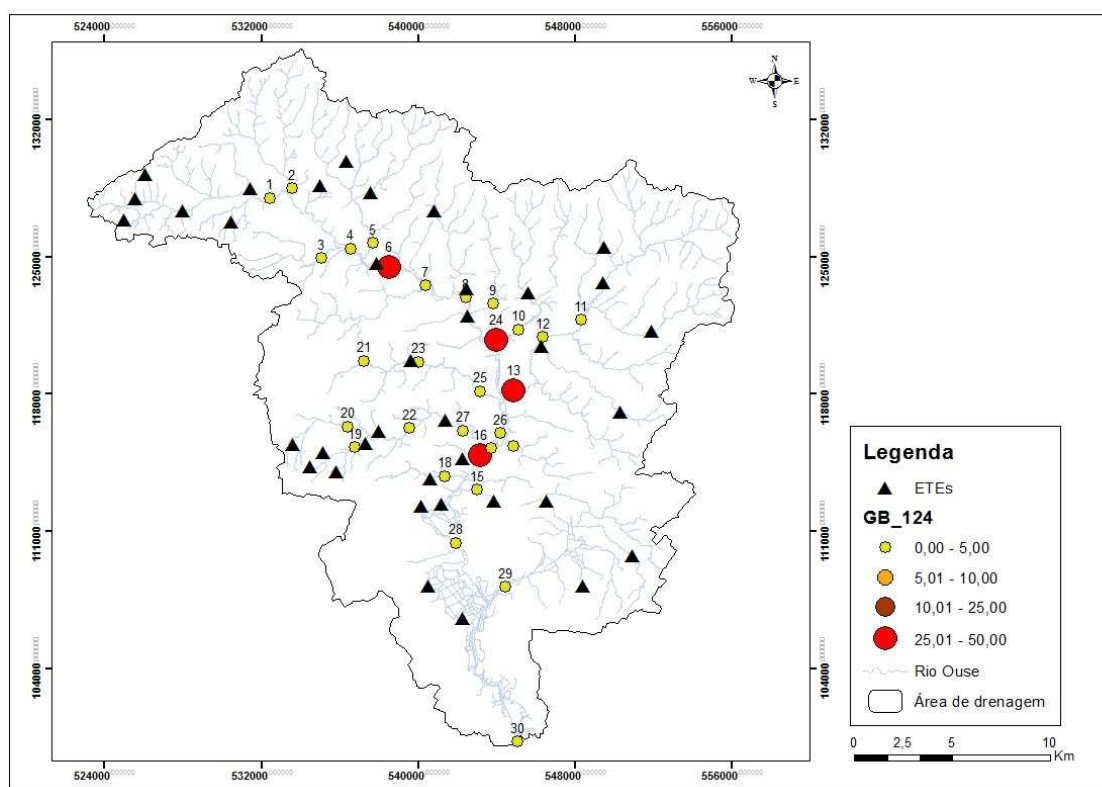


Figura 16 – Concentração média de fagos que infectam GB-124 nos pontos de amostragem e localização das ETEs existentes na bacia do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido.

Esses resultados estão em conformidade com as conclusões de outros pesquisadores (JOFRE *et al.*, 1986; CORNAX *et al.*, 1990; ARMON, 1993; PUIG *et al.*, 1999; EBDON; MUNIE; TAYLOR, 2007; NNANE; EBDON; TAYLOR, 2011). Nesses estudos os níveis de fagos que infectam GB-124 detectados também foram, em geral, baixos e as maiores médias foram observadas nos pontos localizados a jusante de estações de tratamento de esgoto, com contagens máximas de 4,7 log UFP/100 mL.

Fagos que infectam HB-73 foram detectados e enumerados em 41% das 476 amostras analisadas. Os níveis detectados foram maiores que os observados para GB-124, com médias variando entre valores não detectados, em 70% dos pontos avaliados (21 de 30 pontos), e 200 UFP/100 mL (ponto 6). As concentrações apresentaram grande oscilação na maior parte dos pontos (Figura 6A), sendo o valor máximo observado 950 UFP/100 mL, no ponto 13 (*Isfield Bridge*). A distribuição espacial da ocorrência dos fagos que infectam HB-73 detectados ao longo da bacia hidrográfica do rio Ouse, bem como a localização das ETEs existentes podem ser observadas na Figura 17.

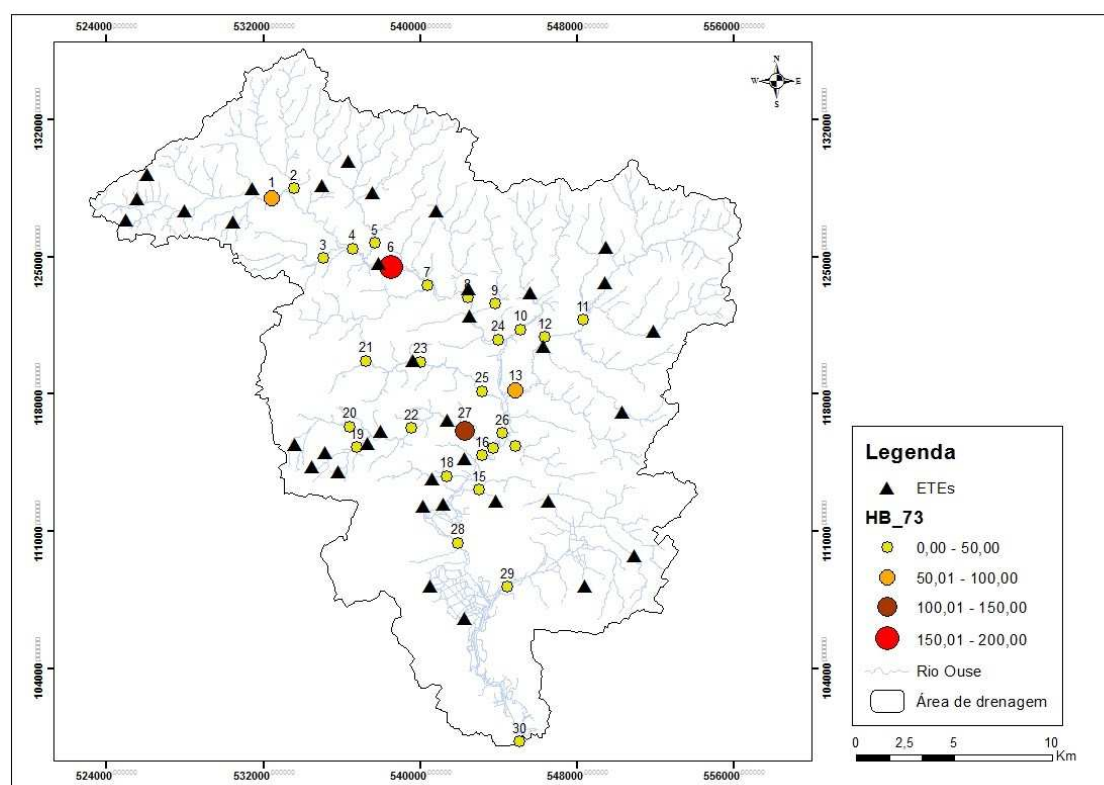


Figura 17 – Concentração média de fagos que infectam GB-124 nos pontos de amostragem e localização das ETEs existentes na bacia do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido.

Também foram realizadas análises de detecção e enumeração de bacteriófagos que infectam *B. fragilis* S-10. A cepa hospedeira S-10 é sugerida como um marcador presuntivo da presença de fezes de suínos, pois resultados iniciais de estudos realizados pela Universidade de Brighton (Ebdon; Taylor, comunicação pessoal) evidenciaram que a cepa (S-10) recupera consistentemente bacteriófagos em matéria fecal proveniente de suínos e em águas residuárias de suinoculturas, mas que não foram detectados em amostras de águas residuárias municipais de tratamento de esgoto no sudeste da Inglaterra e nem em amostras de água do rio a jusante de fazendas onde não existia

criação de suínos. Esse fato ocorreu apesar da presença de altas contagens de coliformes fecais, enterococos e colifagos somáticos nessas amostras. Entretanto, é necessário realizar mais trabalhos para determinar se a estirpe S-10 pode identificar com êxito fontes de contaminação fecal provenientes de suínos fora da área de estudo inicial, pois, conforme já relatado, em amostras de efluentes de suinoculturas coletadas e analisadas em Viçosa- MG não foi possível a detecção de fagos utilizando essas cepas.

Neste estudo foi analisado um total de 356 amostras. Fagos que infectam S-10 foram detectados em 22,7% das amostras, com médias variando de valores não detectados em 29 pontos a 50 UFP/100 mL apenas no ponto 18. Os maiores valores foram observados nos pontos 18 (**Northend Stream**) e 28 (**Lewes**), com contagens de $7,5 \times 10^2$ e $6,5 \times 10^2$ UFP/100 mL, respectivamente (Figura 7A).

Estudos de correlações foram realizados entre os organismos indicadores de contaminação fecal (coliformes termotolerantes e enterococos) e os bacteriófagos que infectam *B. fragilis* (Tabela 20).

Tabela 19 – Matriz de correlação entre bacteriófagos que infectam *B. fragilis* (GB-124, HB-73 e S-10), coliformes termotolerantes e enterococos na bacia hidrográfica do rio Ouse. Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014

Coeficiente de Correlação de Spearman (rs) e Valores de p (entre parênteses)					
Variáveis	GB-124	HB-73	Coliformes termotolerantes	S-10	Enterococos
GB-124	NA	-0,043 (0,352)	0,130 (0,04)	0,029 (0,525)	0,134 (0,04)
HB-73	-0,043 (0,352)	NA	0,091 (0,048)	0,095 (0,462)	0,170 (0,020)
S – 10	0,029 (0,525)	0,095 (0,462)	0,731 (0,016)	NA	0,377 (0,041)

Células destacadas em cinza indicam correlação estatisticamente significativa ($\alpha = 0.05$).

NA = não se aplica pelo fato de a associação entre variáveis não fazer sentido.

A correlação entre os níveis de bactérias indicadoras de contaminação fecal e os níveis de bacteriófagos marcadores humano-específicos dá indício sobre a origem da fonte de contaminação fecal, se humana ou animal, em uma bacia hidrográfica. Se a correlação é alta é mais provável que a fonte dominante é de fezes humanas e vice-versa (REISCHER *et al.*, 2007; AHMED *et al.*, 2008; KIRSCHNER *et al.*, 2009).

O teste de correlação de Spearman realizado entre os fagos que infectam *B. fragilis* (GB-124 e HB-73) e os microrganismos indicadores de contaminação fecal

(coliformes termotolerantes e enterococos) revelou resultados estatisticamente significativos e positivos, entretanto com correlação fraca (Tabela 19). Outro fator importante a ser observado é a correlação estatisticamente significativa entre as bactérias indicadoras de contaminação fecal (coliformes termotolerantes e enterococos) e os fagos S-10 (bactéria hospedeira supostamente específica de suínos). Resultados semelhantes foram observados em estudo realizado por Johnston *et al.* (2010): baixa correlação entre a detecção de biomarcadores de contaminação fecal humana (bacteroides) e a enumeração de *E. coli* e *Enterococcus faecalis*.

Como discutido por Nnane, Ebdon e Taylor (2011), essa fraca correlação sugere que apenas uma pequena parcela das bactérias indicadoras encontradas na bacia pode ser atribuída a material fecal humano. A baixa concentração ou ausência de fagos GB-124, específicos de humanos, em amostra com elevada concentração de coliformes termotolerantes e enterococos, pode ser considerada um indicativo de prevalência de fontes fecais não humanas na contaminação desses corpos hídricos. A alta especificidade desse bacteriófago foi observada por Ebdon, Munie e Taylor (2007), em pesquisa realizada na bacia do rio Ouse. Os fagos que infectam GB-124 não foram detectados em nenhuma das 30 amostras não humanas coletadas para estudo, as quais eram compostas por uma mistura de fezes de gado, cavalos, porcos, aves, coelhos e ovelhas. A ausência desses bacteriófagos humano-específicos ocorreu em contraste com elevadas concentrações de bactérias indicadoras, como coliformes fecais e enterococos (9,08 e 7,92 log₁₀ CFU/100 ml, respectivamente). Essas referências endossam a hipótese de que nos pontos analisados neste estudo a contaminação fecal possa ser predominantemente de origem não humana, sobretudo por se tratarem de estudos realizados na mesma bacia e a partir da mesma cepa hospedeira.

Ebdon, Munie e Taylor (2007) detectaram ainda que as contagens de todos os organismos indicadores testados, mais expressivamente os fagos GB-124, apresentam redução à medida que o ponto de amostragem se distancia das possíveis fontes de introdução do material fecal no curso d'água. Nesse caso, quanto mais distante de estações de tratamento de esgotos menores foram as concentrações de indicadores (coliformes, enterococos, WG-5 e GB-124) detectadas. Assim, variações nas concentrações desses indicadores, sobretudo dos fagos GB-124, podem ser devido às distribuições espaciais das fontes poluidoras, bem como à sua distância dos pontos de amostragem.

Também foi realizado estudo de correlação de Spearman entre os fagos que infectam *B. fragilis* e os colifagos somáticos (WG-5) e F-RNA (WG-49) (Tabela 21).

Tabela 20 – Matriz de correlação entre os bacteriófagos que infectam *B. fragilis* (GB-124, HB-73 e S-10) e os colifagos somáticos (WG-5) e F-RNA (WG-49) na bacia hidrográfica do rio Ouse. Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014

Coeficiente de Correlação de Spearman (rs) e Valores de p (entre parênteses)		
Variáveis	WG-5	WG-49
GB-124	0,129 (0,070)	0,259 (0,120)
HB-73	0,536 (0,028)	0,240 (0,000)
S – 10	0,878 (0,07)	0,529 (0,073)

Células destacadas em cinza indicam correlação estatisticamente significativa ($\alpha = 0.05$).

Observa-se que os fagos GB-124 não apresentaram correlação significativa com os colifagos somáticos, o que já era esperado uma vez que as cepas WG-5 não são específicas para humanos, como mencionado anteriormente. Este resultado reforça que, embora existam fontes de contaminação fecal tanto humana quanto animal, a maior contribuição da contaminação fecal na bacia é proveniente de animais. Esta observação é reforçada pela correlação positiva, elevada e significativa entre bacteriófagos que infectam S-10 e colifagos somáticos (WG-5).

As correlações estatisticamente significantes e positivas observadas entre HB-73 e colifagos (WG-5 e WG-49) sugerem que os elevados níveis de HB-73 nas amostras analisadas podem não ser resultado somente de contaminação fecal humana, alertando mais uma vez para a instabilidade geográfica na utilização de cepas *Bacteroides fragilis* em estudo de rastreamento de fontes de contaminação fecal em águas superficiais.

Considerando as diferentes características da área de estudo, principalmente em relação ao número de animais existentes, e para melhor identificar as fontes de contaminação fecal, estudos de correlações entre os organismos indicadores de contaminação fecal, fagos e o número de animais presentes foram realizados por subárea (ponto de amostragem), em nível de 10% de significância.

Na Tabela 22 estão os dados de o número de animais presentes em cada subárea (pontos amostrados) da bacia hidrográfica do rio Ouse, de acordo com informações fornecidas pelo Agricultural Census, em 2012. Observa-se que a maior população de

Tabela 21 – Número de animais presentes nas proximidades dos pontos de coleta, bacia de captação do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido

Pontos de Amostragem	Bovinos	Ovelhas	Suínos	Total
1 - Upper Ryelands Bridge	930	0	0	930
2 - Shell Brook	702	10	0	712
3 - Scrase Stream	97	0	30	127
4 - East Mascalls	97	0	30	127
5 - Cockhaise Brook	1.573	1	10	1.584
6 - Scaynes Hill	10	50	0	60
7 - Pellingford Brook	243	0	1	244
8 - Fletching Mill Bridge	4.853	8	377	5.238
9 - Searles Lake Stream	127	9	9	145
10 - Shortbridge	342	2	58	402
11 - Hempstead Lane	2.634	9	12	2.655
12 - River Uck	3.087	18	92	3.197
13 - Isfield Bridge	3.228	18	115	3.361
14 - Iron River	15	0	0	15
15 - Northlington Stream	39	0	0	39
16 - Barcombe Mills	11.948	39	600	12.587
17 - Bevern Stream Farm	11.591	2	6	11.599
18 - Northend Stream	166	0	900	1.066
19 - East Chiltington	52	0	0	52
20 - Station Road Plumpton	357	2	6	365
21 - Plumpton Road	195	0	21	216
22 - Bevern Bridge	1.458	2	6	1.466
23 - Coppards Bridge	750	0	31	781
24 - Goldbridge	5.223	17	386	5.626
25 - Longford Stream	750	0	31	781
26 - Anchor	1.352	37	584	1.973
27 - Bevern Stream	1.591	2	6	1.599
28 - Lewes	3.209	39	609	3.857
29 - Glynde	4.355	2	12	4.369
30 - Newhaven	215	41	782	1.038

animais é de bovinos, seguida de suínos e ovelhas. Cabe ressaltar que foi verificada a presença de animais selvagens na área de estudo, principalmente veados, entretanto o número dessa população não foi considerado.

Conforme pode ser observado na Tabela 21, há uma grande variação no número de animais presentes em cada subárea, devendo ser ressaltado que o total de animais na bacia como um todo é de 61.189 bovinos (92,42%), 308 ovelhas (0,47%) e 4.714 suínos (7,12%). Há, portanto, expressiva predominância de bovinos na área de estudo, sendo os pontos 16 e 17 aqueles com rebanhos mais representativos (acima de 11.000 animais).

Na Tabela 23 constata-se que somente os colifagos somáticos (WG-5) apresentaram correlação significativa ($r_s = 0,59$ e $p = 0,04$) com o número de bovinos existentes na bacia do rio Ouse. Essa correlação positiva, porém, de intensidade moderada, indica que em boa parte dos casos a ocorrência de colifagos somáticos pode estar atrelada à presença de fezes de bovinos carregadas para os corpos hídricos da bacia. Ebdon, Munie e Taylor (2007) observaram que a contagem de colifagos somáticos (WG-5), bem como de coliformes fecais e enterococos, foi maior nas amostras de água de rio coletadas diretamente a jusante de fazendas de criação de gado leiteiro, superando as contagens em pontos a jusante de estações de tratamento de esgoto. Da mesma forma, nas amostras coletadas a distâncias menores que 0,5 a maiores que 2,0 km das estações de tratamento de esgoto a predominância de indicadores foi de colifagos somáticos. Segundo Nnane, Ebdon e Taylor (2012), a sub-bacia Bevern Stream (ponto 17 neste estudo) possui grande variedade de uso da terra, sendo os principais a agricultura e as pastagens, mas com presença de estações de tratamento de esgoto contribuindo com material fecal nesse ponto. Ressaltam ainda que na área de estudo o gado pasta livremente no campo, principalmente nos meses de verão, podendo inclusive acessar diretamente as águas em regiões não cercadas. As fezes depositadas no entorno ou mesmo diretamente na água do Bevern Stream são carregadas no período de chuva, aumentando a presença predominante de organismos indicadores não humanos nesses pontos analisados. Ao contrário, as baixas concentrações de fagos humano-específicos (GB-124) em períodos de chuva nessa sub-bacia são atribuídas pelos autores como decorrentes da diluição no efluente das estações de tratamento de esgoto.

Bacteriófagos que infectam *B. fragilis* (S-10) apresentaram correlação estatisticamente significativa e forte com o número de suínos ($r = 0,79$ $p = 0,05$), confirmando o resultado de Ebdon e Taylor (comunicação pessoal) de que há alta especificidade da cepa S-10 com material fecal suíno. Ao analisar a Figura 7A, é possível verificar que os pontos com maiores concentrações de fagos S-10 coincidem com os locais onde há elevada quantidade de suínos, informação confirmada pelo coeficiente de correlação.

A correlação moderada entre WG-5 e o número de bovinos, assim como entre S-10 e suínos, e as elevadas concentrações de coliformes e enterococos permitem supor que todas as sub-bacias analisadas estão impactadas por material fecal, podendo a maior parte dessa contaminação ser atribuída à presença de fezes animais, principalmente bovinos e suínos, e nos pontos com maior ocorrência de fagos GB-124, à presença de

fezes humanas provenientes das estações de tratamento de esgoto situadas no entorno dos pontos analisados.

Tabela 22 – Matriz de correlação entre os organismos indicadores de contaminação fecal, colifagos somáticos (WG-5) e F-RNA (WG-49), bacteriófagos que infectam *B. fragilis* (GB-124, HB-73 e S-10) e o número de animais (bovinos, ovelhas e suínos) na bacia hidrográfica do rio Ouse. Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014

Variáveis	Coeficientes de Spearman (rs) e Valores de p (entre parênteses)		
	Número de Animais		
	Bovinos	Ovelhas	Suínos
Coliformes termotolerantes	-0,15 (0,40)	-0,18 (0,35)	-0,22 (0,90)
Enterococos	-0,05 (0,79)	-0,32 (0,39)	-0,14 (0,50)
Colifagos somáticos (WG-5)	0,59 (0,04)	0,79 (0,63)	0,15 (0,42)
F-específicos (WG-49)	0,13 (0,51)	0,21 (0,27)	-0,07 (0,70)
Fagos que infectam GB-124	0,78 (0,34)	0,068 (0,130)	0,15 (0,42)
Fagos que infectam HB-73	0,122 (0,04)	0,26 (0,12)	0,23 (0,03)
Fagos que infectam S-10	-0,145 (0,61)	-0,29 (0,12)	0,78 (0,05)

Foram verificadas correlações estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os níveis de fagos que infectam HB-73 e o número de bovinos e suínos presentes na área da bacia do rio Ouse, fortalecendo a não humano-especificidade desta cepa de *B. fragilis*.

Pode-se concluir, com base nos resultados obtidos neste estudo, que a quantificação de bacteriófagos e bactérias indicadoras e a análise do uso e da ocupação do solo na bacia fornecem um consistente perfil de contaminação das águas, o que permite traçar novos objetivos de investigação e mitigação da poluição fecal nessas áreas. Os colifagos somáticos se mostraram bons indicadores de contaminação fecal, uma vez que apresentaram correlação forte e comportamento similar ao das bactérias comumente utilizadas para este fim. Os colifagos GB-124 foram eficazes na detecção de contaminação fecal de origem humana, auxiliando na triagem de fontes de contaminação não pontuais de origem animal. Por fim, os fagos S-10 mostraram eficácia na detecção de fontes de poluição fecal de origem suína, representando um método simples de rastreamento de contaminação fecal em locais onde há presença de criadouros desses animais.

5.2.3. Genotipagem de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

No período de agosto de 2013 a janeiro de 2014 foram avaliadas 54 amostras de água superficial, coletadas em nove pontos localizados na bacia hidrográfica do rio Ouse (1 = Upper Ryelands Bridge; 6 = Scaynes Hill; 7 = Pellinford Brook; 12 = River Uck; 16 = Barcombe Mills; 25 = Longford Stream; 27 = Bevern Stream; 29 = Glynde Reach; e 30 = Newhaven). Do total de amostras analisadas por microscopia de imunofluorescência, foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* em 19 (35%) e cistos de *Giardia* em quatro amostras (7%). Nas Figuras 18 e 19 se apresentam a estatística descritiva dos dados de quantificação de cistos de *Giardia* e de oocistos de *Cryptosporidium*, respectivamente.

Cistos de *Giardia* sp. foram detectados somente nos pontos 6, 25, 27 e 29 (Figura 18), com médias variando de 0,04 a 0,42 cisto/L. O valor máximo detectado foi de 2,5 cistos/L na amostra coletada no ponto 6 (*Scaynes Hill*), em agosto de 2013. No geral, Scaynes Hill apresentou quantidade maior de cistos de *Giardia*, o que pode ser consequência da presença da estação de tratamento de esgotos de Scaynes Hill, que, de acordo com Nanne (2010), pode contribuir com 30% das descargas de efluentes realizados no rio Ouse. A prevalência de indivíduos com exame de fezes positivo para esse parasita é de 2 a 5% em países desenvolvidos e de 20 a 30% em países em desenvolvimento (ALMEIDA *et al.*, 2006). Portanto, o lançamento de esgotos sanitários tem sido considerado uma das principais fontes de cistos de *Giardia* em água, uma vez que tratamentos tradicionais de esgotos podem não remover totalmente essas estruturas (CACCIÒ, 2005; SAVIOLI; SMITH; THOMPSON, 2006; CASTRO-HERMIDA *et al.*, 2008).

Na Figura 19 se pode observar que durante o período analisado não foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* nos pontos de coleta 1, 12 e 30. Nos demais pontos foram detectados com densidades variando de 0,0 a 3,0 oocistos/L, sendo o maior valor encontrado em amostra coletada no ponto 29 (*Glynde Reach*) em outubro de 2013.

Ampla variação de ocorrência e quantidade de *Cryptosporidium* spp. também foi observada em outros estudos (KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007; MONS *et al.*, 2009; GALVÁN *et al.*, 2014; LALANCETTE *et al.*, 2014). Na Espanha, por exemplo, Galván *et al.* (2014) registraram oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas recreacionais com concentrações variando de valores não detectados a 3,4 oocistos/L.

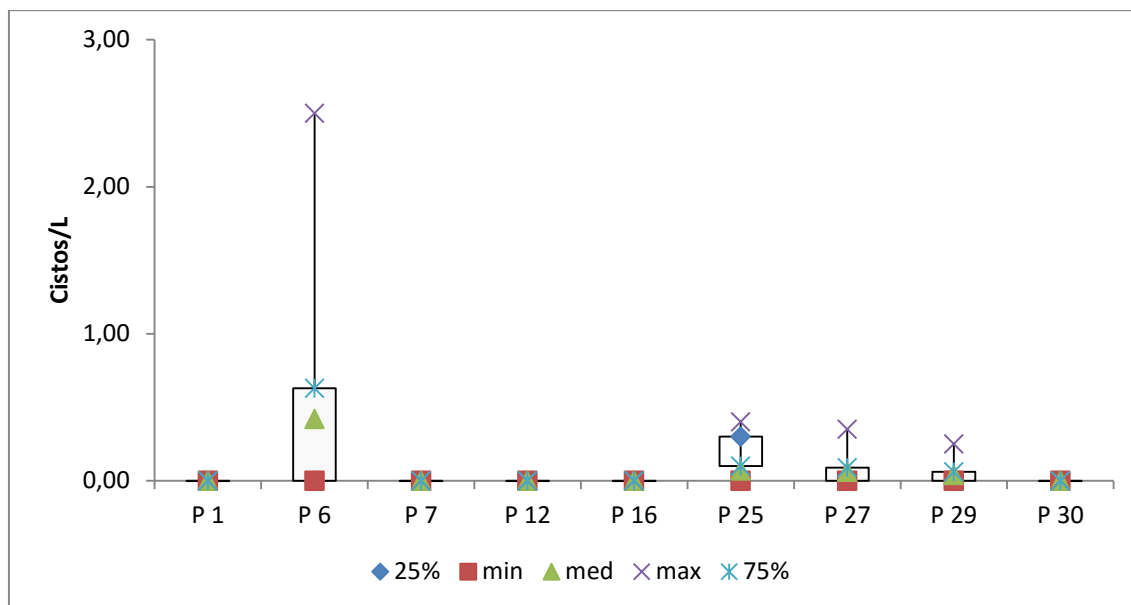


Figura 18 – Estatística descritiva das concentrações de cistos de *Giardia* nos pontos amostrados na bacia hidrográfica do rio Ouse, Reino Unido, agosto de 2013 a janeiro de 2014.

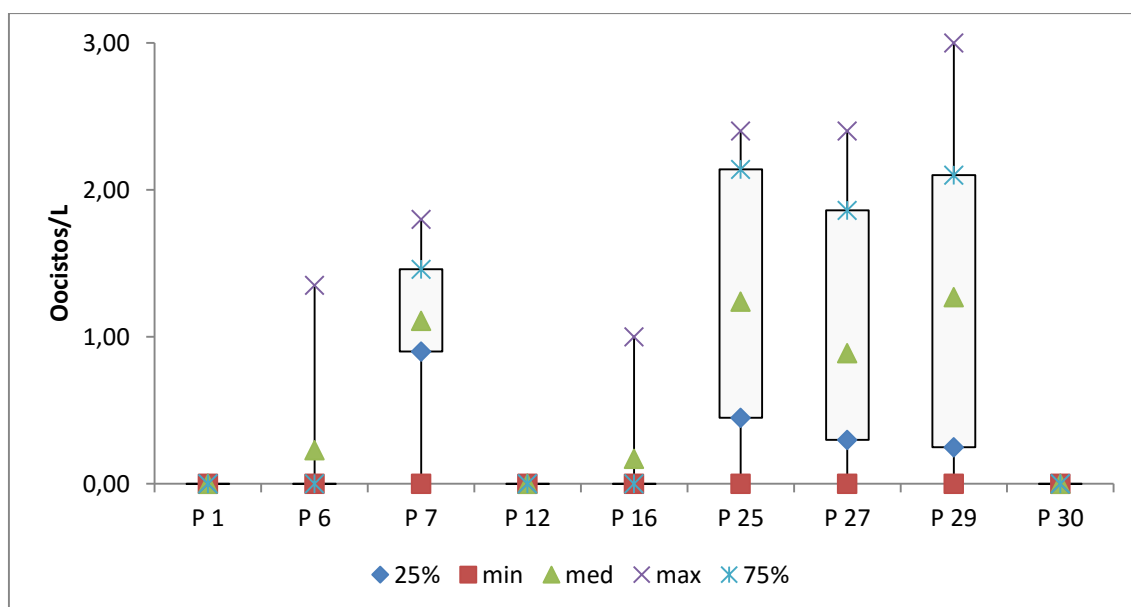


Figura 19 – Estatística descritiva das concentrações de oocistos de *Cryptosporidium* nos pontos amostrados na bacia hidrográfica do rio Ouse, Reino Unido, agosto de 2013 a janeiro de 2014.

Esta variação pode estar associada com a ocorrência de chuva e com o escoamento de solos contaminados, como foi demonstrado por Lalancette *et al.* (2014) em amostras coletadas no ponto de captação de água para consumo no Canadá.

Estudos de prevalência indicam que mais de 50% das águas superficiais do Reino Unido podem estar contaminadas por *Cryptosporidium*, com densidades variando de

0,006 a 1,36 oocisto/L (SMITH; ROSE, 1998). *Cryptosporidium* foi o agente causador em 69% dos 89 casos de doenças infecciosas intestinais ocorridos na Inglaterra e no País de Gales entre 1992 e 2005, sendo a maioria desses surtos atribuídos à contaminação de águas superficiais por material fecal humano e animal (SMITH *et al.*, 2006). Estima-se que no mundo são lançados aproximadamente $3,0 \times 10^{17}$ oocistos de *Cryptosporidium* por ano, com números semelhantes entre lançamentos pontuais (esgoto) e não pontuais (chuva) (HOFSTRA *et al.*, 2013).

A utilização de ferramentas moleculares tem permitido a diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* encontradas em amostras de água, o que auxilia no rastreamento das fontes de contaminação fecal e a avaliação de riscos à saúde pública. Nesse sentido, as 19 amostras confirmadas como positivas para oocistos de *Cryptosporidium* por microscopia de imunofluorescência foram submetidas à caracterização molecular,

O resultado da quantificação do DNA extraído, bem como as concentrações de oocistos/L e suas respectivas datas de coleta, estão apresentados na Tabela 24. Como pode ser constatado, a quantificação do DNA extraído foi baixa, sendo 0,839 ng/μL a maior concentração (amostra coletada no ponto 29, *Glynde Reach*, em 14/10/2013), enquanto a quantidade de DNA extraído no controle positivo foi 1,14 ng/μL. Novamente verificou-se que nas amostras onde a concentração de oocistos de *Cryptosporidium* foi menor que 1 oocisto/L não foi possível mensurar a quantificação de material genômico extraído, o que confirma a baixa sensibilidade do método de extração utilizado. Mesmo assim, todas as amostras foram submetidas à reação de *Nested-PCR*, utilizando o conjunto de iniciadores correspondentes à subunidade menor do gene *18S rRNA*.

Somente em cinco amostras, 26% do total (5/19), constatou-se a banda em gel de agarose do fragmento esperado de aproximadamente 826 pares de bases. Os resultados de amplificação positiva pela *Nested-PCR* foram obtidos nas amostras referentes aos pontos de coleta 27 – *Bevern Stream* (14/10/2013), 25 – *Longford Stream* (05/08 e 11/11/2013) e 29 – *Glynde Reach* (11/11 e 14/10/2013) (Figuras 20, 21 e 22).

Foi possível observar que nos pontos de coleta onde foi detectado o maior número de oocistos a quantidade de DNA extraído foi maior, portanto acredita-se que o baixo número de oocistos presentes em amostras de água superficiais comprometeu a amplificação por PCR.

Tabela 23 – Resultados obtidos na detecção de oocistos por microscopia de imunofluorescência e quantificação de DNA (Qubit) nas amostras positivas, com as respectivas datas de coleta

Amostras	Data da Coleta	Oocistos/L	Quantidade de DNA (ng/μL)
B1 - Ponto 7	11/11/2013	0,80	< limite de detecção
B2 - Ponto 27	09/12/2013	0,60	< limite de detecção
B3 - Ponto 27	16/09/2013	0,40	< limite de detecção
B4 - Ponto 25	06/01/2013	0,70	< limite de detecção
B5 - Ponto 16	06/01/2013	1,00	0,140
B6 - Ponto 29	16/09/2013	1,00	0,160
B7 - Ponto 7	09/12/2013	1,20	0,150
B8 - Ponto 7	14/10/2013	1,35	0,180
B9 - Ponto 29	11/11/2013	2,40	0,472
B10 - Ponto 29	06/01/2013	1,20	0,170
B11 - Ponto 6	05/08/2013	1,35	0,244
B12 - Ponto 25	05/08/2013	2,40	0,760
B13 - Ponto 7	06/01/2013	1,50	0,350
B14 - Ponto 27	11/11/2013	1,80	0,252
B15 - Ponto 7	16/09/2013	1,80	0,351
B16 - Ponto 27	14/10/2013	2,25	0,358
B17 - Ponto 25	11/11/2013	2,40	0,392
B18 - Ponto 29	14/10/2013	3,00	0,839
B19 - Ponto 27	05/08/2013	2,25	0,398

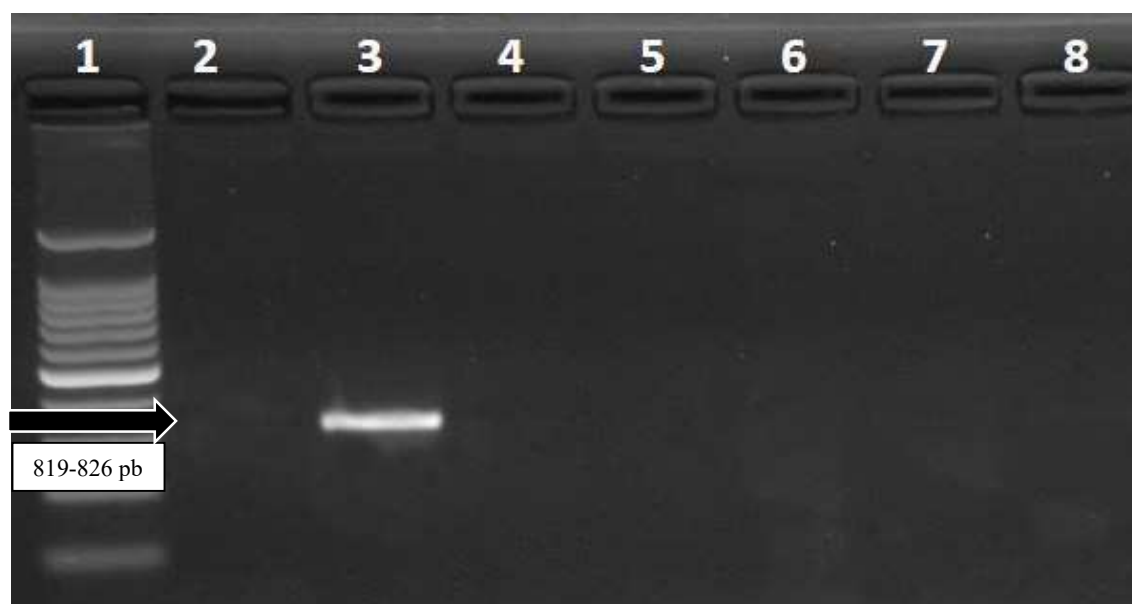


Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando os produtos da amplificação pela Nested-PCR. 1 = marcador molecular 1 Kb ladder; 2 = controle negativo; 3 = controle positivo; e 4-8 = amostras B1, B2, B3, B4 e B5. A seta indica a posição do fragmento esperado na amplificação (819-825 pb).

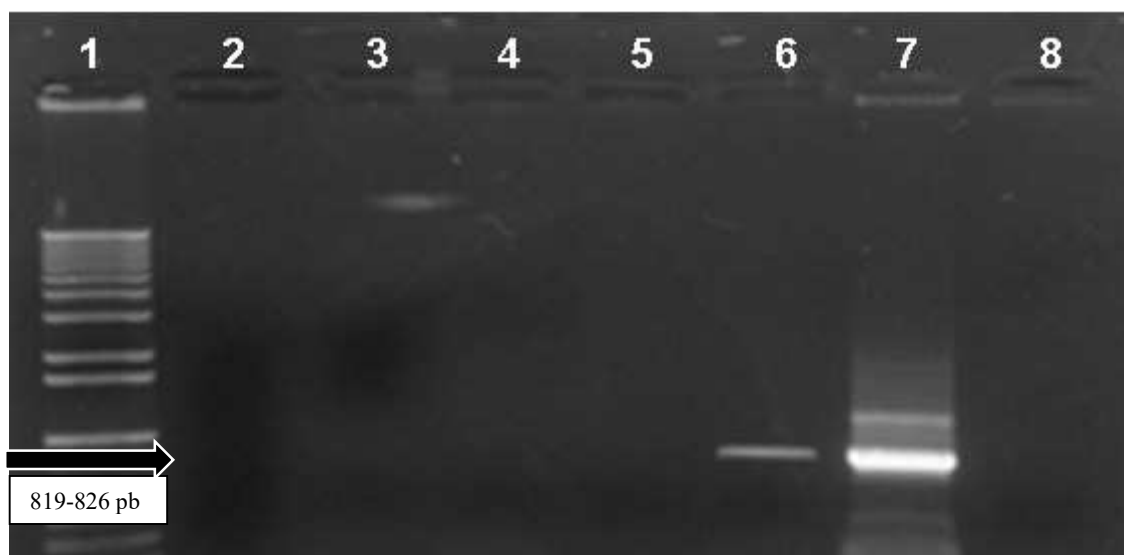


Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando os produtos da amplificação pela Nested-PCR. 1 = marcador molecular 1 Kb ladder; e 2-8 = amostras B6, B7, B8, B9, B10, B11 e B12. A seta indica a posição do fragmento esperado na amplificação (819-825 pb).

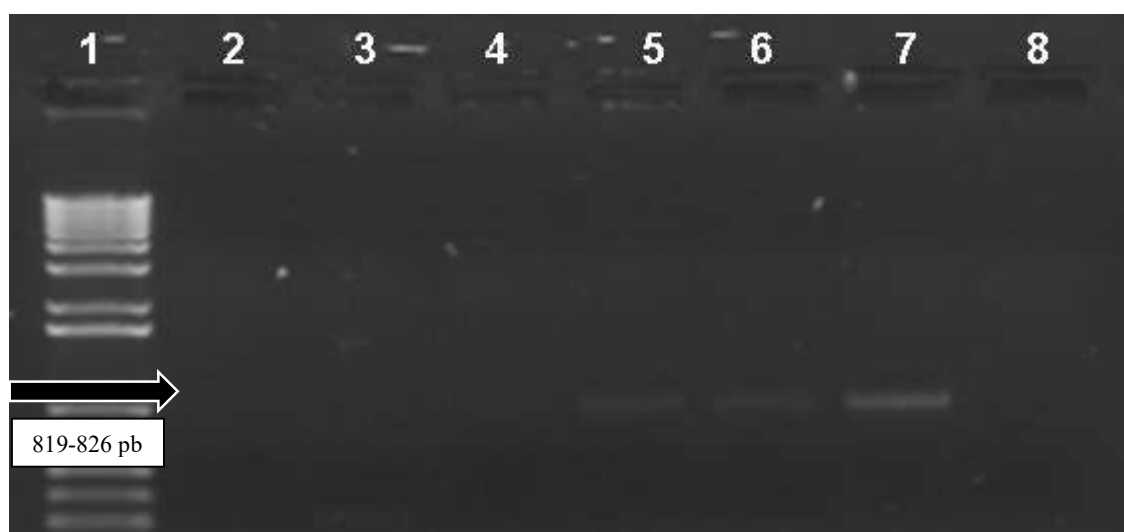


Figura 22 – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) mostrando os produtos da amplificação pela Nested-PCR. Poço 1 = marcador molecular 1 Kb ladder; poços 2-8 = amostras B13, B14, B15, B16, B17, B18 e B19. A seta indica a posição do fragmento esperado na amplificação (819-825 pb).

Jellison, Hemond e Schauer (2002) relataram a ocorrência de *Cryptosporidium* em 34 amostras de água superficial com 15% de positividade, utilizando a mesma técnica (Nested-PCR). Xiao *et al.* (2001) encontraram 45% de positividade nas amostras (25/55) de águas superficiais em Milwaukee, EUA. Esses relatos corroboram os resultados aqui verificados, uma vez que somente um fragmento foi amplificado.

Os produtos amplificados que apresentaram bandas visíveis em gel de agarose foram, então, submetidos ao sequenciamento. No entanto, somente para a amostra coletada no ponto 29 (14/10/2013) foi obtido fragmento de DNA com tamanho e qualidade confiáveis para análise, aproximadamente 820 pares de bases.

O sequenciamento das amostras resultou em perfis compatíveis, com 99% de similaridade, com a espécie *Cryptosporidium parvum*, quando comparadas a sequências homólogas disponíveis no banco de dados GenBank (Figura 23).

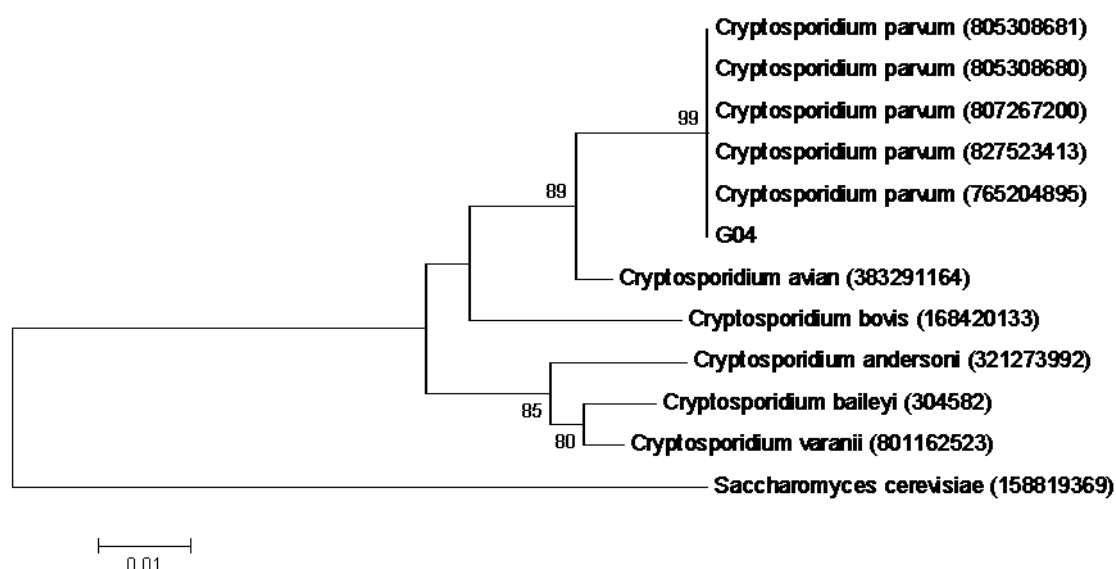


Figura 23 – Árvore filogenética baseada no método *neighbor-joining*, utilizando a sequência parcial do gene 18S RNAr (186 pb) de diferentes espécies de *Cryptosporidium*. O número entre parênteses indica o *GenBank Identifier* da sequência. Os números próximos aos ramos representam a porcentagem em que os taxa se agruparam no teste de *Bootstrap* após 1.000 simulações. *Saccharomyces cerevisiae* (158819369) foi usado como *outgroup*.

A respeito do *Cryptosporidium parvum*, registra-se que esta é a espécie de apresenta a maior prevalência dentre as mais frequentemente identificadas em estudos epidemiológicos no continente europeu (SAVIOLI; SMITH; THOMPSON, 2006; XIAO, 2010; REN *et al.*, 2012). É também de ser registrar que os primeiros estudos em que diversidade de espécies/genótipos de *Cryptosporidium* em águas superficiais foi determinada indicaram as fezes de gado como a principal fonte de contaminação da água (XIAO, 2010; RYAN; POWER, 2012). *Cryptosporidium parvum* foi também identificado em amostras de água na costa leste dos EUA, em estudo realizado por Xiao *et al.* (2001), em amostras de águas superficiais em Massachusetts, EUA (JELLISON; HEMOND; SCHAUER, 2002), em águas superficiais na Alemanha, na Suíça (WARD *et*

al., 2002) e na Irlanda (LOWERY *et al.*, 2001). Ainda, *C. parvum* foi responsável por 61,5% dos casos de criptosporidiose em uma cidade rural do Reino Unido (McLAUHLIN *et al.*, 2000).

No presente estudo, não houve correlação positiva entre a ocorrência de *Cryptosporidium* e o número de animais presentes na bacia hidrográfica. Contudo, algumas características dos pontos onde foram realizadas as coletas podem ter favorecido a presença dessa espécie, como, por exemplo, o elevado número de bovinos (aproximadamente 4.355 animais) na área de Glynde Reach (ponto 29). A bacia do rio Ouse como um todo é de ocupação prioritariamente rural, sendo que apenas 7% da área da bacia hidrográfica é urbanizada (USEPA, 2005). O uso do solo e as atividades desenvolvidas na bacia hidrográfica, dependendo de sua natureza, podem se caracterizar em importante, ou até mesmo a mais importante fonte de contaminação fecal, como relatado por Schreiber *et al.* (2015). Hansen e Ongerth (1991) também constataram que a concentração de oocistos foi consideravelmente maior no ambiente aquático de áreas que recebiam influência de fazendas de gado bovino.

Mesmo sem correlação significativa, o número de animais pode ter contribuído com a concentração de *Cryptosporidium* nas amostras dos pontos 12, 25, 27 e 29. O resultado do sequenciamento, com a identificação de *Cryptosporidium parvum* no ponto 29, indica a possibilidade de que a contaminação fecal encontrada nesses pontos seja de origem animal, no caso de rebanhos de bovinos. Essa hipótese é reforçada pelos resultados das análises de bacteriófagos, que apresentaram concentrações mais elevadas nesse mesmo ponto.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo revelou informações importantes relativas à qualidade parasitológica da água das bacias hidrográficas analisadas, possibilitando inferências sobre as principais fontes de contaminação fecal.

De acordo com o estudo de rastreamento de fontes de contaminação fecal na bacia hidrográfica do ribeirão São Bartolomeu, pode-se concluir que:

- os colifagos (somáticos e F-específicos) não se mostraram indicadores adequados de contaminação fecal em águas superficiais, uma vez que não houve correlação com organismos tradicionalmente utilizados para este fim (*E. coli* e enterococos);

- a utilização de *Bacteroides fragilis* para detectar fagos de fontes fecais não se mostrou viável, sugerindo que existam limitações geográfica que comprometem esta aplicação;

- a ocorrência de colifagos e de bactérias indicadoras de contaminação fecal pode estar relacionada ao uso e ocupação do solo nas sub-bacias analisadas;

- os resultados de ocorrência de *Cryptosporidium* nas sub-bacias do Ribeirão São Bartolomeu sinalizam potencial risco à saúde humana, sendo que a variável “densidade de número de animais” é a que parece melhor explicaria a ocorrência de oocistos na água;

- a detecção de *C. parvum* demonstrou a importância da presença de bovinos na bacia hidrográfica na disseminação deste protozoário no ambiente e a consequente dispersão nos cursos d'água da bacia do RSB; e

- a amplificação de amostras positivas pela Nested-PCR pode ter sido comprometida pela contaminação com substâncias presentes na água que favorecem a inibição da reação e também pelo número reduzido de oocistos presentes no ambiente; esses fatores reforçam a importância da realização da etapa de purificação das amostras por meio da técnica de separação imunomagnética e a necessidade da concentração de maiores volumes de água.

Por sua vez, sobre a bacia hidrográfica do rio Ouse pode-se concluir que:

- durante todo o período de monitoramento foram detectados colifagos somáticos (WG-5) em concentrações mais elevadas, quando comparadas com as concentrações de coliformes termotolerantes e enterococos, em todos os pontos de coleta ao longo da bacia;

- não foram detectadas correlações fortes e positivas entre a ocorrência de colifagos somáticos e as bactérias indicadoras de contaminação fecal;

- os colifagos F-RNA foram detectados em 36% das amostras analisadas, em concentrações bem menores que as dos colifagos somáticos (100%);

- as cepas GB-124 se mostraram mais propícias para detecção de fontes de contaminação humana; os fagos capazes de infectar GB-124 foram detectados em 21% das amostras, sendo que as maiores médias foram observadas nos pontos localizados a jusante de estações de tratamento de esgoto, indicando a presença de contaminação fecal de origem humana;

- os fagos que infectam HB-73 foram detectados em 41% das amostras e, embora concentrações elevadas tenham sido constatadas em pontos localizados a jusante de ETEs, também foi observada concentrações elevadas em pontos localizados próximos a fazendas de criação intensiva de animais, indicando, portanto, contaminação de origem não humana;

- a cepa S-10 de bacteriófagos que infectam *B. fragilis* se mostrou um bom indicador de contaminação fecal de origem animal, mais especificamente de suínos;

- houve correlação estatisticamente significativa, porém fraca, entre os níveis de bactérias indicadoras de contaminação fecal e os níveis de marcadores humano-específicos (GB-124 e HB-73), evidenciando que apenas uma pequena parcela das bactérias indicadoras encontradas na bacia pode ser atribuída a contaminação por material fecal humano;

- os colifagos somáticos (WG-5) apresentaram correlação significativa com o número de bovinos existentes na bacia do rio Ouse, indicando que em boa parte dos casos a ocorrência de colifagos somáticos pode estar atrelada à presença de fezes de bovinos carregadas para os corpos hídricos da bacia;

- para genotipagem de *Cryptosporidium* foram constatadas as mesmas dificuldades encontradas e já mencionadas para as análises na bacia RSB, ou seja, dificuldade de ruptura da parede dos oocistos e pouca amplificação das amostras; e

- a espécie *C. parvum* foi identificada com 99% de similaridade, o que reforça a hipótese de que a presença de animais na bacia é a principal fonte de contaminação fecal observada nessa área.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDON, Stephen T.; HYMAN, Paul; THOMAS, Cameron. Experimental examination of bacteriophage latent-period evolution as a response to bacterial availability. *Applied and environmental microbiology*, v. 69, n. 12, p. 7499-7506, 2003.

ABEDON, Stephen. *Bacteriophage ecology*. Population growth, evolution, and impact of bacterial viruses. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. p. 508.

ACKERMANN, H.-W. Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. *Adv. Virus Res.*, v. 51, p. 135-201, 1999.

ACKERMANN, H.-W.; PRANGISHVILI, D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Archives of Virology*, v. 157, p. 1843-1849, 2012.

AHMED, W.; STEWART, J.; POWELL, D.; GARDNER, T. Evaluation of bacteroides markers for the detection of human faecal pollution. *Letters of Applied Microbiology*, v. 46, p. 237-242, 2008.

ALM, E. W.; BURKE, J.; SPAIN, A. Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches. *Water Research*, v. 37, p. 3978-3982, 2003.

ALMEIDA, T. T. C. *Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de Cryptosporidium spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase)*. 2004. 143 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, 2004.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20. ed. Washington, DC: APHA, AWWA, WEF, 1998.

ANON. ISO 10705-2. *Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages*. Part 2: Enumeration of somatic coliphages, International Organization for Standardization, Geneva, 1998a.

ANON (2001b). ISO 10705-4. *Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages-Part 4: Enumeration of bacteriophages infecting Bacteroides Fragilis*. International Organization for Standardization, Geneva,

ANON (2000c). ISO 10705-2. *Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages-Part 2: Enumeration of somatic coliphages*. International Organization for Standardization, Geneva,

APEELBEE, A. J.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M. E. Giardia and Cryptosporidium in mammalian wildlife – Current status and future needs. *Trends in Parasitology*, v. 21, p. 371- 376, 2005.

ARAUJO, A. J. U. S.; KANAMURA, H. Y.; ALMEIDA, M. E.; GOMES, A. S.; PINTO, T. H. L.; SILVA, A. J. Genotypic identification of *Cryptosporidium* spp. isolated from HIV-Infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. *Revista Instituto Medicina Tropical*, v. 50, n. 3, p. 139-143, 2008.

ARAUJO, R. S. *Quantificação e caracterização genotípica de Cryptosporidium spp. isolados de água bruta superficial e esgoto bruto para a monitorização em mananciais de abastecimento público na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP)*. 2015. 164 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2015.

ARMON, R. Bacteriophage monitoring in drinking water: do they fulfill the index or indicator function. *Water Science Technology*, v. 27, p. 463-467, 1993.

ARRUDA, P. R. R. *Uma contribuição ao estudo ambiental da Bacia Hidrográfica do Ribeirão São Bartolomeu, Viçosa, Minas Gerais*. 1007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 1997.

ASSIS, D. C.; RESENDE, D. V.; SANTOS, M. C.; CORREIA, D.; OLIVEIRA-SILVA, M. B. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Cystoisospora belli* in HIV-infected patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 55, n. 3, p. 149-154, 2013.

BAGGIO, H. F. *Contribuições naturais e antropogênicas para a concentração e distribuição de metais pesados em sedimento de corrente na bacia do Rio do Formoso, município de Buritizeiro, MG*. 2008. 232 f. Tese (Doutorado em Geologia) – Instituto de Geociências, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2008.

BALLESTE, E.; BLANCH, A. R. Persistence of *Bacteroides* species populations in a river as measured by molecular and culture techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 22, p. 7608-7616, 2010.

BASTOS, R. K. X.; BEVILACQUA, P. D.; NASCIMENTO, L. E. *et al.* Coliformes como indicadores da qualidade da água. Alcance e limitações. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27, 2000, Porto Alegre, RS. *Anais...* Rio de Janeiro, RJ: ABES, 2000.

BASTOS, R. K. X.; HELLER, L.; VIEIRA, M.B.C.M.; BRITO, L.L. A.; BEVILACQUA, P. D.; NASCIMENTO, L. E. GIARDIA CYSTS AND CRYPTOSPORIDIUM OOCYSTS DYNAMICS IN SOUTHEAST BRAZIL. Occurrence in surface water and removal in water treatment processes. *Water Science and Technology*. v. 14, n. 2, p. 15 -22, 2004.

BASTOS, R. K. X.; BEVILACQUA, P. D.; MIERZWA, J. C. Análise de risco aplicada ao abastecimento de água para consumo humano. In: PÁDUA, V. L. (Coord.). *Remoção de microorganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano*. Rio de Janeiro: ABES, 2009, p. 327-360. (Projeto Prosab).

BERTRAND, I.; SCHIJVEN, J. F.; SÁNCHEZ, G.; WYN-JONES, P.; OTTOSON, J.; MORIN, T.; MUSCILLO, M.; VERANI, M.; NASSER, A.; RODA-HUSMAN, A. M.; MYRMEL, M.; SELLWOOD, J.; COOK, N.; GANTZER, C. The impact of temperature

on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *Journal of Applied Microbiology* v. 112, p.1059-1074, 2012.

BEZERRA, N. R. *Aplicação de redes bayesianas na identificação de perigos em sistemas de abastecimento de água para consumo humano: Estudo de caso no município de Viçosa*. 2011. 164 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

BONJOCH, X., BALLESTE, E.; BLANCH, A. R. Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of *bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution. *Applied Environment Microbiology*. v. 70, p. 3171-3175, 2004.

BOEHM, A. B.; YAMAHARA, K. M.; LOVE, D. C.; PETERSON, B. M.; MCNEILL, K.; NELSON, K. L. Covariation and photoinactivation of traditional and novel indicator organisms and human viruses at a sewage-impacted marine beach. *Environmental Science and Technology*, v. 43, n. 21, p. 8046-8052, 2009.

BONILLA, N.; SANTIAGO, T.; MARCO, S. P.; URDANETA, M.; DOMINGO, J. S.; TORANZOS, G. A. Enterophages, a group of phages infecting *Enterococcus faecalis*, and their potential as alternate indicators of human faecal contamination. *Water Science Technology*, v. 61, n. 2, p. 293-300, 2010.

BOWMAN, D. D.; LUCIO-FORSTER, A. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 121-127, 2010.

BRAGA, M. D. *Análise de perigos e pontos críticos de controle – APPCC: estudo de caso no sistema de abastecimento de água da Universidade Federal de Viçosa*. 2007. 132 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000. Dispõe sobre a qualidade das águas de balneabilidade e alerta o disposto na Resolução 020, de 18 de junho de 1986. *Diário Oficial da União*, 29 de novembro de 2000.

BRASIL. 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 da União*, de 18 de março de 2005, p. 58-63.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. *Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências*. *Diário Oficial da União*, 14 de dezembro de 2011.

BRITISH STANDARD (BSI). BS EN ISO 10705-1:2001. *Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages – Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages*. Londres, 2001a.

BRITISH STANDARD (BSI). BS EN ISO 10705-2:2001. *Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages – Part 2: Enumeration of somatic coliphages*. Londres, 2001b.

BRITISH STANDARD (BSI). BS EN ISO 10705-2:2001. *Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages – Part 4: Enumeration of bacteriophages infecting Bacteriodes fragilis*. Londres, 2001c.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINHO, J. M.; PARKER, J. *Biology of microorganisms*, 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: Prentice-Hall do Brasil, 1994. 109 p.

CACCIÒ S. M. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parasitologia*, v. 47, n. 2, p.185-192, 2005.

CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, v. 38, p. 818-862, 2004.

CARVALHO-ALMEIDA, T. T.; PINTO, P. L. S.; QUADROS, C. M. S.; TORRES, D. M. A. G. V.; KANAMURA, H. Y.; CASIMIRO, A. M. Detection of *Cryptosporidium* sp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 48, n. 3, p. 27-32, 2006.

CASANOVAS-MASSANA, A. GÓMEZ-DOÑATE, M.; SÁNCHEZ, D.; MUNIESA, M.; BLANCH, R. Predicting fecal sources in waters with diverse pollution loads using general and molecular host-specific indicators and applying machine learning methods. *Journal of Environmental Management*, v. 151, p. 317-325. 2015.

CASAREZ, E. A.; PILLAI, S. D.; DI GIOVANNI, G. D. Genotype diversity of *Escherichia coli* isolates in natural waters determined by PFGE and ERIC-PCR. *Water Research*, v. 41, n. 16, p. 3643-48, 2007.

CASJENS, S. R. Diversity among the tailed-bacteriophages that infect the Enterobacteriaceae. *Research in Microbiology*. v. 159, n. 5, p. 340-348, 2008.

CASTRO-HERMIDA J. A.; GARCÍA-PRESEDO, I.; ALMEIDA, A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CORREIA DA COSTA, J. M.; MEZO, M. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water. *Science Total Environment*, v. 405, n. 1-3, p. 45-53, 2008.

CEBALLOS, B. S. O.; DANIEL, L. A.; BASTOS, R. K. X. Tratamento de água para consumo humano: panorama mundial e ações do Prosab. In: Pádua, V.L. (Coordenador). *Remoção de microorganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano*. Rio de Janeiro: ABES, 2009. 392 p. (Projeto PROSAB).

CHARLES, K. J.; SHORE, J.; SELLWOOD, J.; LAVERICK, M.; HART, A.; PEDLEY S. Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. *Journal of Applied Microbiology*, v.106, p.1827-1837, 2009.

CHALMERS, R. M.; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: The application of advances in detection and Diagnosis. *Trends in Parasitology*, v. 29, n. 5, p. 237-51, 2013.

CHUNG, H.; SOBSEY, M. D. Comparative survival of indicator viruses and enteric viruses in seawater and sediment. *Water Science & Technology*, v. 27, p. 425-428, 1993.

CLARK, J.; MARCH, J. Bacteriophages and biotechnology: Vaccines, gene therapy and antibacterial. *Trends in Biotechnology*, v. 24, n. 5, p. 212-218, 2006.

CLOKIE, M. R.; MILLARD, A. D.; LETAROV, A. V.; HEAPHY, S. Phages in nature. *Bacteriophage*, v. 1, p. 31-45, 2011.

CORNAX, R.; MORINIGO, M. A.; PAEZ, I. G.; MUNOZ, M. A.; BORREGO. Application of direct plaque assay for detection and enumeration of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* from contaminated water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 3170-3173, 1990.

COULLIETTE, A. D.; NOBLE, R. T. Microbial water quality in the Newport river estuary, A high priority shellfish harvesting area in Eastern North Carolina, USA. *Journal of Water and Health*, v. 6, n. 4, p. 473-482, 2008.

COUPE, S.; SARFATI, C.; HAMANE, S.; DEROUIN, F. Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *Journal Clinical Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 1017-1023, 2005.

CROCKETT, C. S.; HAAS, C. N. Understanding protozoa in your watershed. *Journal of American Water Works Association*, v. 89, n. 9, p. 62-73, 1997.

DANCEY, C.; REIDY, J. *Estatística sem matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows*. Porto Alegre, RS: Artmed. 2006.

DAVIES, C. M.; KAUCNER, C.; DEERE, D.; ASHOBOLT, N. J. Recovery and enumeration of *Cryptosporidium parvum* from animal fecal matrices. *Applied Environment Microbiology*, v. 69, p. 2842-2847, 2013.

DIAS, G. M. F. *Estudo integrado da qualidade de água da bacia do São Bartolomeu: análise epidemiológica, ambiental e espacial*. 2007. 189 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

DIAZ-MUNOZ, S.L.; KOSKELLA, B. Bacteria-phage interactions in natural environments. *Advances in Applied Microbiology*, v. 89, p. 135-183, 2014.

DOMBEK, P. E.; JOHNSON, L. K.; ZIMMERLEY, S. T.; SADOWSKY, M. J. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 6, p. 2572-2577, 2000.

DUGAN, N. R.; FOX, K. R.; OWENS, J. H.; MILTNER, R. J. Controlling *Cryptosporidium* oocysts using conventional filtration. *Journal of the AWWA*, v. 93, p. 64-76, 2001.

DURAN, A. E.; MUNIESA, M.; MENDEZ, X.; VALERO, F.; LUCENA, F.; JOFRE, J. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in freshwaters. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, p. 338-347, 2002.

DUTILH, B. E.; CASSMAN, N.; MCNAIR, K.; SANCHEZ, S. E.; SILVA, G. G.; BOLING, L.; BARR, J. J.; SPETH, D. R.; SEGURITAN, V.; AZIZ, R. K.; FELTS, B.; DINSDALE, E. A.; MOKILI, J. L.; EDWARDS, R. A. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nature Communication*, v. 5, p. 4498, 2014.

EBDON, J. E.; TAYLOR, H. D. Geographical stability of enterococcal antibiotic resistance profiles in Europe and its implications for the identification of faecal sources. *Environmental Science & Technology*, v. 40, n. 17, p. 5327-5332, 2006.

EBDON, J.; MUNIE, 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, p. 3683-3690, 2007.

EBDON, J.; SELLWOOD, J.; SHORE, J.; TAYLOR, H. Use of phages of *bacteroides* (GB- 124) as a novel tool for viral waterborne disease control? *Environmental Science and Technology*, v. 46, n. 2, p. 1163-69, 2012.

FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends in Parasitology*, v. 20, p. 531-536, 2004.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Aplicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). *Journal of Parasitology*, v. 91, n. 3, p. 624-629, 2005.

FEACHEM, R. G.; BRADLEY, D. J.; GARELICK, H.; MARA, D. D. *Sanitation and Disease: Health aspects of excreta and wastewater management*. Chichester, U.K.: John Wiley & Sons, 1983.

FERGUSON, C.; DEERE, D.; SINCLAIR, M.; CHALMERS, R. M.; ELWIN, K.; HADFIELD, S.; XIAO, L.; RYAN, U.; GASSER, R.; EL-OSTA, Y. A.; STEVENS, M. Meeting report: Application of genotyping methods to assess risks from *Cryptosporidium* in watersheds. *Environmental Health Perspective*, v. 114, n. 3, p. 430-434, 2006.

FONG, T. T.; LIPP, E. K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 69, n. 2, p. 357-371, 2005.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre, RS: Artmed, 2002. 424 p.

FRANCO, R. M. B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 109-111, 2001.

FRANCO, R. M. B.; BRANCO, N.; LEAL, D.A.G. Parasitologia ambiental: métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.* em amostras de água. *Revista Patologia Tropical*, v. 41, n. 2, p. 119-135, 2012.

FUJIOKA, R. Microbial indicators of marine recreational water quality. In: HURST, C. J.; CRAWFORD, R. L.; KNUDSEN, G. R.; McINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D. (Ed.). *Manual of environmental microbiology*. 2. ed. Washington, DC: ASM Press, 2002.

FURUSE, K.; OSAWA, S.; KAWASHIRO, J.; TANAKA, R.; OZAWA, A.; SAWAMURA, S.; YANAGAWA, Y.; NAGAO, T.; WATANABE, I. Bacteriophage distribution in human faeces: continuous survey of healthy subjects and patients with internal and leukaemic diseases. *Journal of General Virology*, v. 64, p. 2039-2043, 1983.

GALVÁN, A. L.; MAGNET, A.; IZQUIERDO, F.; FERNÁNDEZ VADILLO, C.; PERALTA, R. H.; ANGULO, S.; FENOY, S.; DEL AGUILA, C. A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. *Science of the Total Environment*, v. 468-469, p. 368-375, 2014.

GATEI, W.; GREENSILL, J.; ASHFORD, R. W.; CUEVAS, L. E.; PARRY, C. M.; CUNLIFFE, N. A.; BEECHING, N. J.; HART, C. A. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *Journal Clinical Microbiology*, v. 41, n. 4, p. 1458-1462, 2003.

GERBA, C. P. Bacteriophage as pollution indicators. In: CALENDAR, R. (Ed.). *The bacteriophages*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2006.

GHERNA, R.; WOESE, C. R. A partial phylogenetic analysis of the “Flavobacter-Bacteroides” phylum: basis for taxonomic restructuring. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 15, n. 4, p. 513-521, 1992.

GLENISTER, A. *A pilot study into the development of microbial source tracking for the use in Brazilian water safety plans*. 2011. 100 f. Thesis (M.Sc. Water and Environmental Management) – University of Brighton, Brighton, UK, 2011.

GOBET, P.; BUISSON, J. C.; VAGNER, O.; NACIRI, M.; GRAPPIN, M.; COMPAROT, S.; HARLY, G.; AUBERT, D.; VARGA, I.; CAMERLYNCK, P.; GOMEZ-DOÑATE, M.; PAYAN, A.; CORTES, I.; BLANCH, A. R.; LUCENA, F.; JOFRE, J.; MUNIESA, M. Isolation of bacteriophage host strains of *Bacteroides* species suitable for tracking sources of animal faecal pollution in water. *Environmental Microbiology*, v. 13, n. 6, p. 1622-1631, 2011.

GOMEZ-DONATE, M. PAYAN, A. CORTES, I. BLANCH, A. R. LUCENA, F. JOFRE, J.; MUNIESA, M. Isolation of bacteriophage host strains of *Bacteroides* species suitable for tracking sources of animal faecal pollution in water. *Environmental Microbiology*, v.13, n.6, p.1622- 1631, 2011.

GOURMELON, M.; CAPRAIS, M. P.; SEGURA, R.; LE MENNEC, C.; LOZACH, S.; PIRIOU, J. Y.; RINCE, A. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of faecal contamination in French estuaries. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 15, p. 4857-4866, 2007.

GOODE, D.; ALLEN, V. M.; BARROW, P. A. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 5032-5036, 2003.

GRABOW, W. O. K.; NEUBRECH, T. E. HOLTZHAUSEN, C. S.; JOFRE, J. *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages: excretion by humans and animals. *Water Science and Technology*, v. 31, n. 5-6, p. 223-230, 1995.

GRABOW, W. O. K. Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. *Water SA*, v. 27, p. 251-268, 2001.

GRACZYK, T. K.; LUCY, F. E.; TAMANG, L.; MASHINSKI, Y.; BROADERS, M. A.; CONNOLLY, M.; CHENG, H.-W. A. Propagation of human enteropathogens in constructed horizontal wetlands used for tertiary wastewater treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p. 4531-38, 2009.

GRAY, N. F. *Water Technology: An introduction for environmental scientists and engineers*. 2. ed, Oxford: Elsevier Butterworth Heinemann, 2005. 610 p.

GREGORACCI, G. B.; SILVEIRA, W. D.; BROCCHI, M. The biology of bacteriophages. In: WEGRZYN, G. *Modern bacteriophage biology and biotechnology*. Research Signpost, 2006. p. 1-36. (In press).

GRIFFO, C. L.S.; PEREIRA, M. B.; MOTTA, J. S. Avaliação da eficiência de diferentes Indicadores microbiológicos de balneabilidade em amostras da praia de Camburi, Vitória, ES, 2006.

GROSE, J. H.; CASJENS, S. R. Understanding the enormous diversity of bacteriophages: the tailed phages that infect the bacterial family Enterobacteriaceae. *Virology*. p. 421-443, 2014.

HANSEN, J. S.; ONGERTH, J. E. Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Applied Environment, Microbiology*, v. 57, p. 2790-2795, 1991.

HARAMOTO, E.; KATAYAMA, H.; UTAGAWA, E.; OHGAKI, S. Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. *Journal of Virology Methods*. V.160, p. 206-209, 2009.

HARWOOD, V. J.; WIGGINS, B. A.; HAGEDORN, C.; ELLENDER, R. D.; GOOCH, J.; KERN, J.; SAMADPOUR, M.; CHAPMAN, A. C. H.; ROBINSON, B. J. Phenotypic library-based microbial source tracking methods: efficacy in the California collaborative study. *J. Water Health*, v. 1, p. 153-166, 2003.

HARWOOD, V. J.; BROWNELL, M.; WANG, S.; LEPO, J.; ELLENDER, A. J. D. A.; HELLEIN, K. N.; KENNEDY, E.; YE, X.; FLOOD, C. Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico. *Water Research*, v. 43, p. 4812-4819, 2009.

HARWOOD, V. J. Electronic communication dated October 6, 2011. In: SARGEANT, D.; KAMMIN, W. R.; COLLYARD, S. *Review and critique of current Microbial Source Tracking (MST)*. Environment Assessment Program. Olympia, WA: Washington State Department of Ecology, 2011. 66 p. (Techniques Publication No. 11-03-038).

HARRIS, J. R.; PETRY, F. *Cryptosporidium parvum*: structural components of the oocyst wall. *Journal of Parasitology*, v. 85, p. 839-849, 1999.

HAVELAAR, A. H.; NIEUWSTAD, T. J. Bacteriophages and faecal bacteria as indicators of chlorination efficiency of biologically treated wastewater. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, v. 57, p. 1084-1088, 1985.

HAVELLAR, A. H. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Research*, v. 25, p. 529-545, 1991.

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

HOFSTRA, N.; BOUWMAN, A. F.; BEUSEN, A. H. W.; MEDEMA, G. J. Exploring global *Cryptosporidium* emissions to surface water. *Science of the Total Environment*, v. 442, p. 10-9, 2013.

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

HSU, FU-CHIH.; SHIEH, Y. S.; DUIN, J. V.; BEEKWILDER, M. J.; SOBSEY, M. D. Genotyping male-specific RNA coliphage by hybridization with oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 11, p. 3960-3966, 1995.

HUBER, F.; DA SILVA, S.; BOMFIM, T. C.; TEIXEIRA, K. R.; BELLO, A. R. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 150, p. 65-74, 2007.

INTERNATIONAL ASSOCIATION ON WATER POLLUTION RESEARCH AND CONTROL (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, 1991.

- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). [homepage na internet]. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 ago. 2014.
- JELLISON, K. L.; HEMOND, H. F.; SCHAUER, D. B. Sources and Species of *Cryptosporidium* oocysts in the Wachusett Reservoir watershed. *Applied Environment Microbiology*, v. 68, n. 2, p. 569-575, 2002.
- JENKINS, M. B.; EAGLESHAM, B. S.; ANTONY, L. C.; KACHLANY, S. C.; BOWMAN, D. D.; GHIORSE, W. C. Significance of wall structure, macromolecular composition, and surface polymers to the survival and transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p. 1926-34, 2010.
- JIANG, S. C.; NOBLE, R.; CHU, W. Human adenovirus and coliphages in urban runoff impacted coastal waters of Southern California. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 179-184, 2001.
- JIANG, J.; ALDERISIO, K. A.; SINGH, A.; XIAO, L. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Applied Environment Microbiology*, v. 75, n. 3, p. 1135-1141, 2005a.
- JIANG, J.; ALDERISIO, K. A.; XIAO, L. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Applied. Environment. Microbiology*, v. 71, p. 4446-4454, 2005b.
- JIANG S. C.; CHU, W.; OLSON, B. H.; HE, J. W.; CHOI, S.; ZHANG, J.; LE, J. Y.; GEDALANGA, P. B. Microbial source tracking in a small southern California urban watershed indicates wild animals and growth as the source of fecal bacteria. *Applied a Microbiology Biotechnology*, v. 76, p. 927-934, 2007.
- JOFRE, J.; BOSCH, A.; LUCERNA, F.; GIRONES, R.; TARTERA, C. Evaluation of *Bacteroides fragilis* bacteriophages as indicators of the virological quality of water. *Water Science and Technology*, v. 18, p. 167-173, 1986.
- JOFRE, J.; OLLÉ, E.; RIBAS, F.; VIDAL, F.; LUCENA, F. Potential usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants. *Applied Environment Microbiology*, v. 61, n. 9, p. 3227-3231, 1995.
- JOFRE, J. Is the replication of somatic coliphages in water environments significant? *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, p. 1059-1069, 2009.
- JOFRE, J.; BLANCH, A. R.; LUCENA, F.; MUNIESA, M. Bacteriophages infecting *Bacteroides* as a marker for microbial source tracking. *Water Research*, v. 15, n. 55, p. 1-11, 2014.
- JOHNSON, D. W.; ENRIQUEZ, C. E.; PEPPER, I. L.; DAVIS, T. L.; GERBA, C. P.; ROSE, J. B. Survival of *Giardia*, *Cryptosporidium*, Poliovirus and *Salmonella* in marine waters. *Water Science Technology*, v. 35, n. 11-12, p. 261-268, 1997.

JOŃCZYK, E.; KLAK, M.; MIEDZYPBRODZKI, R.; GORSKI, A. The influence of external factors on bacteriophages – review. *Folia Microbiologica (Praha)*, v. 56, p. 191-200, 2011.

JOHNSTON, S. C.; UFNAR, J. A.; GRIFFITH, J. F.; GOOCH, J. A.; STEWART J. R. A realtime qPCR assay for the detection of the *nifH* gene of *Methanobrevibacter smithii*, a potential indicator of sewage pollution. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, p. 1946-1959, 2010.

KANNAPPAN, V.; FUJIOKA, R.; EDBON, J. E.; TAYLOR, H. T. Isolation and characterization of *Bacteroides host* strain HB-73 used to detect sewage specific phages in Hawaii. *Water research*, v. 44, p. 3714-3714, 2010.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health*, v. 5, p. 1-38, 2007.

KATOR, H.; RHODES, M. Evaluation of *Bacteroides fragilis* bacteriophage, a candidate human-specific indicator of fecal contamination for shellfish-growing waters. Final Report. Virginia Institute of Marine Science, College of William and Mary, Gloucester Point, Va, 1992.

KIRSCHNER, A. K. T.; KAVKA, G. G.; VELIMIROV, B.; MACH, R. L.; SOMMER, R.; FAMLEITNER, A. H. Microbiological water quality along the Danube River: Integrating data from two whole-river surveys and a transitional monitoring network. *Water Research*, v. 43, p. 3673- 3684, 2009.

KELLER, R.; TRAUB, N. The characterization of *Bacteroides fragilis* bacteriophage recovered from animal sera: observations on the nature of bacteroides phage carrier cultures. *Journal of General Virology*, v. 24, p. 179-189, 1974.

KEELEY, A.; FAULKNER, B. R. Influence of land use and watershed characteristics on protozoa contamination in a potential drinking water resources reservoir. *Water Research*, v. 42, p. 2803-2813, 2008.

KOTT, Y. Viruses and bacteriophages. *Science of the Total Environment*, v. 18, p. 13-23, 1981.

KOTHAVADE R. J. Potencial molecular tools for assessing the public health risk associated with waterborne *Cryptosporidium* oocysts. *Journal Medical Microbiology*, v. 61, p. 1039-51, 2012.

LALANCETTE, C.; PAPINEAU, I.; PAYMENT, P.; DORNER, S.; SERVAIS, P.; BARBEAU, B.; DI GIOVANNI, G. D.; PRÉVOST, M. Changes in *Escherichia coli* to *Cryptosporidium* ratios for various fecal pollution sources and drinking water intakes. *Water Research*, v. 55, p.150-161, 2014.

LAMENDELLA, R.; SANTO DOMINGO, J. W.; KELTY, C.; OERTHER, D. B. Bifidobacteria in feces and environmental waters. *Applied Environmental Microbiology*, v. 74, p. 575-584, 2008.

- LEBARON, P.; HENRY, A.; LEPEUPLE, A. S.; PENA, G.; SERVAIS, P. An operational method for the real-time monitoring of *E. coli* numbers in bathing waters. *Marine Pollution Bulletin*, v. 50, p. 652-659, 2005.
- LECLERC, H.; EDBERG, S.; PIERZO, V.; DELATTRE, J.M. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *Journal of Applied Microbiology*. v.88, p. 5-21, 2000.
- LEITCH, G. J.; HE, Q. Cryptosporidiosis-an overview. *Journal of Biomedical Research*, v. 25, n. 1, p.1-16, 2011.
- LEMARCHAND, K.; LEBARON, P. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. *Fems. Microbiology Letters*, v. 218, p. 203-209, 2003.
- LODDER, W. J.; van den BERG, H. H.; RUTJES, S. A.; DE RODA HUSMAN, A. M. Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 17, p. 5965-5971, 2010.
- LOPES, G. J. R. *Avaliação da turbidez e do tamanho de partículas como parâmetros indicadores da remoção de protozoários no tratamento da água em ciclo completo (clarificação)*. 2008. 134 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- LÓPEZ-PILA, J. M.; SZEWZYK, R. Estimating the infection risk in recreational waters from the faecal indicator concentration and from the ratio between pathogens and indicators. *Water Research*, v. 34, n. 17, p. 4195-4200, 2000.
- LOVE, D. C.; RODRIGUEZ, R. A.; GIBBONS, C. D.; GRIFFITH, J. F.; YU, Q.; STEWART, J. R.; SOBSEY, M. D. Human virus and viral indicators in marine water at two recreational beaches in Southern California, USA. *Journal of Water and Health*, v. 12, n. 1, p. 136-150, 2014.
- LOWERY, C. J.; MOORE, J. E.; MILLAR, B. C.; MCCORRY, K. A.; XU, J.; ROONEY, P. J.; DOOLEY, J. S. Occurrence and molecular genotyping of *Cryptosporidium* spp. in surface waters in Northern Ireland. *Journal Applied of Microbiology*, v. 91, p. 774-779, 2001.
- LUCENA, F.; BLANCH, A. R.; JOFRE, J. Critical review on methods for bacteriophages (and viruses) to be monitored in EU in sludges, soils and treated biowastes. Horizontal HYG DL 2/4.2 Report - SSPI-CT-2004-513660, 2005.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. *Brock biology of microorganisms*. 11. ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2006.
- MANDILARA, G. D.; SMETI, E. M.; MAVRIDOU, A. T.; LAMBIRI, M. P.; VATOPOULOS, A. C.; RIGAS, F. P. Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. *FEMS Microbiology Letters*, v. 263, p. 119-126, 2006.

MATHUR, M.; VIDHANI, S.; MEHNDIRATTA, P. Bacteriophage therapy: An alternative to conventional antibiotics. *Journal API*. 2003, v. 51, p. 593-596, 2003.

McFETERS, G. A.; BISSONNETTE, G. K.; JEZESKI, J. J. Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. *Applied Microbiology*. v. 27, p. 823-829, 1974.

McQUAIG, S. M.; SCOTT, T. M.; HARWOOD, V.; FARRAH, S. R.; LUKASIK, J. O. Detection of human-derived faecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 7567-7574, 2006.

McLAUHLIN, J.; AMAR, C.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; NICHOLS, G. L. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: Results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 11, p. 3984-3990, 2000.

MEAYS, C. L.; BROERSMA, K.; NORDIN, R.; MAZUMDER, A. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *Journal of Environmental Management*, v. 73, p. 71-9, 2004.

MIERZWA, J. C.; SILVA, M. C. C.; RODRIGUES, L. Di B.; HESPANHOL, I. Tratamento de água para abastecimento público por ultrafiltração: avaliação comparativa através dos custos diretos de implantação e operação com os sistemas convencional e convencional com carvão ativado. *Eng. Sanit. Ambient [online]*, v. 13, n. 1, 2008.

MINISTÉRIO PÚBLICO DE MINAS GERAIS. Disponível em: <<https://www.mpmg.mp.br>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

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

MOHAPATRA, S. S.; RAMACHANDRAN, D.; MANTRI, C. K.; SINGH, D. V. Characterization of the genetic background of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor serotype Inaba strains isolated in Trivandrum, southern India. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, p. 260-265, 2007.

MONIS, P.; KING, B.; KEEBAN, A. Removal and Inactivation of *Cryptosporidium* from water. In: CACCIO, S. M.; WIDMER, G. (Ed.). *Cryptosporidium: Parasite and disease*. Springer, 2014.

MONS, C.; DUMETRE, A.; GOSSELIN, S.; GALLIOT, C.; MOULIN, L. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. *Water Research*, v. 43, p. 211-217, 2009.

MOUSSA, H.; MASSENGALE, R. D. Identification of the sources of *Escherichia coli* in a watershed using carbon-utilization patterns and composite data sets. *Journal of Water and Health*, v. 6, p. 197-207, 2008.

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

MUNIESA, M.; PAYAN, A.; MOCE-LLIVINA, L.; BLANCH, A. R.; JOFRE, J. 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, 2009.

MUNIESA, M.; LUCENA, F.; BLANCH, A. R.; PAYÁN, A.; JOFRE, J. Use of abundance ratios of somatic coliphages and bacteriophages of *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 for microbial source identification. *Water Research*, v. 46, n. 19, p. 6410-8, 2012.

NACESCU, N.; BRANDIS, H.; WERMER, H. Isolation of two *Bacteroides fragilis* phages from sewage and detection of lysogenic strains. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*, v. 219, p. 522-529, 1972.

NELSON, M.; JONES, S. H.; EDWARDS, C.; ELLIS, J. C. Characterization of *Escherichia coli* populations from gulls, landfill trash, and wastewater using ribotyping. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 81, p. 53-63, 2008.

NNANE, D. E. *The Use of Microbial Source Tracking to Assess and Predict Water Quality in River Catchments*. 250 f. Thesis (Doctor of Philosophy) – University of Brighton, Brighton, UK, 2010.

NNANE, D. E.; EBDON, J. E.; TAYLOR, H. D. Integrated analysis of water quality parameters for cost-effective faecal pollution management in river catchments. *Water Research*, v. 45, p. 2235-2246, 2011.

NNANE, D. E.; EBDON, J. E.; TAYLOR, H. D. The dynamics of faecal indicator organisms in a temperate river during storm conditions. *Journal of Water and Climate Change*, v. 3, n. 2, p. 139-150, 2012.

OGORZALY, L.; TISSIER, A.; BERTRAND, I.; MAUL, A.; GANTZER, C. Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. *Water Research*, v. 43, p. 1257-1264, 2009.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). *Representação do Brasil. Água e saúde*, 2010. Disponível em: <<http://www.cepis.ops-oms.org>>. Acesso em: maio de 2015.

ORTEGA-MORA, L. M.; TRONCOSO, J. M.; ROJO-VAZQUEZ, F. A.; GOMEZBAUTISTA, M. Cross-reactivity of polyclonal serum antibodies generated against *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Infection and Immunity*, v. 60, n. 8, p. 3442-5, 1992.

OZAKI, S. C. *Cryptosporidium spp.: Desenvolvimento de técnicas moleculares e imunoquímicas para a detecção de oocistos em água e avaliação da sua remoção pelos métodos convencionais de tratamento de água*. 2009. 175 f. Tese (Doutorado em

Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2009.

PARVEEN, S.; PORTIER, K. M.; ROBINSON, K.; EDMISTON, L.; TAMPLIN, M. Discriminate analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 3142-47, 1999.

PAYAN, A.; EBDON, J. E.; TAYLOR, H.; GANTZER, C.; OTTOSON, J.; PAPAGEORGIOU, G.; BLANCH, A. R.; LUCENA, F.; JOFRE, J.; MUNIESA, M. A. Method for the isolation of suitable bacteriophage host strains of *Bacteroides* for tracking sources of faecal pollution in water. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 5659-5662, 2005.

PAYMENT, P.; LOCAS, A. Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. *Ground Water*, v. 49, n. 1, p. 4-11, 2011.

PHILLIP, T. A. D.; RAWLINS, C. S.; BABOOLAL, S.; GOSEIN, R.; GODDARD, C.; LEGALL, G.; CHINCHAMEE, A. Relative importance of the various environmental sources of *Cryptosporidium* oocysts in three watersheds. *Journal of Water and Health*, v. 6, n. 1, p. 23-34, 2008.

PESQUISA DE INFORMAÇÕES BÁSICAS MUNICIPAIS: Perfil dos municípios brasileiros 2013. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Coordenação de População e Indicadores Sociais. Diretoria de Pesquisas. Rio de Janeiro, 2014.

PETRY, P. Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Microscopy and Microanalysis*, v. 10, p. 586-601, 2004.

PRÉVOT, A. R.; VIEU, J. F.; THOUVENOT, H.; BRAULT, G. Étude de *Ristella pseudoinsolita* et de ses bactériophages, Essai de lysotypic. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, v. 154, p. 681-690, 1970.

PRINCE, B.; VENSO, E.; FRANA, M.; GREENBERG, J.; WARE, A. A Comparison of ARA and DNA data for microbial source tracking based on source classification models developed using classification trees. *Water Research*, v. 41, p. 3575-84, 2007.

PUIG, A.; QUERALT, N.; JOFRE, J.; ARAUJO, R. Diversity of *Bacteroides fragilis* strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from fecally polluted wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 4, p. 1172-1176, 1999.

PURNELL, S. E. *Bacteriophage of Enterococcus species for microbial source tracking*. Ph.D. Thesis. School of Environment and Technology, University of Brighton, United Kingdom, 2012.

PURNELL, S. E.; EBDON, E.; TAYLOR, H. D. Bacteriophage lysis of *Enterococcus* host strains: A tool for microbial source tracking? *Environmental Science & Technology*, v. 45, p.10699-10705, 2011.

RAMIREZ, N. E.; WARD, L. A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infection*, v. 6, p. 773-785, 2004.

RANGDALE, R. E.; MEIJER, W.; RINCÉ, A. Development of methods for pollution source tracking-consolidated literature review. Completed for Environment Agency North West Region INTERREG IIIB Atlantic Area Programme Improved Coastal & Recreational Waters (ICReW), 2003.

REISCHER, G. H.; KASPER, D. C.; STEINBORN, R.; FARNLEITNER, A. H.; MACH, R. L. A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area. *Letters in Applied Microbiology*, v. 44, n. 4, p. 351-356, 2007.

REISCHER, G. H.; HAIDER, J. M.; POKORNY, N.; RODA HUSMAN, A. M.; DE WUERTZ, S.; PRADHAN, B.; FERGUSON, C.; BYAMUKAMA, D.; MUSHI, D.; KO, G.; EBDON, J.; ASTRÖM, J.; COAKLEY, T.; POMA, R.; AHMED, W.; VRAJMASU, V.; TOTH, E. M.; SCHADE, M. A.; BLANCH, A. R.; FARNLEITER, A. H. *Global scale investigation of source specificity and -sensitivity of microbial source tracking qPCR assays targeting intestinal Bacteroides* In: INTERNATIONAL WATER ASSOCIATION'S HEALTH-RELATED WATER MICROBIOLOGY CONFERENCE, Naxos, Greece, 2009.

REN, X.; ZHAO, J.; ZHANG, L.; NING, C.; JIAN, F.; WANG, R.; LV, C.; WANG, Q.; ARROWOOD, M. J.; XIAO, L. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology*, v.130, n. 3, p. 274-81, 2012.

REZAEINEJAD, S.; VERGARA, G. G.; WOO, C. H.; LIM, T. T.; SOBSEY, M. D.; GIN, K.Y. Surveillance of enteric viruses and coliphages in a tropical urban catchment. *Water Research*, v. 58, p. 122-131, 2014.

RYAN, U.; POWER, M. *Cryptosporidium* species in Australian wildlife and domestic animals. *Parasitology*, v.139, n. 13, p. 1673-88, 2012.

RYU, H.; ABBASZADEGAN, M. Long-term study of *Cryptosporidium* and *Giardia* occurrence and quantitative microbial risk assessment in surface waters of Arizona in the USA. *Journal of Water Health*.v.6, n. 2, p. 263–273, 2008.

ROHWER, F. Global phage diversity. *Cell*, v. 113, n. 2, p. 141, 2003.

SABISTON, C. B.; COHL, M. E. Bacteriophage virulent for species of the genus *Bacteroides*. *Journal of Dental Research*, v. 48, n. 4, p. 599, 1969.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

- SANTIAGO-RODRIGUEZ, T. M.; MARCOS, P.; MONTEIRO, S.; URDANETA, M.; SANTOS, R.; TORANZOS, G. A. Evaluation of enterococcus-infecting phages as indices of fecal pollution. *Journal of water and health*, v. 11, n. 1, 51-63, 2013.
- SANTO DOMINGO, J. W.; BAMBIC, D. G.; EDGE, T. A.; WUERTZ, S. Quo vadis source tracking? Towards a strategic framework for environmental monitoring of fecal pollution. *Water Research*, v. 41, n. 16, p. 3539-52, 2007.
- SANTO DOMINGO, J. W.; EDGE, T. A. Identification of primary sources of faecal pollution. Chapter 5. In: REES, G.; POND, K.; KAY, D.; BARTRAM, J.; SANTO DOMINGO, J. (Ed.) *Safe management of shellfish and harvest waters*. London, UK: IWA Publishing on behalf of the World Health Organization, 2010.
- SARGEANT, D.; KAMMIN, W. R.; COLLYARD, S. Review and critique of current microbial source tracking (MST) techniques. Environmental Assessment Program. *Washington State Department of Ecologia*, p.1-68, 2011.
- SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.
- SCHAPER, M.; DURAN, A. E.; JOFRE, J. Comparative resistance of phages isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation process. *Applied and Environment Microbiology*. v. 92, p. 3702-3707, 2002.
- SCOTT, T. M.; ROSE, J. B.; JENKINS, T. M.; FARRAH, S. R.; LUKASIK, J. Microbial source tracking: Current methodology and future directions. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 12, p. 5796-5803, 2002.
- SCOTT, T. M.; CAREN, J.; NELSON, G. R.; JENKINS, T. M.; LUKASIK, J. Tracking sources of fecal pollution in a south California watershed by ribotyping *Escherichia coli*: A case study. *Journal of Environment Forensics*, v. 5, p. 15-19, 2004.
- SCHILLING, K. E.; PALMER, J.A.; BETTIS, E.A.; JACOBSON, P.; SCHULTZ, R.C.; ISENHART, T.M. Vertical distribution of total carbon, nitrogen and phosphorus in riparian soils of Walnut Creek, southern Iowa. *Catena*, v.77, n.3, p. 266-273, 2009.
- SCHNAUDER, I.; BOCKELMANN-EVANS, B.; LIN, B. Modelling faecal bacteria pathways in receiving waters. Proceedings of the Institution of Civil Engineers. *Maritime Engineering*, v. 160, n. 4, p. 143-153, 2007.
- SCHREIBER, C.; RECHENBURG, A.; RIND, E.; KISTEMANN, T. The impact of land use on microbial surface water pollution. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 218, p.181-187, 2015.
- SERVIÇO AUTÔNOMO DE ÁGUA E ESGOTO (SAAE) – Viçosa, MG. Disponível em: <<http://www.saaevicosa.com.br/>>. Acesso em: 10 jul. 2014.
- SHARMA, P.; SHARMA, A.; SEHGAL, R.; MALLA, N.; KHURANA, S. Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from patients in North India. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 17, p. 601-605, 2013.

SHARMA, P.; SHARMA, A.; SEHGAL, R.; MALLA, N.; KHURANA, S. Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from patients in North India. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 8, p. 601-605, 2013.

SIEGRIST, T. J.; ANDERSON, P. D.; HUEN, W. H.; KLEINHEINZ, G. T.; McDERMOTT, C. M.; SANDRIN, T. R. Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Journal of Microbiological Methods*, v. 68, p. 554-562. 2007.

SIGNOR, R. S.; ASHBOLT, N. J.; ROSER, D. J. Microbial risk implications of rainfall-induced runoff events entering a reservoir used as a drinking-water source. *Journal of Water Supply – AQUA*, v. 56, p. 515-531, 2007.

SIGNOR, R. S.; ASHBOLT, N. J. Comparing probabilistic microbial risk assessments for drinking water against daily rather than annualised infection probability targets. *J. Water Health*, v. 7, n. 4, p. 535-543, 2009.

SILVA, C. H. C. *Identificação de fragilidades ambientais na bacia do Ribeirão São Bartolomeu, Viçosa-MG utilizando análise multicritério*. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

SIMPSON, J. M.; SANTO DOMINGO, J. W.; REASONER, D. J. Microbial source tracking: state of the science. *Environment Science and Technology*, v. 36, p. 5279-88, 2002.

SINTON, L. W.; FINLAY, R. K.; HANNAH, D. J. Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review. *Marine and Freshwater Research*, v. 32, p. 323-348, 1998.

SMEETS, P. W. M. H. *Stochastic modelling of drinking water treatment in quantitative microbial risk assessment*. Delft University of Technology, Delft, The Netherlands, 2008.

SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitology Today*, v. 14, p. 14-22, 1998.

SMITH, H. V.; CACCIO, S. M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R. C. A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends in Parasitology*, v. 22, p. 161-167, 2006.

SOBSEY, M.; BATTIGELLI, D.; HANSZEL, T.; SCHWAB, K. *Male specific coliphages as indicators of viral contamination of drinking water*. Denver, Colorado: AWWA Research Foundation, 1995. 150 p.

SOUZA, J. B.; DANIEL, L. A. Inativação dos microrganismos indicadores *Escherichia coli*, colifagos e *Clostridium perfringens* empregando ozônio. *Ambiência – Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 4, n. 2, p. 265-273, 2008.

SUN, Z. P.; LEVI, Y.; KIENE, L.; DUMOUTIER, N.; LUCENA, F. Quantification of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* in environmental water samples of Seine River. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 96, p. 175-183, 1997.

SUNDRAM, A.; JUMANLA, N.; EHLERS, M. M. Studies to distinguish between human and animal faecal pollution using F-RNA coliphages and faecal sterols. *Water AS*, v. 32, p. 627-632, 2006.

SZEWZYK, U.; SZEWZYK, R.; MANZ, W.; SCHLEIFER, K. H. Microbiological safety of drinking water. *Annual Review of Microbiology*, v. 54, p. 81-127, 2000.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis. Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TARTERA, C.; JOFRE, J. Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage polluted waters. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 1632-1637, 1987.

TARTERA, C.; LUCENA, F.; JOFRE, J. Human origin of *Bacteroides fragilis* bacteriophages present in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, p. 2696-2701, 1989.

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

THOMPSON, R. C.; PALMER, C. S.; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *The Veterinary Journal*, v. 177, p. 18-25, 2008.

THOMPSON, R. C.; MONIS, P. Giardia-from genome to proteome. *Advances in Parasitology*, v. 78, p. 57-95, 2012.

TORANZOS, G. A.; MCFETERS, G. A.; BORREGO, J. J. Detection of microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. In: HURST, C. J.; CRAWFORD, R. L.; KNUDSEN, G. R.; MCINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D. (Ed.) *Manual of environmental microbiology*. 2. ed. Washington, DC: ASM Press, 2002.

TYZZER, E. E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. Nov.), of the gastric glands of the common mouse. *Journal of Medical and Biological Research*, v. 18, p. 487- 509, 1910.

TWORT, F. W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, v. 86, n. 4814, p. 1241-43, 1915.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infections*, v. 4, p. 1047-1058, 2002.

UEHLINGER, F. D.; GREENWOOD, S. J.; MCCLURE, J. T.; CONBOY, G.; O'HANDLEY, R.; BARKEMA, H. W. Zoonotic potential of *Giardia duodenalis* and

Cryptosporidium spp. and prevalence of intestinal parasites in young dogs from different populations on Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 196, n. 3-4, p. 509-514, 2013.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Microbial source tracking guide document*. U. S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development: Cincinnati, OH, 2005 (EPA/600/R-05/064).

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Review of coliphages as possible indicators of fecal contamination for ambient water quality*. EPA Office of Water – Office of Science and Technology – Health and Ecological Criteria Division. 2015 (EPA820-R-15-098). Disponível em: <<http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/health/microbial/upload/coliphages-literature-review-report-2015.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

VERGARA, G. G. R. V.; SOBSEY, M. D.; REZAEINEJAD, S. S. Y.; CHANG, S. G.; GOH, K. Y. H. Evaluation of FRNA coliphages as indicators of human enteric viruses in a tropical urban freshwater catchment. *Water Research*, v. 79, p. 39-47, 2015.

VIANA, D. B. *Contribuições para a construção de modelos de estimativa de riscos à saúde associados à transmissão de Giardia e Cryptosporidium via abastecimento de água para consumo humano*. 2010. 192 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

VIJAYAVEL, K.; FUJIOKA, R.; EBDON, J.; TAYLOR, H. 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, 2010.

WARD, P. I.; DEPLAZES, P.; REGLI, W.; RINDER, H.; MATHIS, A. Detection of eight *Cryptosporidium* genotypes in surface and wastewaters in Europe. *Parasitology*, v. 124, p. 359-368, 2002.

WIDMER, G.; FENG, X.; TANRIVERDI, S. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* with microsatellite markers. *Methods Molecular Biology*, v. 268, p. 177-187, 2004.

WITHEY, S.; CARTMELL, E.; AVERY, L. M.; STEPHENSON, T. Bacteriophages – potential for application in wastewater treatment processes. *Science of The Total Environment*, v. 339, p. 1-18, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Guidelines for drinking water quality*. 2. ed., Volume 1. Recommendations. World Health Organization, Geneva, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Global water supply and sanitation assessment 2000 report*. World Health Organization and United Nations Children's Fund, WHO Press, Geneva, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Guidelines for drinking water quality*. Volume 1. Recommendations. 3. ed. World Health Organization, Geneva, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Edition, Fourth. "Guidelines for Drinking-water Quality." Editora Geneva, 2011.

WUERTZ, S.; WANG, D.; REISCHER, G. H.; FARNLEITNER, A. H. Library-independent bacterial source tracking methods. In: HAGEDORN, C.; BLANCH, A. R.; HARWOOD, V. J. (Ed.). *Microbial source tracking: methods, applications and case studies*. London: Springer, 2011.

YOUN-JOO, A. N.; KAMPBELL, D. H.; BREIDENBACH, G. P. *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediments at marinas. *Environmental Pollution*, v. 120, p. 771- 778, 2002.

XIAO, L.; ESCALANTE, L.; YANG, C. F.; SULAIMAN, I.; ESCALANTE, A.; MONTALI, R. J.; FAYER, R.; LAL, A. A. Phylogenetic analysis *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 1578-83, 1999.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C. A. *Cryptosporidium* systematic and implications for public health. *Parasitology Today*, v. 16, n. 7, p. 295-297, 2000.

XIAO, L.; SINGH, A.; LIMOR, J.; GRACZYK, T. K.; GRADUS, S. L. A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw water and wastewater. *Applied Environment Microbiology*, v. 67, n. 3, p. 1097-1101, 2001.

XIAO, L.; RYAN, U. M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion in Infections Diseases*, v. 15, n. 5, p. 483-490, 2004.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 80-89, 2010.

ZHU, X.; WANG, J. D.; SOLO-GABRIELE, H. M.; FLEMING, L. E. A water quality modeling study of non-point sources at recreational marine beaches. *Water Research*, v. 45, n. 9, p. 2985-95, 2011.

ANEXO

ANEXO A

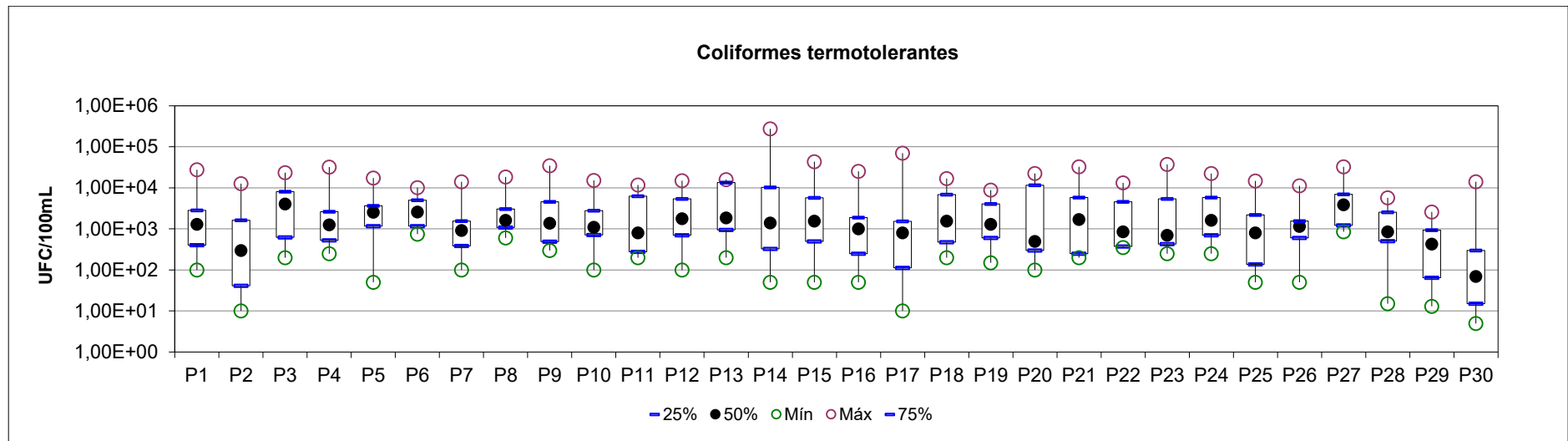


Figura 1A – Estatística descritiva dos dados de coliformes termotolerantes em amostras de água na bacia hidrográfica do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014.

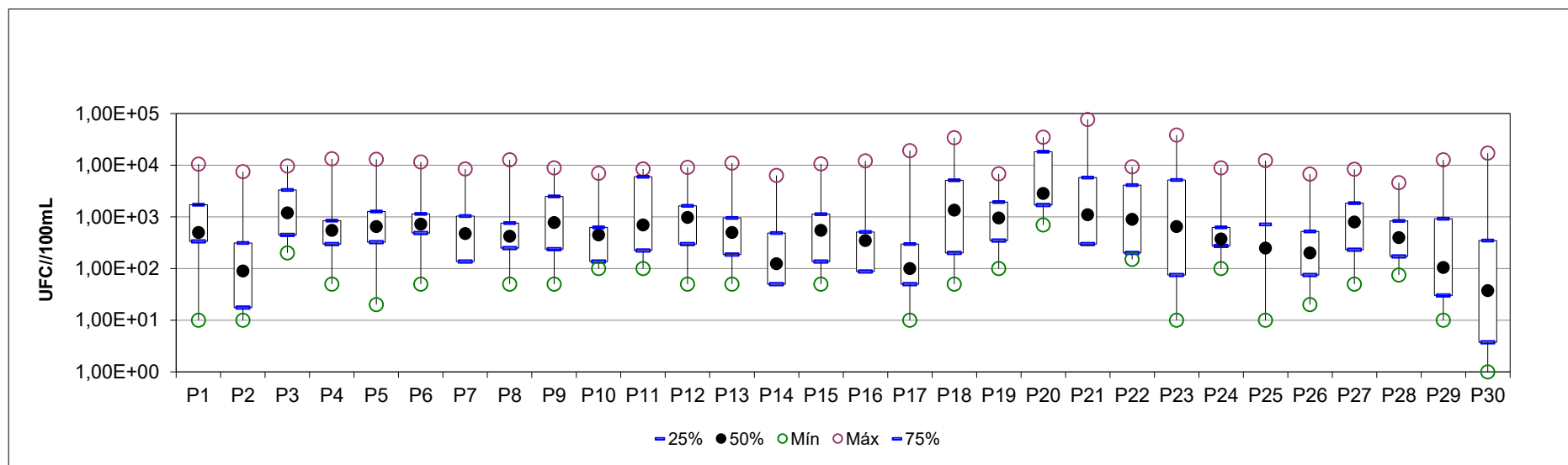


Figura 2A – Estatística descritiva dos dados de enterococos em amostras de água na bacia hidrográfica do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014.

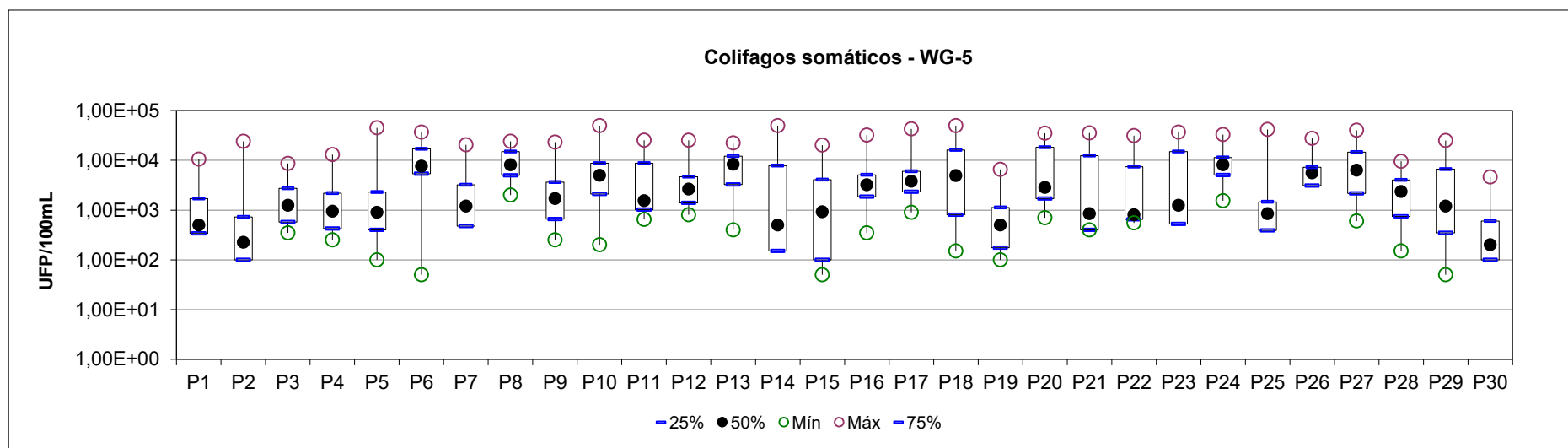


Figura 3A – Estatística descritiva dos dados de colifagos somáticos (WG5) em amostras de água na bacia hidrográfica do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014.

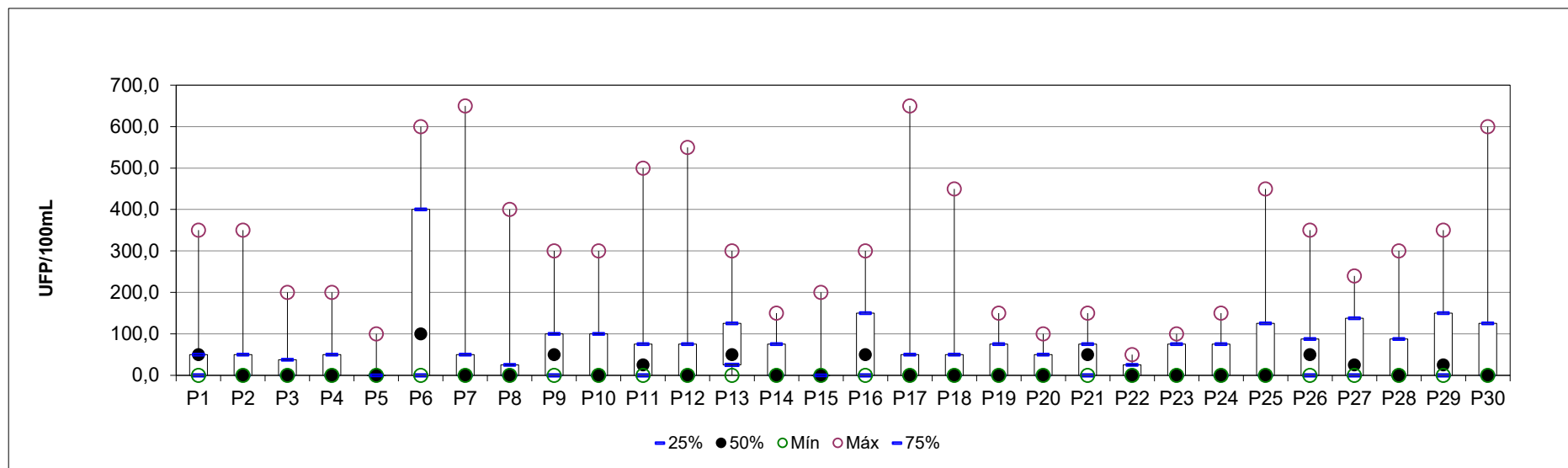


Figura 4A – Estatística descritiva dos dados de colifagos F-RNA (WG49) em amostras de água na bacia hidrográfica do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014.

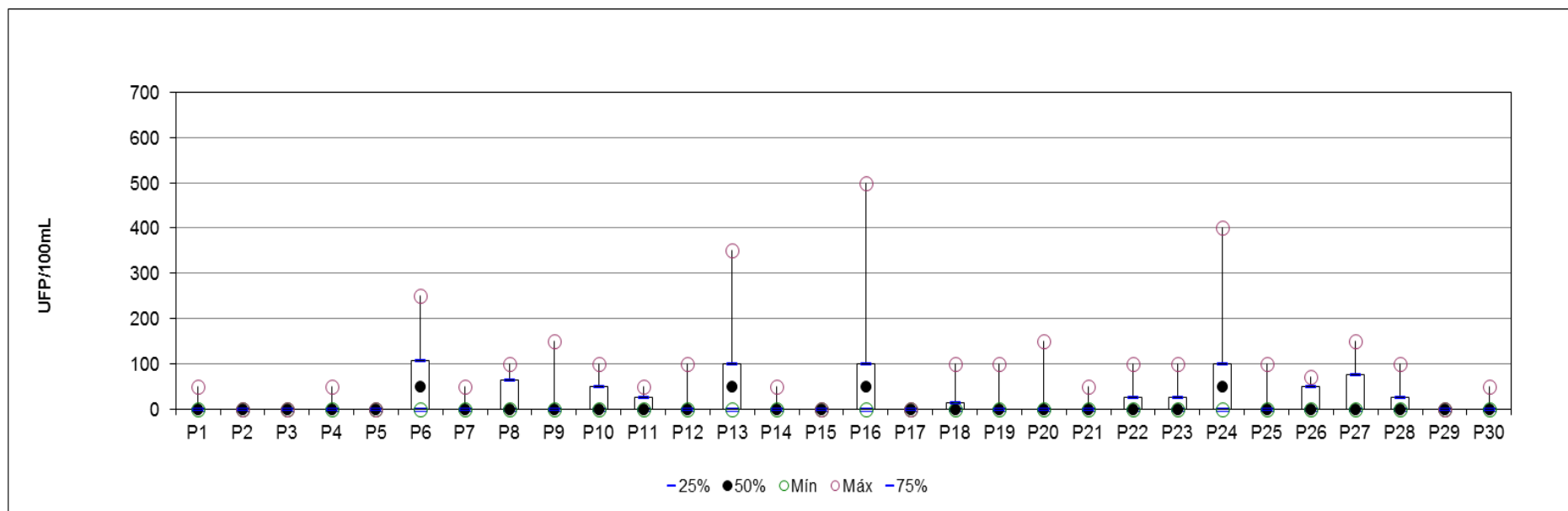


Figura 5A – Estatística descritiva dos dados de Bacteriófagos que infectam *B. fragilis* (GB124) em amostras de água na bacia hidrográfica do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014.

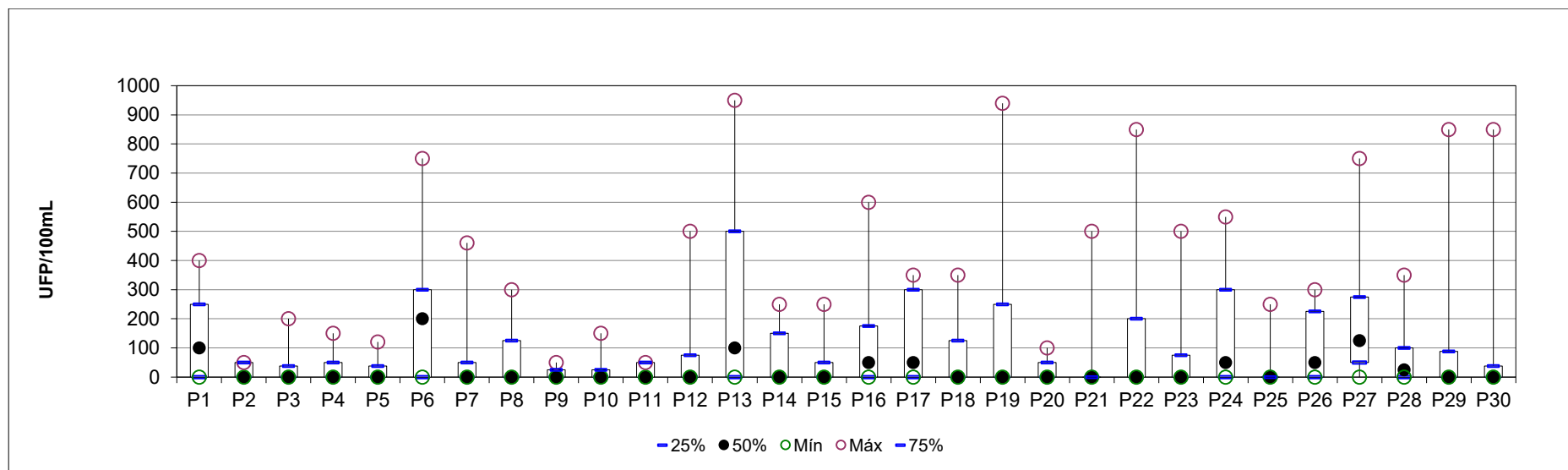


Figura 6A – Estatística descritiva dos dados de Bacteriófagos que infectam *B. fragilis* (HB73) em amostras de água na bacia hidrográfica do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014.

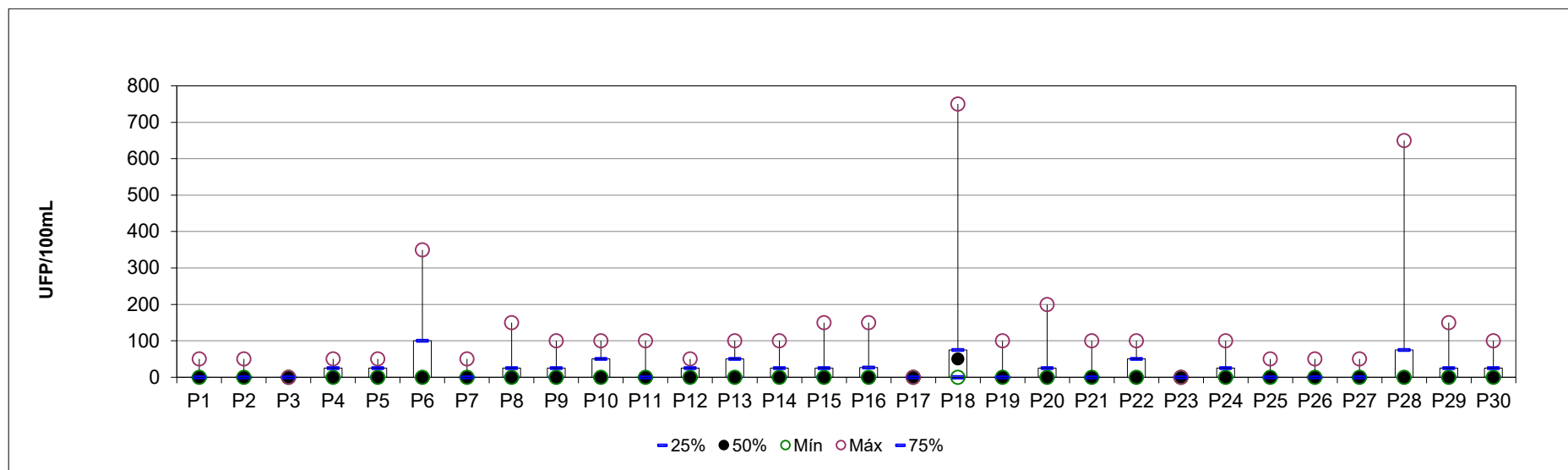


Figura 7A – Estatística descritiva dos dados de Bacteriófagos que infectam *B. fragilis* (S10) em amostras de água na bacia hidrográfica do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014.

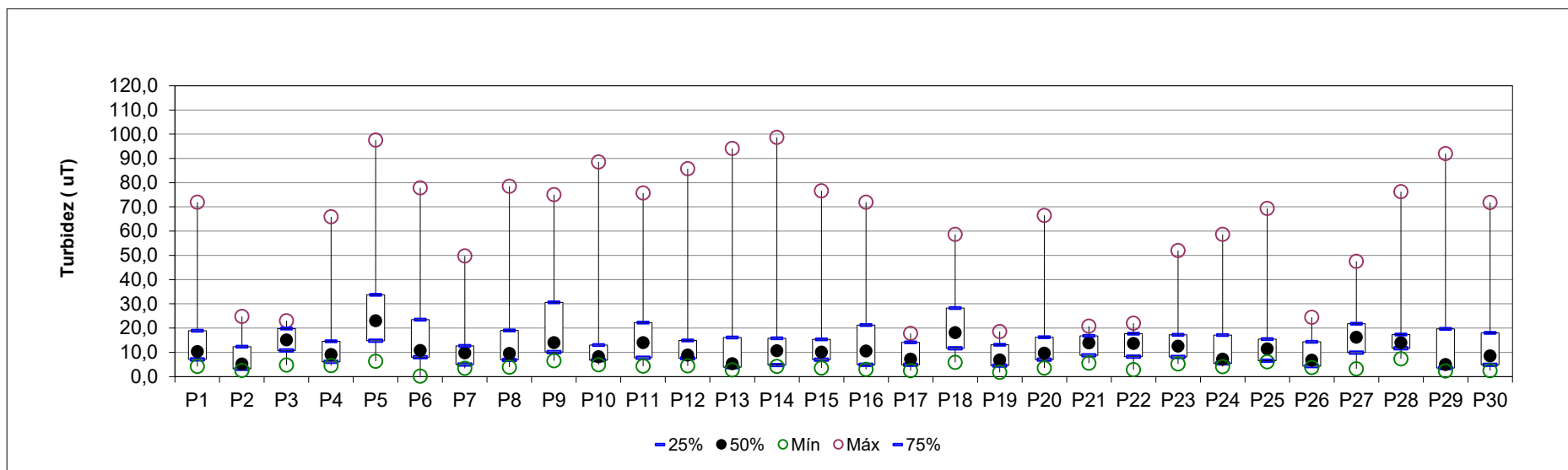


Figura 8A – Estatística descritiva dos dados de turbidez em amostras de água na bacia hidrográfica do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014.

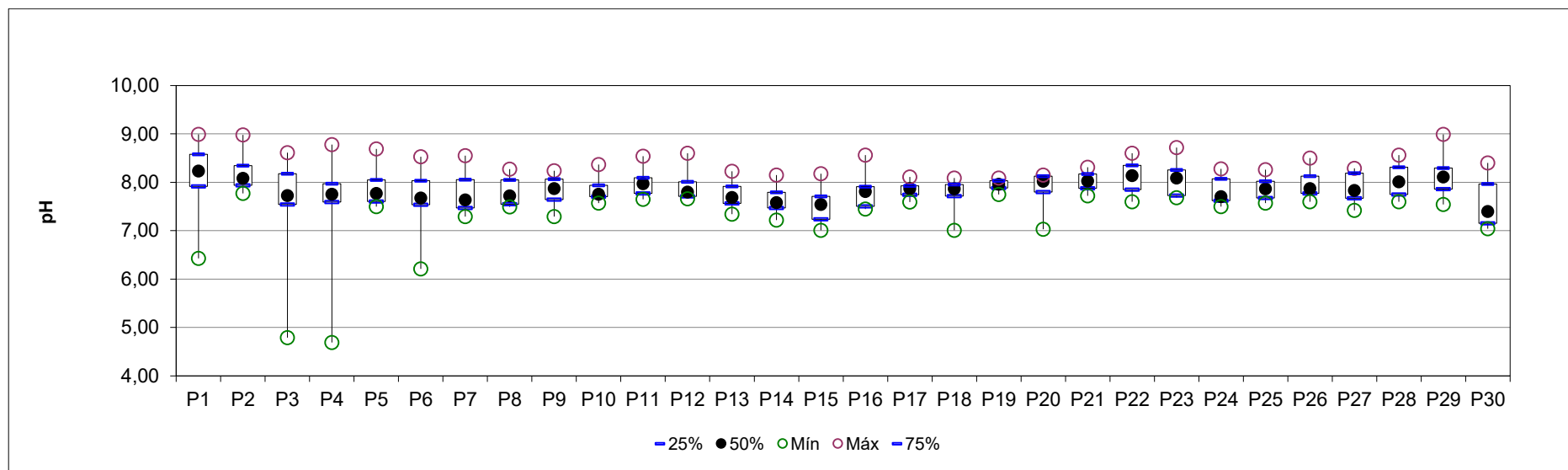


Figura 9A – Estatística descritiva dos dados de pH em amostras de água na bacia hidrográfica do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014.

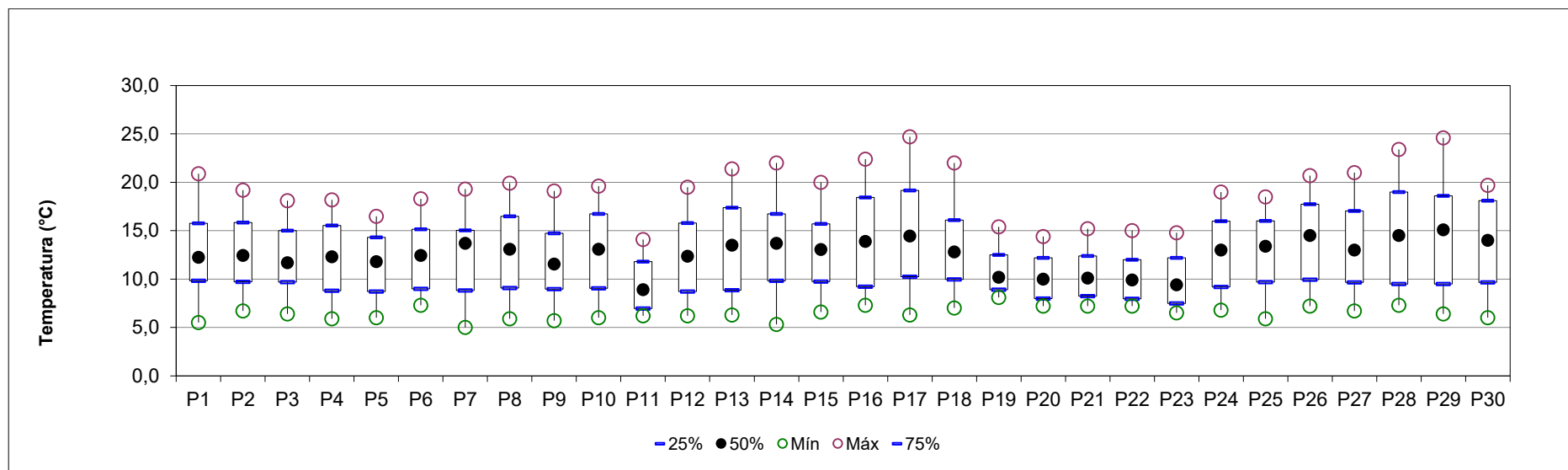


Figura 10A – Estatística descritiva dos dados de temperatura em amostras de água na bacia hidrográfica do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014.

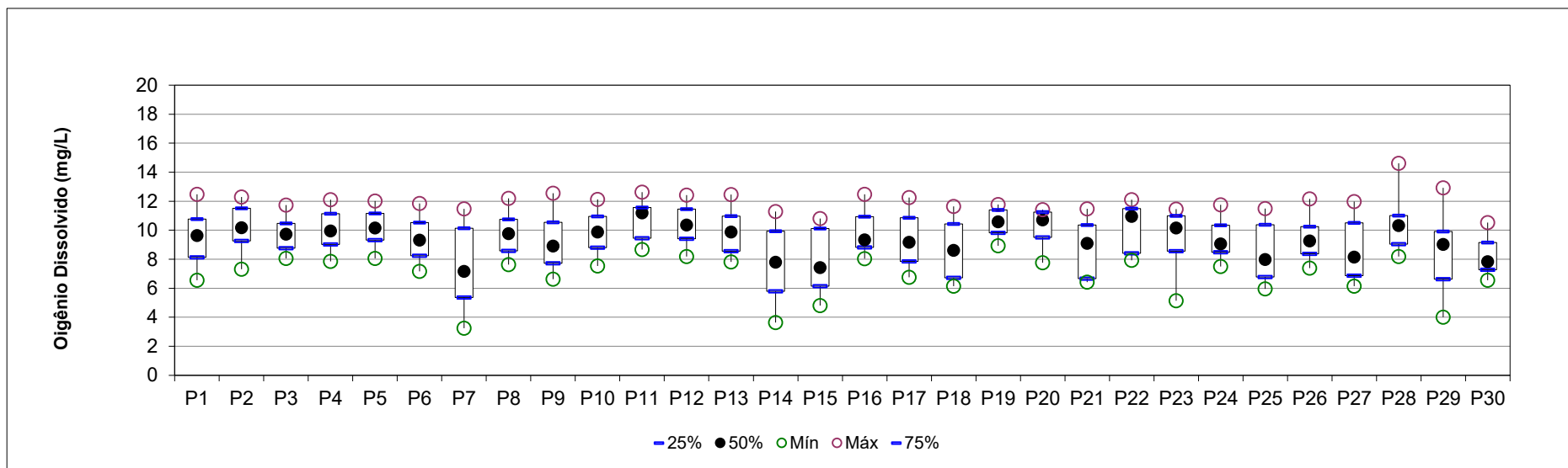


Figura 11A – Estatística descritiva dos dados de oxigênio dissolvido em amostras de água na bacia hidrográfica do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014.

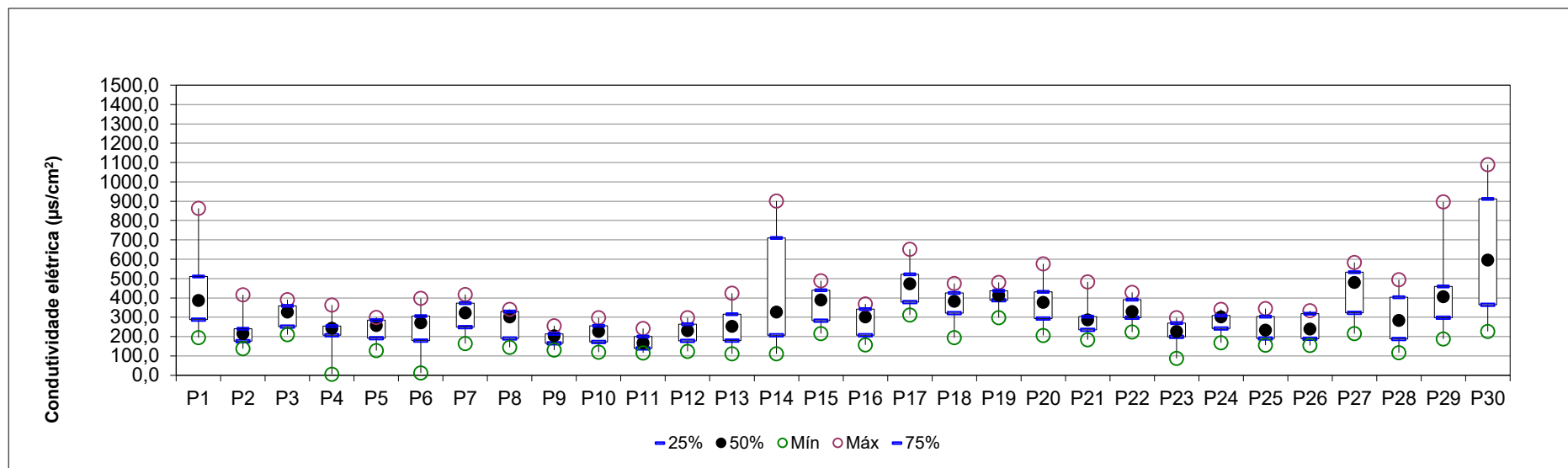


Figura 12A – Estatística descritiva dos dados de condutividade elétrica em amostras de água na bacia hidrográfica do rio Ouse, Inglaterra, Reino Unido, maio de 2013 a março de 2014.