

KEILA DE CASTRO OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE ESPOROS DE BACTÉRIAS AERÓBIAS COMO VARIÁVEL  
INDICADORA DA EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE PROTOZOÁRIOS NO  
TRATAMENTO DE ÁGUA EM CICLO COMPLETO**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

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

T

O48a  
2015

Oliveira, Keila Castro, 1989-  
Avaliação de esporos de bactérias aeróbias como  
variável indicadora da eficiência da remoção de  
protozoários no tratamento de água em ciclo completo /  
Keila Castro Oliveira. - Viçosa, MG, 2015.  
x, 68f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Rafael Kopschitz Xavier Bastos.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.58-68.

1. Água - Microbiologia. 2. Esporos (Bactérias). 3. Água  
- Purificação. 4. Controle de qualidade da água.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Engenharia Civil. Programa de Pós-graduação em  
Engenharia Civil. II. Título.

CDD 22. ed. 628.162

KEILA DE CASTRO OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE ESPOROS DE BACTÉRIAS AERÓBIAS COMO VARIÁVEL  
INDICADORA DA EFICIÊNCIA DA REMOÇÃO DE PROTOZOÁRIOS NO  
TRATAMENTO DE ÁGUA EM CICLO COMPLETO**

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

APROVADA: 03 de julho de 2015

---

Ann Honor Munteer

---

Daniel Adolpho Cerqueira

---

Rafael Kopschitz Xavier Bastos  
(orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional, por estar presente abençoando e iluminando mais uma etapa da minha vida.

Agradeço aos meus pais, Carlos e Ivete, meus maiores mestres. Dedico esta conquista a vocês.

Agradeço a minha família maravilhosa que compartilhou comigo cada etapa deste ciclo.

Ao professor Rafael Kopschitz Xavier Bastos pelos ensinamentos, amizade e pela paciência no decorrer deste trabalho.

À minha querida equipe de trabalho: Carol, Rebeca, Bruno, Ulisses, Nayara e Marcela. O meu mais sincero obrigado!

Ao Roberto por me incentivar, pelo apoio emocional e acadêmico, carinho e compreensão. Muito obrigada!

Aos meus colegas do LCQA Adriana, Janderson, Débora, Vitor, Nirlane e João, muito obrigada pela amizade e colaboração imprescindíveis.

À Divisão de Água e Esgotos da UFV pela infraestrutura disponibilizada e aos servidores pela disponibilidade, ajuda e atenção durante todo o trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil pelas condições de trabalho.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa de estudos.

Agradeço à todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Keila de Castro Oliveira nasceu na cidade de Vitória, Espírito Santo, filha de Ivete de Castro Oliveira e Carlos Alberto Gonçalves de Oliveira, no dia 28 de julho de 1989.

No ano de 2012 concluiu a graduação em Engenharia Ambiental na cidade de Belo Horizonte, neste mesmo ano e se mudou para Viçosa para cursar o mestrado no Departamento de Engenharia Civil, na área de concentração Sanitária e Ambiental, sob orientação do Prof. Dr. Rafael Kopschitz Xavier Bastos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
Objetivo geral.....	4
Objetivos específicos.....	4
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 Características biológicas, ambientais e epidemiológicas dos protozoários patogênicos associados ao abastecimento de água para consumo – <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> .....	5
3.2 Remoção de <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> por meio do tratamento da água em ciclo completo.....	10
3.3 Emprego de indicadores da remoção/inativação de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> por meio do tratamento da água.....	14
3.3.1 Turbidez como parâmetro indicador da eficiência de remoção de protozoários patogênicos em processos de clarificação da água (decantação e filtração).....	15
3.3.2 Produto <i>Ct</i> como parâmetro indicador da eficiência de inativação de protozoários patogênicos em processos de desinfecção da água.....	18
3.3.3 Esporos de bactérias aeróbias.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Características da ETA UFV.....	24
4.2 Coleta e análise laboratorial de amostras de água.....	25
4.2.1 Amostragem.....	25
4.2.2 Análises laboratoriais.....	26
4.3 Sistematização e análise dos resultados.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 Contagem de esporos de bactérias aeróbias.....	34
5.2 Identificação de <i>Bacillus</i> .....	36
5.3 Remoção de esporos de bactérias aeróbias na ETA UFV.....	39

5.4	Remoção de turbidez na ETA UFV .....	40
5.5	Associação entre a remoção de esporos de bactérias aeróbias e de turbidez na ETA UFV .....	50
5.6	Considerações sobre o emprego de esporos de bactérias aeróbias como indicador de remoção de protozoários no tratamento da água .....	52
5.6.1	Etapas de clarificação da água – decantação e filtração .....	52
5.6.2	Etapa de desinfecção da água – cloração .....	53
6	CONCLUSÕES.....	57
7	REFERÊNCIAS .....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico do <i>Cryptosporidium</i> em seres humanos .....	9
Figura 2 - Ciclo biológico da <i>Giardia</i> em seres humanos .....	9
Figura 3 - ETA UFV: (A) calha Parshall; (B) floculador; (C) decantador; (D) vista dos filtros. ....	25
Figura 4 - Esquema da análise de esporos de bactérias aeróbias .....	27
Figura 5 - Fluxograma de identificação de <i>Bacillus</i> spp. ....	29
Figura 6 - Resultado do teste Voges-Proskauer, resultado positivo no tubo da direita. ....	31
Figura 7 – Resultado do teste citrato de Simmons, resultado positivo no tubo da direita .....	32
Figura 8 - Representação gráfica da estatística descritiva dos resultados das contagens de esporos de bactérias aeróbias ao longo das etapas de tratamento da água na ETA UFV, março de 2014 a fevereiro de 2015.....	36
Figura 9 - Distribuição dos grupos de <i>Bacillus</i> encontrados nas amostras de água bruta e tratada na ETA UFV, março a outubro de 2014. ....	38
Figura 10 - Representação gráfica da estatística descritiva dos dados de remoção de esporos de bactérias aeróbias na ETA UFV. Primeiro e terceiros quartis (limites inferior e superior dos retângulos nos gráficos box-plot); medianas (linhas horizontais internas aos retângulos), valores mínimos e máximos (limites inferior e superior das linhas verticais).....	39
Figura 11 - Representação gráfica da estatística descritiva dos dados de turbidez da água na ETA UFV. Primeiro e terceiros quartis (limites inferior e superior dos retângulos nos gráficos box-plot); medianas (linhas horizontais internas aos retângulos), valores mínimos e máximos (limites inferior e superior das linhas verticais). ....	41
Figura 12 - Representação gráfica da estatística descritiva da remoção de turbidez da água na ETA UFV. Primeiro e terceiros quartis (limites inferior e superior dos retângulos nos gráficos box-plot); medianas (linhas horizontais internas aos retângulos), valores mínimos e máximos (limites inferior e superior das linhas verticais).....	42
Figura 13 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, março de 2014. ....	44

Figura 14 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, abril de 2014. ....	44
Figura 15 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, maio de 2014. ....	45
Figura 16 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, junho de 2014. ....	45
Figura 17 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, julho de 2014. ....	46
Figura 18 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, agosto de 2014. ....	46
Figura 19 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, setembro de 2014. ....	47
Figura 20 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, outubro de 2014. ....	47
Figura 21 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, novembro de 2014. ....	48
Figura 22 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, dezembro de 2014. ....	48
Figura 23 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, janeiro de 2015. ....	49
Figura 24 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, fevereiro de 2015. ....	49
Figura 25 - Valores observados de inativação de esporos de bactérias aeróbias e estimados de inativação de cistos de <i>Giardia</i> para os mesmos valores de <i>Ct</i> . ....	55
Figura 26 - Valores observados de inativação de esporos de bactérias aeróbias e estimados de inativação de cistos de <i>Giardia</i> para os mesmos valores de <i>Ct</i> . ....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies de <i>Giardia</i> e respectivos hospedeiros .....	6
Tabela 2 – Espécies de <i>Cryptosporidium</i> e respectivos hospedeiros .....	7
Tabela 3 - Valores de Ct e de inativação correspondente de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> com cloro livre .....	19
Tabela 4 - Tempo de contato mínimo (minutos) estabelecido na Portaria 2914 / 2011 para a desinfecção por meio da cloração, de acordo com concentração de cloro residual livre na saída do tanque de contato (C) com a temperatura e o pH da água .....	20
Tabela 5 – Contagens (UFC/100mL) de esporos de bactérias aeróbias na ETA UFV, março de 2014 a fevereiro 2015 .....	34
Tabela 6 - Estatística descritiva dos resultados das contagens (UFC/100mL) de esporos de bactérias aeróbias na ETA UFV, março de 2014 a fevereiro de 2015 ...	35
Tabela 7 - Estatística descritiva dos resultados de remoção (log) de esporos de bactérias aeróbias na ETA UFV, março de 2014 a fevereiro de 2015.....	39
Tabela 8 - Estatística descritiva dos dados de turbidez (uT) nas amostras de água da ETA UFV analisadas para esporos de bactérias aeróbias .....	41
Tabela 9 - Distribuição dos valores de turbidez de água filtrada, ETA UFV, março de 2014 a fevereiro de 2015. ....	43
Tabela 10 – Resultados dos testes de correlação de Pearson entre valores absolutos de esporos de bactérias aeróbias e dados de turbidez nas amostras de água da ETA UFV .....	51
Tabela 11 – Resultados dos testes de correlação de Pearson entre os valores de remoção em Log de esporos de bactérias aeróbias e de turbidez na ETA UFV .....	51
Tabela 12 – Estimativa de inativação de cistos de <i>Giardia</i> na ETA UFV .....	54

## RESUMO

OLIVEIRA, Keila de Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Avaliação de esporos de bactérias aeróbias como variável indicadora da eficiência da remoção de protozoários no tratamento de água em ciclo completo.** Orientador: Rafael Kopschitz Xavier Bastos.

O presente trabalho visa contribuir para o melhor entendimento da aplicabilidade de esporos de bactérias aeróbias como um indicador da eficiência do tratamento de água. O trabalho consistiu, essencialmente, na pesquisa de esporos de bactérias aeróbias ao longo do processo de tratamento da estação de tratamento de água da Universidade Federal de Viçosa (ETA UFV). A remoção de esporos foi discutida comparativamente à: (i) estimativa da remoção de cistos de *Giardia* e de oocistos de *Cryptosporidium*, a partir de dados de remoção de turbidez na ETA UFV e do emprego de equações empíricas de literatura que relacionam a remoção de cistos de *Giardia* e de oocistos com a de turbidez; (ii) estimativa da inativação de cistos de *Giardia* a partir dos dados *Ct* da ETA UFV e do emprego de um modelo empírico de literatura de inativação de cistos por cloração em função de *Ct*. Os resultados obtidos indicaram que: (i) esporos de bactérias aeróbias foram removidos de forma consistente ao longo das etapas do tratamento; (ii) a remoção de turbidez no ciclo completo de clarificação (decantação + filtração) foi inferior à de esporos de bactérias aeróbias; (iii) a remoção observada de esporos de bactérias aeróbias no ciclo completo de clarificação (decantação + filtração) foi inferior à remoção estimada, com base na remoção de turbidez, de cistos de *Giardia* e próxima à de oocistos de *Cryptosporidium*; (iv) a inativação observada de esporos de bacterias aeróbias por cloração foi inferior à inativação estimada, com base nos valores de *Ct*, de cistos de *Giardia*. Infere-se, pois, que a remoção / inativação de esporos apresenta potencial de indicador da remoção / inativação de (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* e que a turbidez possa ser utilizada como estimativa conservadora da remoção de esporos.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Keila de Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Evaluation of aerobic bacterial spores as an indicator for protozoa removal efficiency in convencional drinking-water water treatment.** Adviser: Rafael Kopschitz Xavier Bastos.

This work aims at contributing to the understanding of the use aerobic bacterial spores as an indicator of drinking-water treatment efficiency. Essentially, the work consisted of monitoring aerobic spores along the treatment processes in the water treatment plant of the University of Viçosa (UFV WTP). Spores removal was compared to: (i) *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts removal estimates, based on turbidity removal data from UFV WTP and the use of literature empirical equations which relate the removal of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts to turbidity removal; (ii) *Giardia* cysts inactivation estimates, based on UFV WTP *Ct* values and a literature empirical model which relates *Giardia* cysts inactivation to *Ct*. The results indicated that: (i) aerobic bacterial spores were consistently removed along the UFV WTP treatment processes; (ii) turbidity removal in the whole clarification cycle (sedimentation + filtration) was below that of bacterial spores; (iii) the observed removal of bacterial spores in the whole clarification cycle (sedimentation + filtration) was below the removal estimates, based on turbidity removal, for *Giardia* cysts and close to that for *Cryptosporidium* oocysts; (iv) the observed inactivation of bacterial spores with chlorination was below the inactivation estimates, based on *Ct* values, for *Giardia* cysts. Thus, it is suggested that the removal / inactivation of aerobic bacterial spores can be potentially used as an indicator of removal / inactivation of *Giardia* and *Cryptosporidium* (oo)cysts, as well as that turbidity can be used as a conservative estimate of bacterial spores removal

# 1 INTRODUÇÃO

A água é essencial para o funcionamento biológico, desde o metabolismo dos organismos vivos até o equilíbrio dos ecossistemas. Porém, devido ao uso cada vez mais intenso desse recurso natural, seja para sustentar o abastecimento populacional e, ou atender demandas agrícolas e industriais, águas superficiais e subterrâneas estão sujeitas à contaminação de origem química, física e, ou microbiológica.

A Organização das Nações Unidas (ONU) propôs, em 1990, reduzir à metade o déficit de acesso à água adequada ao consumo humano até o ano de 2015. Essa meta foi atingida em 2010, mas, apesar dos esforços contínuos, 768 milhões de pessoas permaneciam sem acesso à água de qualidade em 2011 (ONU, 2008; WHO, 2013). Em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) registrou 1,8 milhões de mortes em todo o mundo por doenças ligadas à água de baixa qualidade, sendo as crianças com até cinco anos de idade o grupo mais atingido (WHO, 2008).

Dentre os riscos à saúde humana associados ao consumo de água destacam-se as doenças causadas por microrganismos patogênicos, incluindo diversas espécies de bactérias, vírus e protozoários. Vários protozoários têm transmissão associada ao consumo de água, tais como *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Toxoplasma gondii*, *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli*, mas sobre os dois primeiros se dispõe de informações epidemiológico-ambientais mais detalhadas (KARANIS *et al.*, 2007; WHO, 2011).

Conforme sintetizado por Bastos *et al.* (2009), os protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* apresentam ciclos biológicos complexos, incluindo estágios de reprodução assexuada ou sexuada no organismo do hospedeiro até a formação de cápsulas protetoras: os cistos e oocistos, respectivamente, de *Giardia* e de *Cryptosporidium*. Do ponto de vista da Engenharia Sanitária, importa reconhecer que estes cistos e oocistos são as formas excretadas, que circulam no ambiente e são ingeridas por novos hospedeiros; são formas resistentes às condições ambientais e, portanto, chegam às estações de tratamento de água (ETAs) e aí devem ser removidas.

No que diz respeito ao abastecimento de água para consumo humano, os principais problemas associados aos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* são, além da mencionada elevada persistência ambiental dos cistos e oocistos: (i) elevada resistência aos processos de desinfecção tradicionalmente utilizados em ETAs, particularmente à cloração, sendo os oocistos de *Cryptosporidium* mais resistentes que os cistos de *Giardia* (BETANCOURT e ROSE, 2004; WHO, 2011); e (ii) alta infectividade aos seres humanos, devida às baixas doses infectantes. No entanto, como os cistos e oocistos desses protozoários apresentam características similares às de partículas coloidais, são passíveis de remoção por processos de clarificação da água, tais como a filtração lenta ou rápida e, no segundo caso, tanto filtração direta quanto tratamento em ciclo completo (Di BERNARDO e DANTAS, 2005; BASTOS *et al.*, 2009).

Outro problema reside no fato de que o monitoramento rotineiro de protozoários em amostras de água é muito laborioso, de alto custo, além de persistirem dificuldades analíticas de detecção em amostras com baixas concentrações desses microrganismos (BASTOS *et al.*, 2009; AGULLÓ-BARCELO *et al.*, 2013).

Portanto, com o intuito de avaliar a eficiência de processos de tratamento de água na remoção de protozoários, torna-se pertinente, para não dizer crítico, o uso de variáveis indicadoras da qualidade da água ou, da eficiência em si do tratamento. Nesse sentido, se destacam a turbidez, dada sua natureza associada a partículas em suspensão na água, e a própria contagem de partículas por distribuição de tamanho, com destaque para a turbidez por conta de maior facilidade de medição corriqueira.

Como destacado por Bastos *et al.* (2009), a literatura registra número considerável de estudos, em escala piloto e real, envolvendo a filtração direta e o tratamento em ciclo completo, que procuram associar a remoção de turbidez e de partículas como a de cistos de *Giardia* e de oocistos de *Cryptosporidium*, bem como valores absolutos de turbidez da água filtrada com a presença / ausência de (oo)cistos. Ainda segundo esses autores, embora vários desses trabalhos tenham subsidiado a formulação de padrões de potabilidade, e a turbidez de fato seja incorporada em normas de vários países (inclusive a brasileira) como indicadora da

qualidade microbiológica da água filtrada, o estado da arte do conhecimento sobre o tema segue controverso.

Talvez por isso, se siga investindo na pesquisa de outros indicadores da remoção de (oo)cistos de protozoários por meio do tratamento da água, como, por exemplo, esporos de bactérias aeróbias e anaeróbias, *Bacillus subtilis* e *Clostridium perfringens* respectivamente (COFFEY *et al.*, 1999; MAZOUA e CHAUVEHEID, 2005; BROWN e CORNWELL, 2007), bacteriófagos (HUERTAS *et al.*, 2003) e microesferas fluorescentes (EMELKO *et al.*, 2003). Porém, também aqui os resultados permanecem inconclusivos ou restritos em termos de aplicação rotineira (como no caso das esferas fluorescentes).

No Brasil, alguns grupos de pesquisa têm particularmente se dedicado à investigação da remoção de *Giardia* e *Cryptosporidium* por meio do tratamento da água e, mais especificamente, ao emprego da turbidez como variável indicadora da remoção desses protozoários: (i) a Universidade de Brasília (UnB), com foco em experimentos em instalações piloto de filtração lenta e de filtração direta (FAGUNDES, 2006; FERNANDES, 2007); (ii) a Universidade Federal de Viçosa (UFV), com atenção no tratamento em ciclo completo, em experimentos em escala piloto e estudos de monitoramento em escala real (LOPES, 2008); e (iii) a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em instalações piloto e com abordagem ampla, envolvendo filtração lenta, filtração direta e ciclo completo (BRITO *et al.*, 2005; CERQUEIRA, 2008; LADEIA, 2004).

Por sua vez, pouco se tem registrado no Brasil em termos de pesquisa sobre outros indicadores, com destaque, talvez isolado, para o grupo da UFMG com estudos em escala piloto envolvendo esporos de *Bacillus subtilis* e microesferas fluorescentes (CERQUEIRA, 2008). O presente trabalho vem, assim, contribuir para o melhor entendimento da aplicabilidade do emprego de esporos de bactérias aeróbias como um indicador da eficiência do tratamento de água, mais especificamente e talvez de forma pioneira no país, sobre a remoção, em escala real, de esporos de bactérias aeróbias nas etapas do tratamento em ciclo completo.

## 2 OBJETIVOS

### Objetivo geral

Contribuir para o estado da arte do conhecimento sobre o uso de esporos de bactérias aeróbias como indicador da eficiência do tratamento de água em ciclo completo na remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*.

### Objetivos específicos

- Avaliar comparativamente as remoções de esporos de bactérias aeróbias e de turbidez com base em estudo em escala real de monitoramento de uma ETA.
- Avaliar comparativamente as remoções observadas de esporos de bactérias aeróbias e estimadas, com base na remoção de turbidez, de cistos de *Giardia* e de oocistos de *Cryptosporidium*.
- Avaliar comparativamente a inativação por cloração observada de esporos de bactérias aeróbias com a estimada, com base em valores de *Ct*, de cistos de *Giardia*.
- Avaliar a suficiência do emprego como indicador de *Bacillus*, genericamente em nível de gênero, ou a pertinência de identificação das espécies de *Bacillus* spp.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Características biológicas, ambientais e epidemiológicas dos protozoários patogênicos associados ao abastecimento de água para consumo – *Giardia* e *Cryptosporidium*

Conforme informações sistematizadas por Bevilacqua *et al.* (2009), os protozoários compõem um grupo de organismos incluindo seres de vida livre e parasitas, que se caracterizam por apresentar formas, locais de ocorrência e metabolismos diferenciados. Seres humanos e diferentes espécies de animais constituem os hospedeiros obrigatórios ou ocasionais dos protozoários patogênicos, sendo que alguns desses podem apresentar ciclos biológicos complexos, envolvendo inclusive diferentes mecanismos de transmissão.

Por sua vez, como registrado por Bastos *et al.* (2009), vários protozoários patogênicos de transmissão fecal-oral, como *Balantidium coli*, *Blastocystis hominis*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Isospora belli*, *Microsporidia* e *Toxoplasma gondii*, têm transmissão associada à veiculação hídrica (KARANIS *et al.*, 2007; WHO, 2011). Porém, sobre *Cryptosporidium* e *Giardia* recaem as maiores evidências disso, bem como as maiores preocupações de transmissão via abastecimento de água para consumo humano, pois os cistos de *Giardia* e os oocistos de *Cryptosporidium* apresentam elevada persistência no ambiente, baixas doses infectantes e são de difícil remoção e, ou inativação em ETAs.

Os protozoários dos gêneros *Cryptosporidium* e *Giardia* são constituídos por diferentes espécies e genótipos, os quais exibem grande diversidade biológica, capacidade distinta de infectar uma ou múltiplas espécies hospedeiras e prevalência de infecção com ampla variação regional (XIAO e FAYER, 2008).

Atualmente são reconhecidas seis espécies de *Giardia* (Tabela 1). *Giardia duodenalis* é a espécie infectante de seres humanos, sobre a qual cabem, entretanto, as seguintes observações: (i) *Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis* e *Giardia lamblia* são nomes frequentemente usados acriticamente na literatura se referindo ao mesmo organismo (XIAO e FAYER, 2008; FRANCO, 2007); (ii) são reconhecidos sete *assemblages* (ou grupos genéticos) dessa espécie (SMITH *et al.*,

2007), cabendo ressaltar que apenas os genótipos A e B são reconhecidos por infectar seres humanos.

Tabela 1 – Espécies de *Giardia* e respectivos hospedeiros

Espécies	Hospedeiros
<i>Giardia agilis</i>	Anfíbios
<i>Giardia ardeae</i>	Pássaros
<i>Giardia microti</i>	Ratos / Ratazanas
<i>Giardia muris</i>	Roedores
<i>Giardia psittaci</i>	Pássaros
<i>Giardia duodenalis</i>	
Assemblage A	Humanos, primatas, cães, gado, roedores, mamíferos selvagens
Assemblage B	Humanos, primatas, cães, cavalos, gado
Assemblage C	Cães
Assemblage D	Cães
Assemblage E	Artiodátilos
Assemblage F	Gatos
Assemblage G	Roedores

Fonte: adaptado de Xiao e Fayer (2008)

O gênero *Cryptosporidium* atualmente compreende 30 espécies (Tabela 2), havendo evidências de que 14 espécies são capazes de infectar os seres humanos e 13 os bovinos (Šlapetá, 2013). Dentre as espécies capazes de infectar os seres humanos, cinco são responsáveis pela maioria das infecções, tanto em indivíduos imunocompetentes quanto em imunocomprometidos: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis*, sendo *C. parvum* e *C. hominis* as principais espécies encontradas em surtos de veiculação hídrica. *C. hominis* apresenta ciclo predominantemente antroponótico, enquanto o *C. parvum* infecta, além de humanos, bovinos e outros ruminantes, apresentando, portanto, ciclo zoonótico (FRANCO, 2007).

Tabela 2 – Espécies de *Cryptosporidium* e respectivos hospedeiros

Espécies	Tipo de hospedeiro
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Bovinos
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	Aves
<i>Cryptosporidium bovis</i>	Gado
<i>Cryptosporidium canis</i>	Cães, humanos
<i>Cryptosporidium fayeri</i>	Canguru vermelho
<i>Cryptosporidium felis</i>	Gatos, humanos
<i>Cryptosporidium galli</i>	Galináceos
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Humanos
<i>Cryptosporidium macropodum</i>	Canguru cinza
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Peru, humanos
<i>Cryptosporidium molnari</i>	Peixes
<i>Cryptosporidium muris</i>	Roedores, humanos
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Ruminantes, humanos
<i>Cryptosporidium scophthalmi</i>	Peixes
<i>Cryptosporidium serpentis</i>	Cobras
<i>Cryptosporidium suis</i>	Suínos, humanos
<i>Cryptosporidium varanii</i>	Répteis
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	Preá-da-Índia

Fonte: adaptado Xiao e Fayer (2008) e Franco (2007)

Baldursson e Karanis (2011) registram que do final do século passado até 2004 foram relatados, mundialmente, 325 surtos de doenças de veiculação hídrica causados por protozoários patogênicos, enquanto que de 2004 a 2010, período de apenas sete anos, 199 surtos. *Cryptosporidium* spp. foi o agente etiológico identificado em 60,3% (120) dos surtos notificados (distribuídos por países tais como Irlanda, Nova Zelândia, Reino Unido, Austrália, Suécia, Turquia, Noruega, Japão, Alemanha, Malásia e Estados Unidos da América - EUA) e *Giardia* em 35,1% (70) dos casos (distribuídos por países como EUA, Finlândia, Noruega, Austrália, Nova Zelândia, Turquia e Malásia); outros protozoários foram responsáveis por 4,5% (9) dos surtos. No Brasil, como citado por Bastos *et al.* (2009), existem vários relatos da circulação de *Giardia* e *Cryptosporidium* no ambiente, incluindo esgotos sanitários e águas superficiais (FARIAS, 2000; VIEIRA *et al.*, 2000; FRANCO *et al.*, 2001; HACHICH *et al.*, 2004; BASTOS *et al.*, 2004; LADEIA *et al.* 2005; FALCCHI, 2006). Entretanto, ainda não existem casos comprovados de surtos de giardiose e de criptosporidiose de transmissão hídrica no país.

Estudos de epidemiologia molecular têm revelado que a espécie predominante na transmissão humana varia dependendo do país considerado, já que existem

diferenças na distribuição geográfica das espécies de *Cryptosporidium*. Estudos conduzidos no Brasil, Índia, Quênia, Malawi, Peru, Tailândia, África do Sul e Vietnã demonstraram que entre 70 - 90% das infecções em humanos nesses países resultaram de contaminação por *C. hominis*; em contrapartida, estudos realizados no Reino Unido, comprovaram que *C. parvum* foi responsável por mais casos de infecções (XIAO e FAYER, 2008).

De acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* dos EUA, os grupos de maior exposição à *Cryptosporidium* e *Giardia* e de maior risco de infecção por esses agentes são: (i) crianças que frequentam creches; (ii) pais de crianças infectadas; (iii) pessoas que entram em contato com águas contaminadas; (iv) pessoas que lidam com gado; (v) viajantes internacionais e (vi) pessoas expostas a fezes humanas através do contato sexual; crianças e indivíduos imunocomprometidos são os grupos mais afetados (CDC, 2014).

*Giardia* e *Cryptosporidium* apresentam ciclos biológicos bastante similares, com um forte componente de transmissão fecal-oral de cistos (*Giardia*) e de oocistos (*Cryptosporidium*) por ingestão com alimentos e águas contaminadas, pois perfazem seus ciclos no trato gastrointestinal dos hospedeiros.

Com relação ao *Cryptosporidium*, após os oocistos serem ingeridos, os esporozóitos, no caso das espécies que infectam os seres humanos, são liberados no intestino delgado e invadem as células epiteliais (Figura 1); as etapas endógenas subsequentes são intracelulares, mas extracitoplasmáticas (XIAO e FAYER, 2008).

Os oocistos, único estágio exógeno documentado, variam de 4 a 6 µm de diâmetro e são constituídos por uma membrana trilaminar que envolve e mantém viáveis os quatro esporozoítos internos contra condições ambientais adversas. No caso das espécies que infectam os seres humanos, mudanças de temperatura e de pH, presença de sais biliares e enzimas pancreáticas, dissolvem a estrutura do oocisto liberando os esporozoítos (ROSE *et al.*, 2002; CAREY *et al.*, 2004; FAYER e XIAO, 2007; DUMÈTRE *et al.*, 2012)

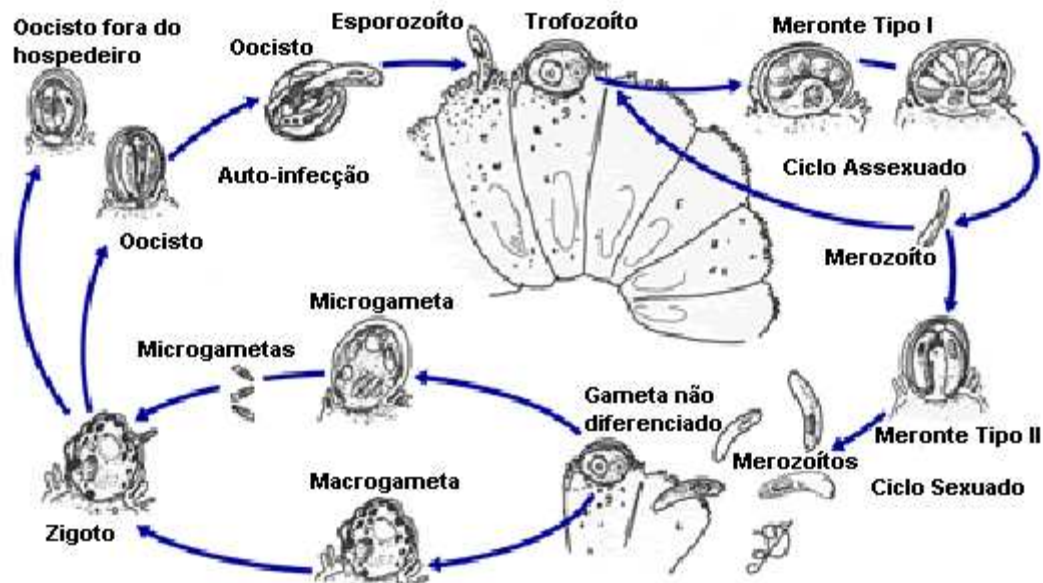


Figura 1 - Ciclo biológico do *Cryptosporidium* em seres humanos  
 Fonte: CDC(2014)

*Giardia* apresenta ciclo biológico mais simplificado se comparado ao do *Cryptosporidium* (Figura 2). No caso dos genótipos que infectam os seres humanos, *assemblage A* e *B*, os trofozoítos colonizam o duodeno e o jejuno se fixando na mucosa intestinal. O ciclo biológico desse gênero é composto por dois estágios (i) multiplicação do trofozoíto e (ii) encistamento. Os cistos de *Giardia* quando ingeridos, passam pelo estômago onde o ambiente ácido desencadeia o desencistamento. Os trofozoítos se anexam à mucosa duodenal ou jejunal proximal, provavelmente através de contração do disco ventral, e se replicam por divisão binária. A formação de cistos ocorre à medida que os trofozoítos se locomovem pelo cólon (MARSHALL *et al.*, 1997).

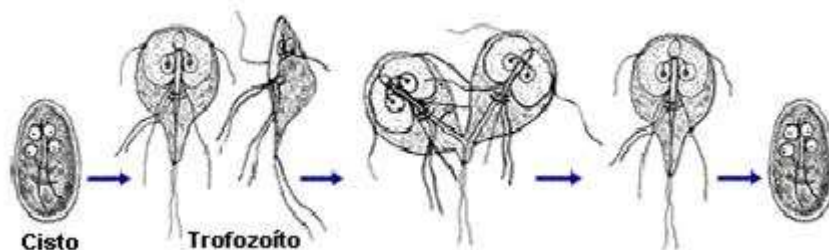


Figura 2 - Ciclo biológico da *Giardia* em seres humanos  
 Fonte: CDC (2014)

A robustez e persistência ambiental dos oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* são reconhecidos fatores que contribuem para sua transmissão via

consumo de água, sendo importante anotar que, como observado por Robertson e Gjerde (2004), algumas espécies do mesmo gênero apresentam maior resistência do que outras.

A circulação de *Giardia* e *Cryptosporidium* em diferentes matrizes ambientais, água e solo, por exemplo, depende de como esses parasitas interagem com o meio à sua volta, principalmente com partículas orgânicas e inorgânicas. A membrana dos cistos assume um papel importante na persistência ambiental devido às forças hidrofóbicas e forças eletrostáticas, atrativas e repulsivas, criadas pela membrana, que podem aumentar ou impedir a adesão dos protozoários a material particulado (DUMÈTRE *et al.*, 2012).

### **3.2 Remoção de *Giardia* e *Cryptosporidium* por meio do tratamento da água em ciclo completo**

O tratamento convencional de água, também chamado de tratamento em ciclo completo, é um termo utilizado para descrever a sequência de etapas que envolve processos físicos, químicos e físico-químicos comumente utilizados para a clarificação e desinfecção da água: mistura rápida e coagulação, floculação, decantação e, ou flotação, filtração e desinfecção. Dependendo das características da água (turbidez mais baixa, por exemplo), se pode optar pela técnica de tratamento por filtração direta, que dispensa a decantação (ou flotação).

Esses processos possibilitam a remoção de (oo)cistos de protozoários patogênicos por processos físicos como a decantação e filtração, porém precedidos de condicionamento químico (coagulação) e floculação. A efetividade da inativação por desinfecção dependerá do agente desinfetante, pois os (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* são altamente resistentes à ação do cloro, mas suscetíveis a outros agentes tais como dióxido de cloro, ozônio e radiação UV (BETANCOURT e ROSE, 2004, SINCLAIR *et al.*, 2011). A coagulação consiste em alterar as propriedades físico-químicas das partículas em suspensão na água por meio de um agente químico (coagulantes primários e, ou auxiliares de floculação), combinando a ação individual ou conjunta de quatro mecanismos (i) compressão da camada difusa (ii) adsorção e neutralização de cargas, (iii) varredura e (iv) formação de pontes interpartículas.

Partículas em suspensão ou dispersões coloidais tendem a adquirir carga elétrica negativa, o que compromete a coagulação pela ação de forças de repulsão eletrostática. Portanto, a remoção de partículas e substâncias responsáveis pela turbidez e cor da água por meio de técnicas de clarificação da água é influenciada pela capacidade de neutralizar o potencial elétrico em torno das partículas, o chamado potencial zeta (pz), ou seja, a carga superficial das partículas e microrganismos, mensurada pela mobilidade eletroforética.

Ongerth e Percoraro (1995) observaram que o pz, tanto de oocistos de *Cryptosporidium*, quanto de cistos de *Giardia*, em água destilada e pH neutro, foi de aproximadamente -35mV. Drozd e Schwartzbrod (1996) encontraram valor próximo a -25 mV para oocistos em água deionizada e pH em torno de 7. Em ambos os estudos, observou-se aumento do potencial com diminuição do pH, aproximando-se de 0 mV. Em pH ácido mais íons estão disponíveis neutralizando as cargas elétricas negativas elevando o pz

Bustamante *et al.* (2001) estudaram a interação entre oocistos de *Cryptosporidium* e sais de ferro e alumínio. O cloreto férrico exerceu influência no pz dos oocistos quando houve predomínio do mecanismo de varredura. No entanto, quando o sulfato de alumínio foi utilizado como coagulante, as espécies hidrolisadas de alumínio teriam sido adsorvidas na superfície dos oocistos provocando a diminuição do pz, sugerindo que nesse caso tenha predominado o mecanismo de coagulação por adsorção e neutralização de cargas.

A floculação é o processo responsável pela formação dos flocos, com características adequadas para remoção nas etapas subsequentes de decantação (ou flotação) e, ou filtração. É controlado, essencialmente, pelo tempo de detenção hidráulica (TDH) e pelos gradientes de velocidade. Alguns autores relacionam maior eficiência de remoção de cistos e oocistos com maior turbidez da água bruta, o que pode promover melhor formação de flocos e conseqüente retenção dos patógenos nos flocos (DUGAN *et al.*, 2001; ASSAVASILAVASUKUL *et al.*, 2008).

A decantação é um processo físico que, em decorrência da ação da gravidade, permite o movimento descendente das partículas suspensas em meio líquido, propiciando a clarificação da água. A velocidade de sedimentação depende das

dimensões, forma e massa das partículas. Com relação aos protozoários, as baixas densidades e velocidades de sedimentação dos (oo)cistos são fatores que influenciam o potencial de remoção por decantação. Conforme sintetizado em Bastos *et al.* (2009), oocistos de *Cryptosporidium* apresentam densidade entre 1.009 - 1.045 kg m<sup>-3</sup> e velocidade de sedimentação entre 0,2 - 0,8 μm s<sup>-1</sup>, enquanto cistos *Giardia* apresentam densidade entre 1.013 - 1.036 kg. m<sup>-3</sup>, com velocidade de sedimentação entre 0,60 - 1,4 μm s<sup>-1</sup>, sendo mais facilmente removidos (MEDEMA *et al.*, 1998; SEARCY *et al.*, 2005; DAI e BOLL, 2006). Entretanto, quando aderidos em material particulado, os (oo)cistos têm sua velocidade aumentada. Searcy *et al.* (2005), avaliando a velocidade de sedimentação de oocistos de *Cryptosporidium* sob diferentes condições, encontraram valores de 0,76 μm.s<sup>-1</sup> para os oocistos isoladamente, 53,3 μm.s<sup>-1</sup> quando os oocistos foram misturados em suspensão de óxido de ferro e 7,9 μm.s<sup>-1</sup> em meio à partículas em suspensão.

Dependendo do desinfetante utilizado, a filtração pode constituir a etapa final de remoção de (oo)cistos e, como já mencionado, sua eficiência depende, inicialmente, da eficiência da etapa de coagulação. No caso da filtração direta isso se torna ainda mais crítico, pois a sequência de tratamento envolve menos barreiras de proteção (inexistência de decantação ou flotação).

De acordo com Emelko *et al.* (2003), a remoção de oocistos de *Cryptosporidium* por filtração envolve os mesmos mecanismos de remoção das partículas presentes na água: (i) transporte, (ii) aderência ao e (iii) desprendimento do leito filtrante. Assim, dentre os fatores que interferem no processo de filtração estão incluídos: (i) as características da suspensão (da água afluyente aos filtros), como pH, pz, tamanho, concentração e densidade das partículas; (ii) a taxa de filtração e (iii) as características dos meio filtrante: granulometria e espessura do leito.

O tamanho dos oocistos de *Cryptosporidium* (4 a 6 μm) e dos cistos *Giardia* (9 a 14 μm) é uma possível explicação para a melhor remoção de cistos do que de oocistos. A redução do tamanho dos grãos ou aumento da espessura do leito naturalmente tende a aumentar a eficiência da filtração (LeCHEVALLIER e AU, 2004). Thurson *et al.* (2000) observaram que a elevação das taxas de filtração determinou situações de traspases de partículas de tamanhos próximos aos dos

oocistos. A influência da taxa de filtração na remoção de organismos patogênicos tem sido investigada em diversos estudos, mas ainda com resultados inconclusivos (HALL *et al.*, 1995; SWERTFEGER *et al.*, 1999; DUGAN *et al.* 2001; HARRINGTON *et al.*, 2003; DUGAN e WILLIAMS, 2004).

A lavagem dos filtros é uma etapa muito importante na remoção de (oo)cistos, já que durante os períodos de amadurecimento do filtro - logo após a lavagem - e anteriormente à lavagem, próximo ao fim da carreira de filtração, o trespasse pode ser favorecido (ONGERTH e PERCORARO, 1995; FAGUNDES, 2006; FERNANDES, 2007; LOPES, 2008). Shaw *et al.* (2000) observaram que o mecanismo de aderência de oocistos ao leito filtrante é influenciado pela mudança no pz da areia, uma vez que o leito filtrante também tem carga.

A literatura registra ampla variação de eficiência de remoção de (oo)cistos no tratamento da água, dependendo da qualidade da água, das condições experimentais e das técnicas de quantificação de (oo)cistos. Por exemplo, em geral, estudos em escala de bancada ou piloto resultam em eficiência de remoção superior àquelas usualmente verificadas em monitoramentos de ETAs em escala real.

Conforme sintetizado por Bastos *et al.* (2009), segundo LeChevallier e Au (2004), sob condições otimizadas, a remoção de cistos de *Giardia* e de oocistos de *Cryptosporidium* na decantação e no tratamento em ciclo completo (até a filtração) pode alcançar, respectivamente, 1-2 log e 4 log. Alguns estudos indicam ainda que a filtração direta pode alcançar eficiência de remoção de (oo)cistos comparável à do tratamento convencional (NIEMINSKY, 1995).

Porém, ainda como resumido por Bastos *et al.* (2009), com base em ampla revisão de literatura, a USEPA (2006) assume 0,5 log de remoção de oocistos de *Cryptosporidium* na decantação e 3 log no tratamento em ciclo completo, ou seja, remoção de 2,5 log na filtração direta. Em versão anterior, a USEPA (1991) admitia 2,5 e 2 log de remoção de cistos de *Giardia*, respectivamente no tratamento convencional e na filtração direta. Entretanto, como será visto a seguir, esses créditos de remoção atribuíveis a essas técnicas de tratamento estão relacionados à turbidez da água filtrada. De toda forma, cabe destacar que esse alcance de remoção e sua associação com a turbidez é o que fundamenta, nesse aspecto, a norma dos EUA de qualidade da

água para consumo humano e que isso tem sido adotado também em normas similares mundo afora, inclusive no Brasil.

No Brasil, Lopes (2008), em experimentos de inoculação de oocistos de *Cryptosporidium* em ETA piloto de tratamento em ciclo completo, obteve os seguintes valores médios de remoção (inferiores, portanto, ao sugerido na literatura como potencial de remoção): (i) decantação: 0,65 log; (ii) filtração: 0,85 log; (iii) decantação + filtração: 1,38 log.

Também em estudos em escala piloto, mas abrangendo maior variedade de técnicas de tratamento, Cerqueira (2008) obteve os seguintes valores médios de remoção, superiores e mais próximos ao sugerido na literatura para, respectivamente, decantação e filtração: (i) decantação convencional: 2,2 log; (ii) decantação de alta taxa: 2 log; (iii) tratamento convencional: 2,6 log; (iv) dupla filtração: 2,7 log; (v) filtração dupla descendente: 2,6 log.

Fagundes (2006) e Fernandes (2007), avaliando a filtração direta em, respectivamente, filtro descendente de camada de areia e filtro de dupla camada, de antracito sobre areia, obtiveram valores de remoção de (oo)cistos de *Cryptosporidium* entre 1,4 - 3,2 log. Bastos *et al.* (2004), avaliando ao longo de doze meses duas estações de tratamento de água em ciclo completo abastecidas pelo mesmo manancial, encontraram remoções médias de 1,6 e 2,25 log de cistos de *Giardia* e de 0,89 e 1,71 log de oocistos de *Cryptosporidium*, para cada ETA, respectivamente.

### **3.3 Emprego de indicadores da remoção/inativação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* por meio do tratamento da água**

No campo da qualidade da água para consumo humano, o monitoramento rotineiro da presença de patógenos revela-se inviável, tanto no aspecto técnico quanto econômico, em razão da grande diversidade de patógenos possíveis de serem veiculados via abastecimento de água para consumo humano, das baixas concentrações em que os patógenos se encontram na água (mais ainda na água tratada), do alto custo das análises e de limitações analítico-laboratoriais, tais como limite de detecção e taxa de recuperação (BASTOS *et al.*, 2000). Assim sendo, o

procedimento de rotina no controle da qualidade microbiológica da água tem sido o emprego de indicadores da eficiência do tratamento.

Para a avaliação da eficiência de processos de tratamento na remoção de patógenos, o emprego de organismos indicadores deve partir do seguinte entendimento: (i) a ausência do organismo indicador no efluente tratado indicaria a ausência de patógenos, pela inativação e/ou remoção de ambos; (ii) a presença dos indicadores no efluente tratado se daria em populações remanescentes às quais corresponderia a ausência de patógenos ou, eventualmente, à presença de patógenos em concentrações correspondentes a níveis de risco toleráveis. Nesse sentido, para que um organismo cumpra o papel de indicador da eficiência do tratamento, torna-se necessário que: (i) o indicador apresente resistência superior ou similar a dos patógenos aos processos de tratamento; (ii) o mecanismo de remoção de ambos (patógenos e indicadores) seja similar (BASTOS *et al.*, 2003).

Do exposto, conclui-se que os indicadores mais usualmente utilizados – as bactérias do grupo coliforme – não se prestam à avaliação da qualidade parasitológica da água tratada. Isso porque, em geral, bactérias são facilmente inativadas em processos de desinfecção, enquanto os cistos de protozoários são, por um lado, altamente resistentes à desinfecção (particularmente à cloração), mas por outro, são removidos nas etapas de clarificação da água, principalmente, a filtração.

Nesses casos, torna-se necessário o emprego de outros indicadores, mais usualmente, a turbidez e o produto *Ct* (residual desinfetante e tempo de contato), respectivamente, na avaliação da eficiência da filtração e da desinfecção.

### **3.3.1 Turbidez como parâmetro indicador da eficiência de remoção de protozoários patogênicos em processos de clarificação da água (decantação e filtração)**

A turbidez é uma expressão da propriedade ótica que causa espalhamento e absorção da luz e é provocada por partículas em estado coloidal e em suspensão - matéria orgânica e inorgânica finamente dividida, plâncton e outros organismos microscópicos (USEPA, 1999). É de mensuração analítica extremamente simples e de baixo custo e, ao mesmo tempo, altamente informativa em termos da presença e

remoção de material particulado na água. Por isso, é a variável mais comumente utilizada no controle operacional de processos de clarificação da água (decantação e filtração).

No que tange ao emprego da turbidez, ou da remoção de turbidez, como indicador da remoção de cistos de *Giardia* e de oocistos de *Cryptosporidium* por filtração, apesar de não se dispor de informações conclusivas sobre limites numéricos que assegurem remoção efetiva de (oo)cistos, no mínimo se reconhece a importância da produção de água filtrada com a menor turbidez possível (WHO,2011) De forma similar, também não há informações consolidadas sobre relações numéricas entre a remoção de turbidez e a de (oo)cistos de protozoários, não obstante o fato da literatura registrar sugestões de modelos dessa natureza, como citado a seguir, de Viana (2011).

$$\log \text{rem } Cryptosporidium = 0,931 \log \text{rem turbidez} + 1,009 (R^2 = 0,55) \quad (1)$$

Nieminski e Ongerth (1995)

$$\log \text{rem } Giardia = 0,892 \log \text{em turbidez} + 0,694 (R^2 = 0,78) \quad (2)$$

LeChevallier e Norton (1992)

$$\log \text{rem } Cryptosporidium = 0,996 \log \text{rem turbidez} + 0,494 (R^2 = 0,77) \quad (3)$$

LeChevallier e Norton (1992)

$$\log \text{rem } Cryptosporidium = 0,991 \log \text{rem turbidez} + 0,2307 (R^2 = 0,58) \quad (4)$$

Lopes (2008)

$$\log \text{rem } Giardia = 1,0093 \log \text{rem turbidez} + 1,6697 (R^2 = 0,64) \quad (5)$$

Nieminski e Ongerth (1995)

De todo modo, em várias normas de qualidade da água para consumo humano valores limites de turbidez para água filtrada são de fato entendidos como padrão indicativo da qualidade parasitológica da água. Como a norma dos EUA é, nesse aspecto, referência no cenário internacional, a seguir são sintetizadas, como em Bastos *et al.* (2009), as prescrições vigentes (USEPA, 2006) e anteriores (USEPA, 1991) sobre controle de protozoários, tendo-se em conta que *Cryptosporidium* é o organismo-referência (ou alvo) na norma vigente enquanto em versões anteriores era *Giardia*.

#### USEPA (1991)

Remoção de cistos de *Giardia*: (i) 2,5 log por filtração rápida em tratamento convencional com turbidez da água filtrada  $\leq 0,5$  uT em 95% dos dados mensais e máximo de 5,0 uT; (ii) 2,0 log por filtração direta com turbidez da água filtrada  $\leq 0,5$  uT em 95% dos dados mensais e máximo de 5,0 uT; (iii) 2,0 log por filtração lenta com turbidez da água filtrada  $\leq 1,0$  uT em 95% dos dados mensais e máximo de 5,0 uT.

#### USEPA (2006)

Remoção de oocistos de *Cryptosporidium*: (i) 3 log por filtração rápida em tratamento convencional com turbidez da água filtrada  $\leq 0,3$  uT em 95% dos dados mensais e máximo de 1,0 uT; (ii) 2,5 log por filtração direta com turbidez da água filtrada  $\leq 0,3$  uT em 95% dos dados mensais e máximo de 1 uT; (iii) 0,5 log adicional por tratamento convencional ou filtração direta com turbidez da água filtrada  $\leq 0,15$  uT (95% dos dados mensais); (iv) 3 log por filtração lenta com turbidez da água filtrada  $\leq 1,0$  uT em 95% dos dados mensais e máximo de 5,0 uT.

No Canadá, sistemas de abastecimento que utilizam fontes superficiais ou subterrâneas sob influência direta de águas de superfície devem filtrar a água a fim de atender limites de turbidez especificados de acordo com as técnicas de tratamento utilizadas. Sempre que possível, os sistemas devem ser projetados e operados para reduzir ao máximo possível a turbidez, tendo como meta valores inferiores a 0,1 uT. Quando isso não for possível, os limites de turbidez a serem atendidos são os seguintes (HEALTH CANADA, 2012):

- filtração antecedida por coagulação: turbidez igual ou inferior a 0,3 uT em pelo menos 95% das medições, sem nunca exceder 1,0 uT.
- filtração lenta: turbidez igual ou inferior a 1,0 uT em pelo menos 95% das medições, sem nunca exceder 3,0 uT.
- filtração em membranas: turbidez igual ou inferior a 0,1 uT em pelo menos 99% das medições.

Nota-se, assim, que o padrão de turbidez para água filtrada tende a se tornar cada vez mais rigoroso no cenário internacional. No Brasil, no mesmo sentido, o padrão (tratamento convencional – filtração rápida ou filtração direta) foi reduzido

para 0,5 uT, sendo que a versão anterior da norma anterior preconizava 1 uT (BRASIL, 2004; BRASIL, 2011).

Com base no exposto, deduz-se que o padrão de turbidez de água filtrada da norma brasileira tenha como principal objetivo o controle de *Giardia*, com meta de 2,5 log de remoção. No entanto, a Portaria 2914 / 2011 inclui também as seguintes recomendações com vistas ao controle de *Cryptosporidium*.

*Art. 27. Os sistemas de abastecimento e soluções alternativas coletivas de abastecimento de água que utilizam mananciais superficiais devem realizar monitoramento mensal de Escherichia coli no(s) ponto(s) de captação de água.*

*§ 1º Quando for identificada média geométrica anual maior ou igual a 1.000 Escherichia coli /100 mL deve-se realizar monitoramento de cistos de Giardia spp. e oocistos de Cryptosporidium spp. no(s) ponto(s) de captação de água.*

*§ 2º Quando a média aritmética da concentração de oocistos de Cryptosporidium spp. for maior ou igual a 3,0 oocistos/L no(s) pontos(s) de captação de água, recomenda-se a obtenção de efluente em filtração rápida com valor de turbidez menor ou igual a 0,3 uT em 95% das amostras mensais ou uso de processo de desinfecção que comprovadamente alcance a mesma eficiência de remoção de oocistos de Cryptosporidium spp.*

*§ 3º Entre os 5% do valor recomendado de turbidez superior ao VMP estabelecido no § 2.º do art. 26 desta Portaria, o limite máximo para qualquer amostra pontual deve ser menor ou igual a 1,0 uT.*

### **3.3.2 Produto Ct como parâmetro indicador da eficiência de inativação de protozoários patogênicos em processos de desinfecção da água**

Como já citado, o processo da desinfecção é usualmente controlado pelos valores de Ct (residual desinfetante x tempo de contato) necessários e suficientes para determinada eficiência de inativação (expresso em valores percentuais ou

unidades logarítmicas), sob condições específicas, por exemplo, de pH e, ou temperatura.

No que diz respeito à inativação de cistos de *Giardia*, com base em dados experimentais, a USEPA (1991) desenvolveu o modelo expresso na Equação 6.

$$\log \text{ inativação } \textit{Giardia} = \frac{Ct}{0,2828 \times pH^{2,69} \times C^{0,15} \times 0,933^{t-5}} \quad (6)$$

Onde:

C = concentração de cloro residual livre (mg.L<sup>-1</sup>)

t = tempo de contato (min)

T = temperatura (°C)

Como referido anteriormente, a inativação de oocistos de *Cryptosporidium* com cloro é impraticável. Por exemplo, LeChevallier e Au (2004) reuniram estudos de diferentes autores evidenciando que a inativação de oocistos de *Cryptosporidium* por cloração requer valores elevadíssimos de Ct (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de Ct e de inativação correspondente de oocistos de *Cryptosporidium* com cloro livre

Ct (mg.min/L)	t (°C)	pH	Inativação (%)	Referência
7.200	25	7	> 99	Korich <i>et al.</i> (1990)
3.600	22	8	47	Finch, Kathleen e Gyurek (1994)
1.393.920	10	7	85	Ransome, Whitmore e Carrington (1993)
510	NR	NR	99	Ransome <i>et al.</i> , (1994)

C: cloro residual livre; t: tempo de contato; T: temperatura; NR: não registrado;

Fonte: LeChevallier e Au (2004)

A Portaria 2914 / 2011 estabelece valores mínimos de tempo de contato e de concentração residual de cloro na saída do tanque de contato a serem observados no controle do processo de desinfecção, exemplificados na Tabela 4 para temperaturas de 20 e 25°C. Esses valores têm origem na Equação 6 e se referem a 0,5 log de inativação de cistos de *Giardia*. Isto é, a Portaria 2914 / 2011 visa assegurar 3 log de remoção / inativação de cistos de *Giardia*, por meio da ação combinada da filtração e da cloração.

Tabela 4 - Tempo de contato mínimo (minutos) estabelecido na Portaria 2914 / 2011 para a desinfecção por meio da cloração, de acordo com concentração de cloro residual livre na saída do tanque de contato (C) com a temperatura e o pH da água

C (mg.L <sup>-1</sup> )	Temperatura = 20°C							Temperatura = 25°C						
	Valores de Ph													
	≤6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	≤6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
≤ 0,4	14	17	20	25	29	34	40	9	12	14	18	21	24	28
0,6	10	12	14	17	21	24	28	7	8	10	12	15	17	20
0,8	7	9	11	14	16	19	22	5	6	8	10	11	13	16
1,0	6	8	9	11	13	16	18	4	5	6	8	9	11	13
1,2	5	7	8	10	11	13	16	4	5	5	7	8	10	11
1,4	5	6	7	9	10	11	14	3	4	5	6	7	8	10
1,6	4	5	6	8	9	11	12	3	4	4	5	6	7	9
1,8	4	5	6	7	8	10	12	3	3	4	5	6	7	8
2,0	3	4	5	6	7	9	10	2	3	4	4	5	6	7
2,2	3	4	5	6	7	8	9	2	3	3	4	5	6	7
2,4	3	4	4	5	6	8	9	2	3	3	4	4	5	6
2,6	3	3	4	5	6	7	8	2	2	3	3	4	5	6
2,8	3	3	4	5	6	7	8	2	2	3	3	4	5	5
3,0	2	3	4	4	5	6	7	2	2	3	3	4	4	5

### 3.3.3 Esporos de bactérias aeróbias

Os esporos, células metabolicamente dormentes, são reconhecidos como a forma de vida mais resistente na Terra. Existem relatos de recuperação e revitalização de esporos em amostras ambientais tão antigas quanto 10<sup>5</sup> anos (NICHOLSON *et al.*, 2000; SETLOW, 2006).

Os esporos são assim nomeados porque são formados no interior das células e se diferem das células vegetativas, sendo ópticamente refrateis e altamente resistentes a estresse químicos e físicos, propriedades estas conferidas pela composição química e pela ultraestrutura da parede celular (LOGAN e De VOS, 2009).

A maioria dos organismos aeróbios formadores de esporos são saprófitos cujos principais *habitat* são o solo e a água, sendo usualmente encontrados em sedimentos de fundo de ambientes de água doce e marinha; também têm sido isolados do ar em elevadas altitudes e a partir de fontes subterrâneas profundas (LOGAN, 2011).

A habilidade de formar esporos é definida desde 1920 como uma característica do gênero *Bacillus*, sendo este reconhecido ainda hoje como o

principal representante das bactérias aeróbias formadoras de esporos (LOGAN e De VOS, 2009). Existem outras bactérias formadoras de esporos como, por exemplo, o gênero *Clostridium*, porém sob condições anaeróbias.

Em condições ótimas de disponibilidade de nutrientes, de temperatura e de pH, as células de *Bacillus* crescem e se dividem por divisão binária, sendo que os esporos são formados no final da fase exponencial de crescimento. Dentre os fatores ambientais implicados na indução da esporulação têm sido citados: (i) privação de nutrientes, (ii) temperatura, (iii) pH do meio, (iv) aeração, (v) presença de alguns minerais (LOGAN e De VOS, 2009, LOGAN, 2011).

Os membros do gênero *Bacillus* são descritos como organismos Gram-positivos, em forma de haste (LOGAN e De VOS, 2009) e de ocorrência ubíqua (NICHOLSON *et al.*, 2000, ALCARAZ *et al.*, 2010). Apesar de *Bacillus* ser um dos gêneros bacterianos mais bem caracterizados, com pesquisas desde o século XIX em microbiologia clássica até as mais modernas, incluindo abordagens genômica e proteômica, a organização taxonômica do grupo continua a ser desordenada e muitas vezes confusa (ALCARAZ *et al.*, 2010; BHANDARI *et al.*, 2013).

Existem várias maneiras de classificar esse grupo de bactérias, por exemplo, dividindo-o entre organismos patogênicos, ambientais e aqueles utilizados para fins industriais. As espécies de *Bacillus* são conhecidas pelos papéis de destaque na pós-colheita, no processamento e sabor do cacau, café, baunilha. Muitas vezes, *Bacillus subtilis* é a espécie predominante na produção de alimentos fermentados tradicionais com base em folhas e sementes. Mais recentemente, ficou conhecido o papel dos esporos aeróbios em diversas aplicações, tais como: (i) crescimento de plantas por meio da fixação de nitrogênio, (ii) produção de fitohormônios, (iii) aumento da disponibilidade de nutrientes, (iv) controle biológico de patógenos de plantas e (v) remediação de toxicidade de metais. Alguns esporos aeróbios podem ter se adaptado à vida no trato gastrointestinal de animais de pequeno porte e de grande porte, como os seres humanos (LOGAN, 2011).

Os *Bacillus* ambientais são bastante diversos e incluem as espécies *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. halodurans* e *B. coahuilensis* (ALCARAZ *et al.*, 2010). De modo geral, as bactérias esporogênicas encontradas em águas naturais são quase exclusivamente pertencentes ao gênero *Bacillus*, sendo *Bacillus subtilis* a principal

espécie. O habitat natural dessa espécie é o solo, sendo, portanto, frequentemente presente também em fontes de água (BARBEAU *et al.*, 1998; CARTIER *et al.*, 2009).

As bactérias da espécie *Bacillus subtilis* podem ser caracterizadas por / pela: (i) capacidade de formarem esporos em várias condições de estresse, (ii) crescerem em uma ampla faixa de temperatura, (iii) possuírem motilidade, (iv) taxa de crescimento elevada; (v) sobreviverem em concentrações de sal (até 7% NaCl), e (vi) produzirem grande variedade de antibióticos e de enzimas hidrolíticas (NAKAMURA *et al.*, 1999). Sua identificação é simples: são Gram-positivas, Voges Proskauer positivas, Citrato positivas, hidrolisam o amido e não crescem a 55°C, em 6,5% de NaCl (LOGAN e De VOS, 2009).

Esporos de *Bacillus* spp. têm sido propostos como substitutos de oocistos de *Cryptosporidium* na avaliação de processos de tratamento e em modelagem de transporte no ambiente, pois são estáveis e encontrados em águas naturais em concentrações altas o suficiente para possibilitarem o cálculo de múltiplas reduções logarítmicas. Esporos de *B. subtilis* possuem tamanho médio de aproximadamente 1,2 µm, enquanto oocistos de *Cryptosporidium* possuem 4 - 6 µm, e apresentam potencial zeta bastante similar ao dos oocistos em faixa de pH de 6.5 - 8 (MUHAMMED *et al.*, 2008).

A presença de esporos de bactérias aeróbias pode ser usada para avaliar uma variedade de processos e operações de tratamento de água, incluindo a clarificação. Isso é reconhecido na própria regulamentação dos EUA de qualidade da água para consumo humano, que considera que por fornecer estimativas conservadoras e boa correlação com a remoção de oocistos de *Cryptosporidium* em estações de tratamento de água de ciclo completo, a remoção de esporos de bactérias aeróbias pode ser utilizada para verificação das metas de remoção de oocistos (USEPA, 2006).

Brown e Cornwell (2007) também sugerem que o monitoramento de esporos de bactérias aeróbias pode ser utilizado na avaliação da capacidade de estações de tratamento em remover *Cryptosporidium* em processos de clarificação da água.

Nieminski *et al* (2000) analisaram a água bruta e tratada de 24 estações de tratamento nos EUA e encontraram remoção média de 2,8 log esporos de bactérias

aeróbias. Resultado semelhante foi encontrado por Huertas *et al.* (2003): 3 log de remoção de esporos por processos de clarificação da água. Dugan *et al.* (2001) também obtiveram dados que indicam que esporos aeróbios podem servir como substitutos para avaliar a remoção de *Cryptosporidium* por sedimentação.

Por serem resistentes ao cloro, sugere-se também a utilização de esporos de bactérias aeróbias como indicadores da qualidade da água desinfetada (CRAIK *et al.*, 2002; CARTIER *et al.*, 2009, WHO, 2011). De acordo com Sinclair *et al.* (2011), a resistência de microrganismos aos desinfetantes mais comuns, geralmente segue a seguinte ordem, do mais para o menos resistente: esporos de bactérias, cistos de protozoários, vírus e células bacterianas. Além dos processos de desinfecção por cloração, alguns pesquisadores relatam que esporos da bactéria *Bacillus subtilis* são úteis na avaliação de inativação de *Cryptosporidium parvum* por ozônio em processos de tratamento de água (FACILE *et al.*, 2000; CRAIK *et al.*, 2002; MAZOUA e CHAUVEHEID, 2005).

Embora *Bacillus subtilis* seja a principal representante do gênero, outras espécies como, por exemplo, *Bacillus megaterium* e *Bacillus pumilus*, também encontradas em solo, têm sido propostas como indicadores da eficiência da inativação de *Cryptosporidium* (GARVEY *et al.*, 2013).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho consistiu, essencialmente, na pesquisa de esporos de bactérias aeróbias ao longo do processo de tratamento da estação de tratamento de água da Universidade Federal de Viçosa (ETA UFV), a qual vem brevemente descrita a seguir, bem como o detalhamento dos métodos utilizados nos trabalhos de campo, de laboratório e na análise dos resultados.

### 4.1 Características da ETA UFV

A universidade Federal de Viçosa (UFV) conta com um sistema próprio de abastecimento de água. O sistema é suprido por um manancial superficial de vazão reduzida – ribeirão São Bartolomeu ( $\sim 100\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  e  $\sim 200\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  em épocas de estiagem e chuvas, respectivamente), com dois represamentos consecutivos a montante do ponto de captação. A bacia de captação é desprotegida, com ocupação urbana crescente e atividades agropecuárias relativamente intensas.

Durante o período de monitoramento a ETA UFV tratou cerca de  $33\text{ L}\cdot\text{s}^{-1}$  com período de operação médio diário de oito horas, sendo empregado o tratamento em ciclo completo: coagulação com sulfato de alumínio, mistura rápida hidráulica em calha Parshall, floculador hidráulico de fluxo vertical, decantador circular (taxa de aplicação superficial média de  $11,5\text{ m}^3\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ), dois filtros rápidos (taxa de filtração média  $139,5\text{ m}^3\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ) e desinfecção com cloro gás em tanque de contato com volume de  $33,7\text{ m}^3$  e tempo de contato médio de 13 min.

A carreira de filtração média dos filtros era de, aproximadamente, 36 h, sendo a retrolavagem efetuada a partir de reservatório elevado com capacidade de  $100\text{ m}^3$ , com duração de cerca de 8 min. A Figura 3 apresenta unidades de tratamento da ETA UFV.

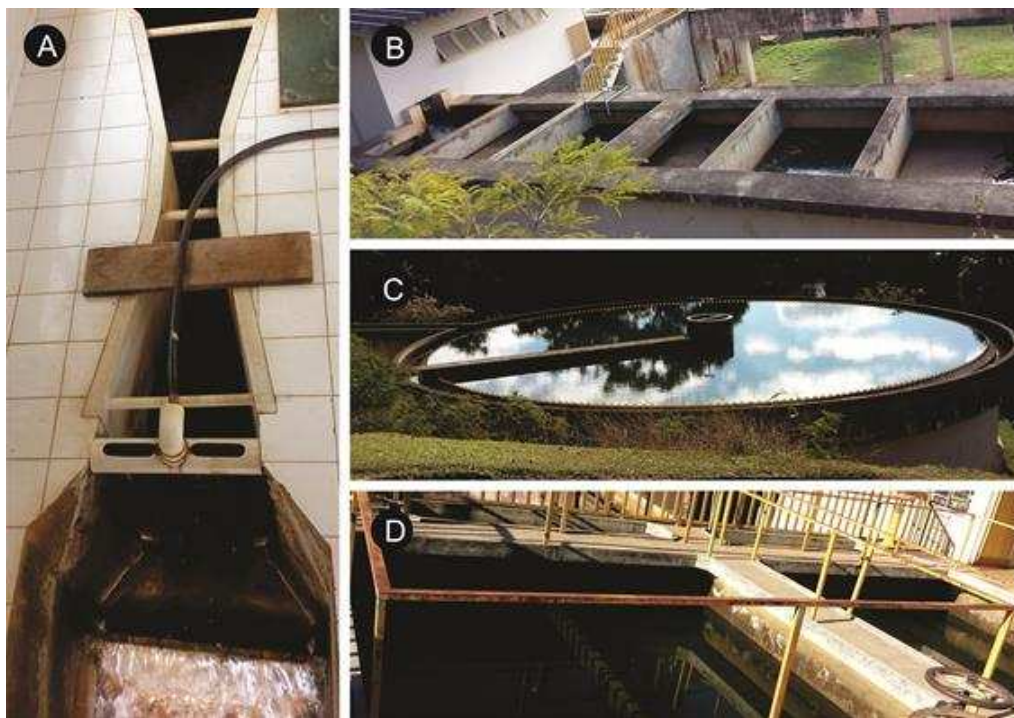


Figura 3 - ETA UFV: (A) calha Parshall; (B) floculador; (C) decantador; (D) vista dos filtros.

## 4.2 Coleta e análise laboratorial de amostras de água

### 4.2.1 Amostragem

Durante onze meses, de março de 2014 a fevereiro de 2015, portanto, contemplando variações sazonais climáticas e de qualidade da água, foram coletadas amostras de: (i) água bruta, na chegada da água na ETA – entrada da calha Parshall; (ii) água decantada, no canal de conexão do decantador aos filtros; (iii) água filtrada, em torneira instalada na tubulação que reúne os efluentes dos dois filtros e os conecta ao tanque de contato; e (iv) água desinfetada, em torneira instalada na tubulação na saída do tanque de contato, conectando-o aos reservatórios de distribuição.

A amostragem foi realizada com frequência semanal, de forma pontual, sempre no período da tarde. Ao todo, foram coletadas 41 amostras de água bruta, decantada e filtrada tratada, e 36 de água tratada (clorada). Nas amostras de água desinfetada, foi introduzido no frasco de coleta 0,1 mL de solução 3% de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), agente de cloração, para cada 120 mL de água coletada (APHA, 2012).

## **4.2.2 Análises laboratoriais**

Todas as amostras de água foram submetidas à análise de esporos de bactérias aeróbias e confirmação da espécie *Bacillus subtilis*. Foram utilizados dados secundários de turbidez provenientes do controle operacional de rotina da ETA UFV, realizado com turbidímetro Hach 2100AN digital de bancada.

As análises foram realizadas no Laboratório de Controle da Qualidade da Água, vinculado à Divisão de Água e Esgotos da UFV (órgão responsável pela operação da ETA), de acordo com a metodologia descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 22<sup>a</sup> Edição (APHA, 2012).

A etapa inicial da pesquisa de esporos de bactérias aeróbias é realizada por meio da técnica de membrana filtrante do *Standard Methodos for the Examination of Water and Wastewater*. Com fins de assegurar a obtenção de número de colônias considerado adequado para contagem – 20 a 200, as análises eram realizadas em quatro diluições decimais, em duplicata para cada diluição. As colônias que se desenvolviam na membrana após incubação e que eram similares morfológicamente às colônias de *Bacillus subtilis* (AGUILAR *et al.*, 2007) eram isoladas para posterior confirmação da espécie por meio de testes morfológicos e fisiológicos.

Conforme já referido, a coleta de amostras na ETA UFV foi realizada até fevereiro de 2015, no entanto o isolamento para especiação se estendeu apenas até 02 de setembro de 2014. No total, foram isoladas 310 colônias de esporos bacterianos para proceder aos testes bioquímicos. A partir dessa data, em virtude da pouquíssima variação dos resultados, optou-se por não mais dar continuidade aos testes bioquímicos. O teste de tolerância à salinidade foi realizado em 295 colônias e o teste Voges - Proskauer (ambos descritos no item 4.2.2.2) em 309 colônias, por problemas analíticos.

### **4.2.2.1 Análise de esporos de bactérias aeróbias**

As amostras coletadas eram submetidas às seguintes etapas: (i) tratamento térmico; (ii) filtração em membrana; (iii) incubação e (iv) contagem das colônias (NIEMINSKI *et al.*, 2000).

A primeira etapa consiste no choque térmico para inativação das células vegetativas de bactérias. As amostras eram mantidas em banho Maria com agitador a 80°C por 12 min e 70 rpm e, logo em seguida, resfriadas em banho de gelo até atingir a temperatura ambiente.

A segunda etapa consiste na filtração das amostras, em vácuo de 100 a 200 mm de mercúrio, e membrana filtrante de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, plana e quadriculada. Para alíquotas com volumes inferiores a 10 mL, 50 mL de água tamponada estéril (tampão de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2) eram adicionados para homogeneizar a amostra antes do processo de filtração. Após a filtração das alíquotas, as superfícies internas dos copos eram lavadas com 50 mL da mesma água tamponada. Por fim, as membranas eram retiradas dos porta-filtros e colocadas sobre Ágar Nutriente com Azul de Tripán.

Após a filtração, as amostras eram mantidas por 24 horas a 35°C em câmara úmida para desenvolvimento das colônias. Com auxílio de microscópio estereoscópico, todas as colônias que se desenvolveram sobre a superfície das membranas eram contadas como derivadas de esporos de bactérias aeróbias. A Figura 4 apresenta um esquema dos processos analíticos para determinação de esporos de bactérias aeróbias nas amostras filtradas.

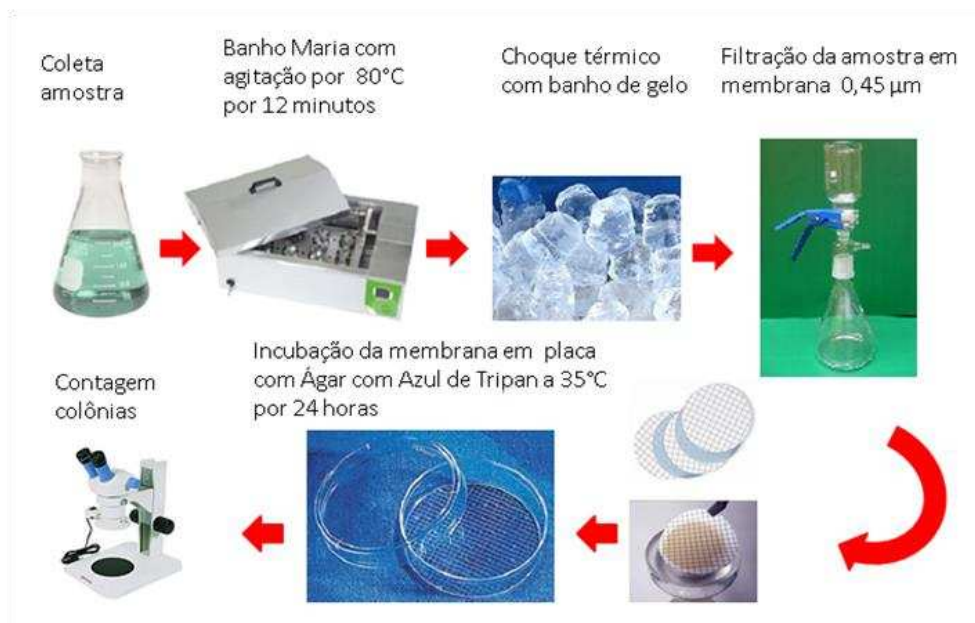


Figura 4 - Esquema da análise de esporos de bactérias aeróbias

#### **4.2.2.2 Confirmação da espécie de *Bacillus***

As colônias que se desenvolveram na superfície da membrana foram isoladas em ágar contendo 0,1% de amido. A identificação das bactérias foi realizada observando características morfológicas e fisiológicas (LOGAN e De VOS, 2009). Para confirmação da espécie *Bacillus subtilis*, as colônias isoladas foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos (i) coloração de Gram; (ii) presença de amilase; (iii) Voges – Proskauer; (iii) citrato de Simmons; (iv) tolerância a salinidade (NaCl 6,5%), além da observação de aspectos morfológicos da colônia e da bactéria (Figura 5).

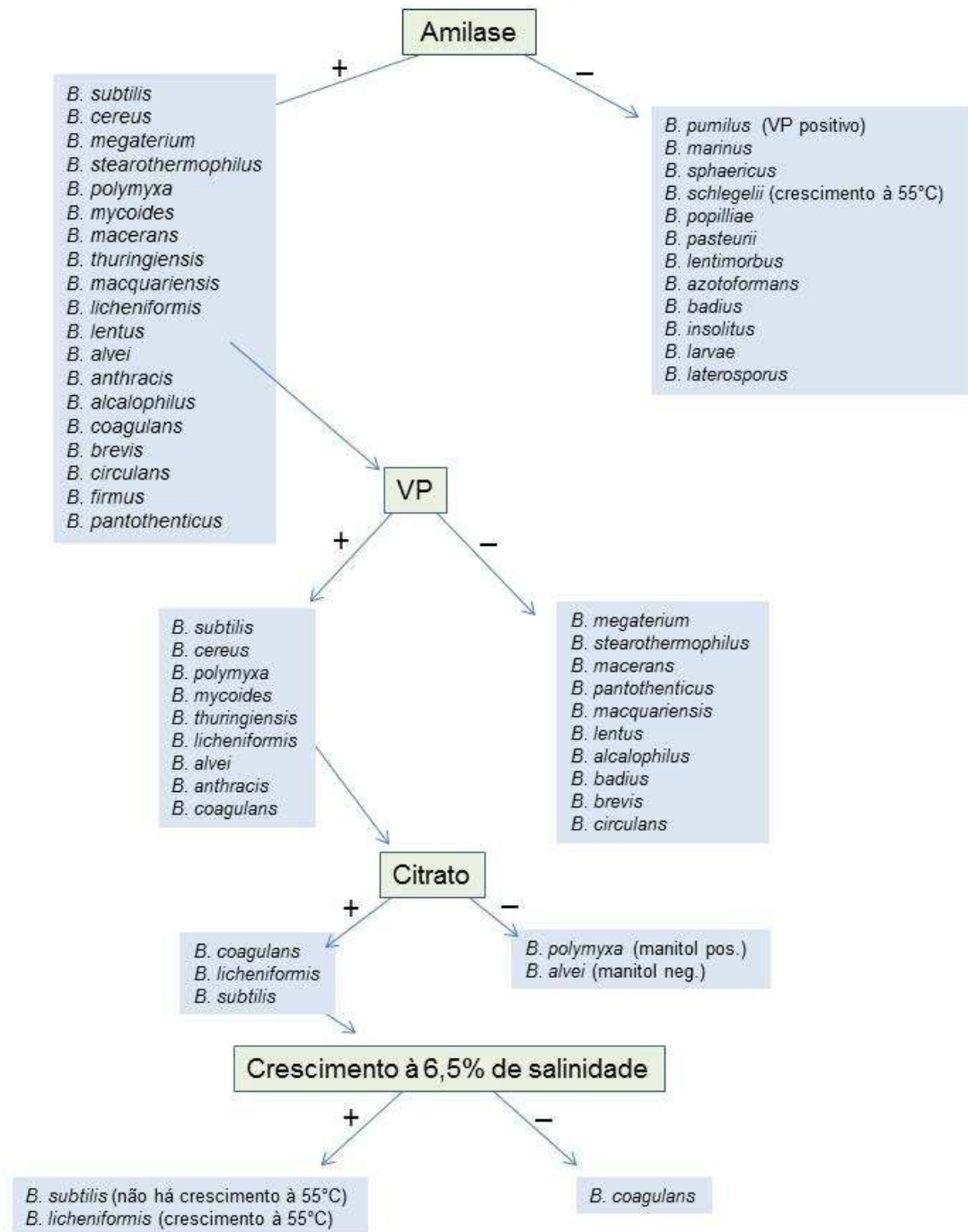


Figura 5 - Fluxograma de identificação de *Bacillus* spp.

As provas bioquímicas foram realizadas de acordo com o Manual prático de microbiologia aplicada (LACAZ - RUIZ, 2000) com modificações. Para os testes Voges – Proskauer, Citrato de Simmons e tolerância à salinidade (NaCl 6,5%) foram utilizadas colônias recentes com 24 h de incubação no meio Ágar. Já para os testes coloração de Gram e de presença de amilase foram utilizadas as mesmas colônias, mas com 48 h de incubação.

- Coloração de Gram

O teste de coloração diferencial de Gram foi realizado a partir de esfregaços das colônias em lamínula, seca ao ar livre, com os seguintes procedimentos: (i) corar o esfregaço com cristal violeta e deixar agir por 1 minuto; (ii) lavar a coloração com água destilada; (iii) cobrir o esfregaço com a solução de Lugol por 1 minuto; (iv) lavar o excesso de Lugol com água destilada; (v) lavar a preparação com etanol 95%; (vi) lavar o excesso de álcool com água destilada; (vii) cobrir o esfregaço com solução de safranina por 30 segundos; (viii) lavar o excesso de safranina com água destilada; (ix) esperar secar ao ar livre; (x) levar ao microscópio e observar a coloração final, sendo que roxo indica gram-positivo e vermelho gram-negativo.

- Hidrólise do amido

*Bacillus subtilis* são bactérias que produzem amilase, enzima extracelular capaz de hidrolisar o amido. A ação dessa enzima era evidenciada estriando a bactéria a ser testada em meio sólido contendo 0,1% de amido e adicionando, após o crescimento a 35°C por 48 h, solução saturada de iodo (Lugol - 1 g de iodo metálico e 2 g de iodeto de potássio em 300 mL de água destilada) sobre o meio de cultura. O aparecimento de zonas claras ao redor das colônias das bactérias indica resultado positivo para amilase.

- Voges – Proskauer

A espécie *Bacillus subtilis* fermenta a glicose com produção de ácido acético, que posteriormente se transforma em produtos neutros como acetoína; logo, a detecção da acetoína constitui a base do teste Voges - Proskauer. O teste é realizado após incubar um inoculo da colônia no meio Clark e Lubs (7,0 g de peptona e 5,0 g de glicose em 1000 mL de água destilada, pH 7,0 – 7,2) a 35° ± 0.5°C por 48 h. Após o período de incubação, 45 gotas da solução de Barrit II (40%

de KOH) e 15 gotas da solução de Barrit I (5%  $\alpha$  – naftol em álcool etílico) eram adicionadas ao caldo. O tubo era agitado vigorosamente e mantido em repouso por pelo menos 15 minutos. Na presença dos reagentes a coloração rósea - avermelhada indica resultado positivo (Figura 6). Os tubos que apresentaram coloração cobre eram descartados.



Figura 6 - Resultado do teste Voges-Proskauer, resultado positivo no tubo da direita.

- Citrato de Simmons

O teste citrato de Simmons é baseado na presença da enzima citrato permease encontrada na espécie *Bacillus subtilis*. O teste é realizado após incubar um inóculo da colônia a 37°C por 24 horas no meio Ágar Citrato de Simmons (1,0 g fosfato de amônio; 1,0 g fosfato de potássio; 5 g de cloreto de sódio; 2,0 g de citrato de sódio; 0,2 g de sulfato de magnésio; 0,08 g de azul de bromotimol e 15,0 g de ágar em 1000 mL de água destilada). Do metabolismo do citrato é produzido CO<sub>2</sub> que, ao reagir com o sódio presente no meio, forma carbonato de sódio, elevando o pH. O meio Ágar Citrato de Simmons (pH 7,3 – verde) possui citrato de sódio como única fonte de carbono e azul de bromotimol como indicador de pH. Com o aumento do pH o meio adquire uma cor azul (pH  $\geq$  7,6), indicando resultado positivo (Figura 7).



Figura 7 – Resultado do teste citrato de Simmons, resultado positivo no tubo da direita

- Tolerância à salinidade (NaCl 6,5%)

A tolerância à salinidade é uma prova utilizada para verificar a capacidade de alguns microrganismos crescerem em presença do sal. O meio base utilizado é o caldo infusão de cérebro e coração, que é um meio nutritivo de uso geral. Este meio, normalmente, contém 0,5% de NaCl, mas aumentou-se a concentração para 6,5%, tornando-o um meio semisseletivo para o desenvolvimento de *Bacillus subtilis*. O meio é preparado adicionando 60 g de cloreto de sódio, 1 g de glicose e 25 g de caldo BHI em 1000 mL de água destilada.

O teste de tolerância à salinidade foi realizado inserindo um inóculo da colônia no meio e incubando à 55°C por 24 h. A espécie *Bacillus subtilis* não cresce nessa temperatura, logo, se o meio ficar turvo, indicando o crescimento da bactéria, o resultado é negativo.

#### 4.3 Sistematização e análise dos resultados

Os resultados do monitoramento de turbidez e de esporos de bactérias aeróbias ao longo das etapas de tratamento da água na ETA UFV foram inicialmente sistematizados e discutidos em termos de estatística descritiva. Para isso, entretanto, foram excluídas observações consideradas *outliers*, por destoarem muito dos demais dados ou por não fazerem sentido prático (por exemplo, “crescimento” em relação ao dado da etapa anterior na ETA). Esses dados não foram utilizados nas análises estatísticas.

Além disso, para efeito de cômputo de remoção de esporos, foram selecionados apenas os dados relativos àqueles eventos de amostragem que apresentaram tendência de decaimento ao longo das etapas de tratamento. A remoção de turbidez foi computada considerando os dados relativos a estes mesmos eventos.

Os dados selecionados, de valores absolutos de turbidez e de esporos na água bruta, decantada, filtrada e desinfetada, bem como de remoção dessas variáveis nas diversas etapas do tratamento foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov e Smirnov com nível de significância  $\alpha = 5\%$ , utilizando o programa *Minitab Statistical Software*. Como a suposição de normalidade foi válida, associações entre dados de esporos e de turbidez foram verificadas por meio do teste paramétrico de correlação de Pearson ( $\alpha = 5\%$ ).

Por fim, a remoção de esporos foi discutida comparativamente à de remoção de protozoários por meio dos seguintes recursos: (i) estimativa da remoção de cistos de *Giardia* e de oocistos de *Cryptosporidium* a partir dos dados de remoção de turbidez na ETA UFV e do emprego das equações 1 a 5; (ii) estimativa da inativação de cistos de *Giardia* a partir dos dados *Ct* da ETA UFV e do emprego da equação 6.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Contagem de esporos de bactérias aeróbias

Na Tabela 5 são apresentados os resultados das contagens de esporos de bactérias aeróbias em cada uma das amostras de água bruta, decantada, filtrada e tratada (clorada).

Tabela 5 – Contagens (UFC/100mL) de esporos de bactérias aeróbias na ETA UFV, março de 2014 a fevereiro 2015

Data	Bruta	Decantada	Filtrada	Tratada
12/03/2014	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	NC	NR
14/03/2014	NC	$4,0 \times 10^2$	$9,6 \times 10^1$	NR
18/03/2014	$2,9 \times 10^3$	$7,3 \times 10^3$	$1,4 \times 10^2$	NR
26/03/2014	$2,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	NR
14/04/2014	$1,4 \times 10^3$	NC	$6,8 \times 10^1$	NR
23/04/2014	$4,5 \times 10^3$	$7,0 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	2,5
29/04/2014	$5,0 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^1$	2,33
05/05/2014	$8,0 \times 10^2$	$2,5 \times 10^3$	3,00	1,25
12/05/2014	$4,8 \times 10^2$	$6,5 \times 10^2$	NC	NC
19/05/2014	$1,1 \times 10^3$	$5,5 \times 10^1$	9,00	0,8
26/05/2014	$1,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	NC	1,80
02/06/2014	$1,5 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$1,1 \times 10^1$	$1,34 \times 10^1$
09/06/2014	$1,1 \times 10^3$	$8,5 \times 10^1$	6,67	7,00
17/06/2014	$6,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	8,00	2,40
24/06/2014	$9,5 \times 10^2$	$4,4 \times 10^2$	$1,9 \times 10^1$	2,00
30/06/2014	$1,2 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$	$1,1 \times 10^1$	7,00
07/07/2014	$1,6 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	1,83
15/07/2014	$7,7 \times 10^3$	$7,8 \times 10^3$	$1,5 \times 10^1$	3,17
06/08/2014	$5,7 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$6,4 \times 10^1$	6,67
11/08/2014	$9,0 \times 10^2$	$8,5 \times 10^2$	$2,6 \times 10^1$	$1,80 \times 10^1$
18/08/2014	$5,1 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	8,0	1,83
25/08/2014	$9,0 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	6,80	1,67
01/09/2014	$8,2 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	6,86	1,54
08/09/2014	$4,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$	9,00	2,83
15/09/2014	$1,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$1,6 \times 10^1$	0,77
22/09/2014	$5,0 \times 10^2$	NC	$1,9 \times 10^1$	0,71
01/10/2014	$9,6 \times 10^2$	NC	$3,2 \times 10^1$	5,18
06/10/2014	$3,6 \times 10^2$	$2,60 \times 10^2$	$2,2 \times 10^1$	4,43
13/10/2014	$2,3 \times 10^4$	NC	$2,5 \times 10^1$	$1,2 \times 10^1$
20/10/2014	$1,7 \times 10^3$	$4,1 \times 10^3$	$2,2 \times 10^1$	5,71
27/10/2014	$1,3 \times 10^3$	NC	8,00	5,85

Continua

Tabela 5 - Continuação

06/01/2015	$2,4 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$	$7,7 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$
12/01/2015	$1,9 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$8,8 \times 10^1$	7,50
21/01/2015	$1,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$1,38 \times 10^2$	8,00
29/01/2015	$1,7 \times 10^4$	$6,8 \times 10^3$	$7,0 \times 10^2$	2,50
02/02/2015	$1,3 \times 10^4$	$6,6 \times 10^4$	NC	9,50
03/02/2015	$4,6 \times 10^3$	$4,1 \times 10^3$	$6,0 \times 10^1$	3,67
05/02/2015	$2,9 \times 10^3$	$5,7 \times 10^3$	$2,5 \times 10^1$	5,17
09/02/2015	$3,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	$3,3 \times 10^1$	2,50
11/02/2015	NC	$5,6 \times 10^4$	$2,9 \times 10^1$	2,00
19/02/2015	$4,6 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$	$4,4 \times 10^1$	5,00

NC: não contável; NR: não realizado; células sombreadas: *outliers*

Na Tabela 6, os resultados das contagens de esporos, já com as devidas exclusões, foram sistematizados em termos de estatística descritiva.

Tabela 6 - Estatística descritiva dos resultados das contagens (UFC/100mL) de esporos de bactérias aeróbias na ETA UFV, março de 2014 a fevereiro de 2015

Parâmetros	AB	AD	AF	AT
N (número amostras)	32	32	36	34
Mínimo	$3,6 \times 10^2$	$5,5 \times 10^1$	3,00	0,71
Máximo	$7,7 \times 10^3$	$7,8 \times 10^3$	$7,0 \times 10^2$	20
Mediana	$1,4 \times 10^3$	$7,7 \times 10^2$	$2,2 \times 10^1$	3,4
Percentil 25%	$9,1 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	9,25	1,8
Percentil 75%	$2,8 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$6,3 \times 10^1$	7,0
Média Aritmética	$2,1 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$5,7 \times 10^1$	5,2
Desvio Padrão	$1,8 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	4,7
Coeficiente de variação	88,69%	120,03%	205,39%	90,72%

AB: água bruta; AD: água decantada; AF: água filtrada; AT: água tratada

Os resultados revelaram elevada variabilidade na concentração de esporos aeróbios. No caso da água bruta isso pode ser considerado típico de contagens microbianas em amostras ambientais, o que parece ter sido amenizado ao longo das etapas de tratamento. As contagens de esporos na água bruta variaram de  $3,6 \times 10^2$  a  $7,7 \times 10^3$  UFC/100mL (média =  $2,1 \times 10^3$  UFC/100mL e mediana =  $1,4 \times 10^3$  UFC/100mL). Nieminski *et al.* (2000) analisando água bruta em diferentes localidades nos EUA encontraram valores medianos de  $1,8 \times 10^3$  UFC/100mL. Dugan *et al.* (2001) analisando 14 estações de tratamento de água, também nos EUA, encontraram variação na água bruta de 0,78 a  $4,0 \times 10^3$  UFC/100 mL. Verhille

et al. (2003), em trabalho conduzido nos EUA, encontraram variações nas contagens de esporos na água bruta de 10 – 100 UFC/mL.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam claramente remoção de esporos ao longo das etapas de tratamento (o que será abordado em mais detalhes no item 5.3). Além disso, em que pese a referida variabilidade dos dados, quando estes são vistos a partir dos valores das medianas e desvios interquartílicos (Figura 8), as etapas do tratamento parecem revelar não somente eficiência como também estabilidade (crescente ao longo das etapas) de remoção de esporos.

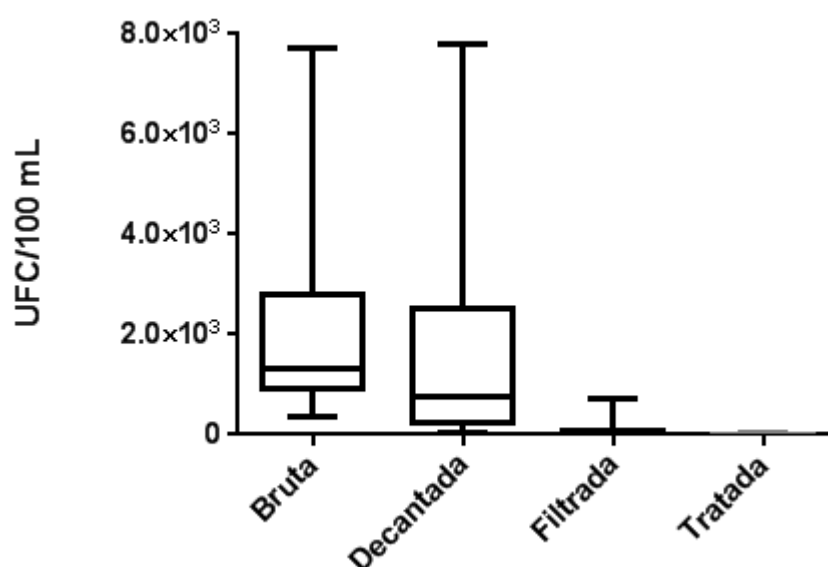


Figura 8 - Representação gráfica da estatística descritiva dos resultados das contagens de esporos de bactérias aeróbias ao longo das etapas de tratamento da água na ETA UFV, março de 2014 a fevereiro de 2015.

## 5.2 Identificação de *Bacillus*

Como já mencionado, das amostras coletadas ao longo do monitoramento de esporos na ETA UFV, foram isoladas 310 colônias para os testes bioquímicos subsequentes.

Para facilitar a análise dos resultados de identificação de *Bacillus* spp. as bactérias foram divididas em grupos, de acordo com o resultado dos testes bioquímicos.

Grupo 1 (Amilase positivo): *B. subtilis*; *B. cereus*; *B. megaterium*; *B. stearothermophilus*; *B. polymyxa*; *B. mycoides*; *B. macerans*; *B. thuringiensis*; *B. licheniformis*; *B. alvei*; *B. anthracis*; *B. alcalophilus*, *B. coagulans*.

Grupo 2 (Amilase negativo): *B. pumilis*; *B. marinus*; *B. sphaericus*; *B. schligelii*; *B. popilliae*; *B. pasteurii*; *B. lentimorbus*; *B. azotoformans*; *B. insolitus*; *B. larvae* e *B. laterosporus*.

Grupo 3 (Amilase positiva e VP positiva): *B. subtilis*; *B. cereus*; *B. polymyxa*; *B. mycoides*; *B. thuringiensis*; *B. licheniformis*; *B. alvei*; *B. anthracis*; *B. coagulans*.

Grupo 4 (Amilase positiva e VP negativo): *B. megaterium*; *B. stearothermophilus*; *B. macerans*; *B. pantothenicus*; *B. macquariensis*; *B. lentus*; *B. alcalophilus*; *B. brevis*; *B. circulans*

Grupo 5 (Amilase positiva, VP positivo, Citrato positivo): *B. coagulans*; *B. subtilis*; *B. licheniformis*

Grupo 6 (Amilase positiva, VP positivo, Citrato negativo): *B. polymyxa* e *B. alvei*.

Grupo 7 (Amilase positiva, VP positivo, Citrato positivo, NaCl positivo): *B. subtilis* (não cresce à 55°C) e *B. licheniformis* (cresce à 55°C)

Grupo 8: *Bacillus coagulans*.

A Figura 9 apresenta o gráfico da distribuição dos grupos em porcentagem, sendo os Grupos 4 e 6 os mais representativos, respondendo por 44,37% e 40,51% dos dados, respectivamente. A maioria das espécies desses grupos são bactérias comumente encontradas em amostras de solo, plantas e água (ABDULKADIR e WALIYU, 2012). Os outros grupos representaram, conjuntamente, 15,12 % dos dados. O Grupo 1 foi desconsiderado na elaboração do gráfico da Figura 9 por estar contido nos outros grupos.

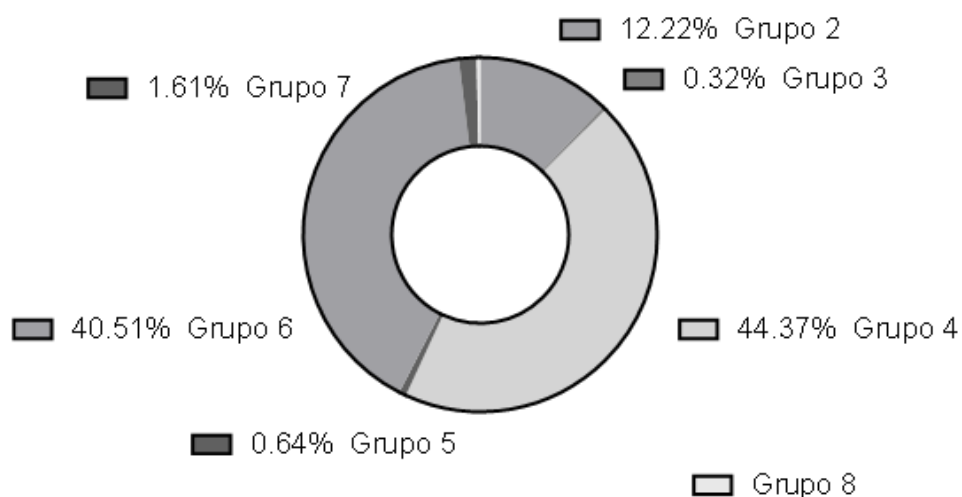


Figura 9 - Distribuição dos grupos de *Bacillus* encontrados nas amostras de água bruta e tratada na ETA UFV, março a outubro de 2014.

Embora alguns estudos utilizem *Bacillus subtilis* como bactéria referência em ensaios de avaliação de eficiência do tratamento da água (FACILE *et al.*, 2000; VERHILE *et al.*, 2003), no presente estudo esta parece não ser a melhor opção, já que apenas cinco bactérias isoladas eram dessa espécie. De acordo com Bitton (2005), mesmo entre determinada espécie de bactéria, alguns membros se adaptam a condições específicas, além da composição clonal das populações mudarem com a localidade. Nieminski *et al.* (2000) também observaram que *Bacillus subtilis* apresenta importantes variações tanto sazonais quanto geográficas e, por terem ocorrido em menores concentrações do que os esporos aeróbios totais, estes foram escolhidos como indicadores no estudo realizado sobre tratamento da água.

Os resultados obtidos sugerem então que no tipo de estudo do presente trabalho (avaliação da eficiência do tratamento em escala real) não parece ser necessária pesquisa detalhada ao nível de espécie, bastando a informação ao nível de gênero (*Bacillus*). O importante é o fato das espécies de *Bacillus* formadoras de esporos serem comumente encontradas em amostras ambientais de água em números elevados e serem consistentemente removidas ao longo dos processos de tratamento.

### 5.3 Remoção de esporos de bactérias aeróbias na ETA UFV

A Tabela 7 apresenta a estatística descritiva dos valores de remoção (unidades logarítmicas) de esporos de bactérias aeróbias nas etapas do tratamento da ETA UFV. Na Figura 10 esses dados são reorganizados graficamente.

Tabela 7 - Estatística descritiva dos resultados de remoção (log) de esporos de bactérias aeróbias na ETA UFV, março de 2014 a fevereiro de 2015

Parâmetro	DEC	FIL	DES	DEC+FIL	DEC+FIL+DES
N (número amostras)	24	30	31	21	19
Mínimo	0,02	0,49	0,14	1,21	1,70
Máximo	1,40	3,29	2,45	3,02	4,14
Mediana	0,65	1,61	0,71	2,08	3,14
Percentil 25%	0,25	1,16	0,52	1,62	2,68
Percentil 75%	1,02	2,31	1,12	2,63	3,45
Média Aritmética	0,65	1,71	0,85	2,10	3,04
Desvio Padrão	0,42	0,72	0,52	0,57	0,67
Coefficiente de variação	65,57	42,27	61,59	27,49	22,2

DEC: decantação; FIL: filtração; DES: desinfecção

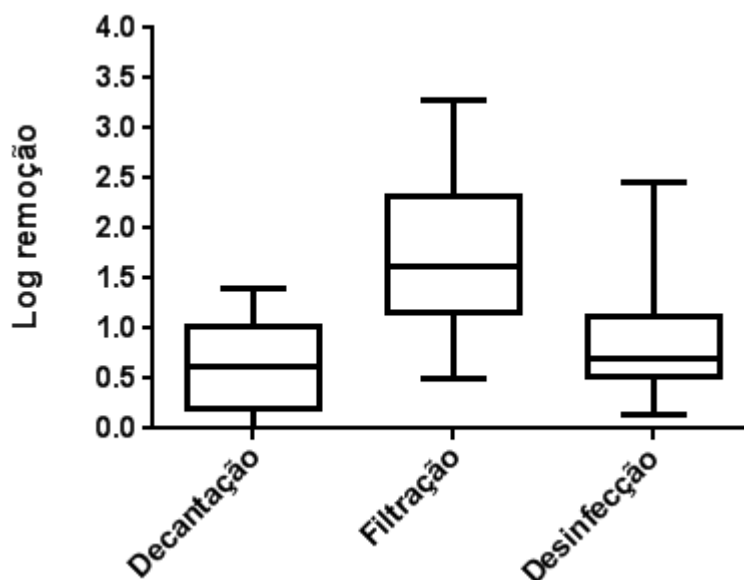


Figura 10 - Representação gráfica da estatística descritiva dos dados de remoção de esporos de bactérias aeróbias na ETA UFV. Primeiro e terceiros quartis (limites inferior e superior dos retângulos nos gráficos box-plot); medianas (linhas horizontais internas aos retângulos), valores mínimos e máximos (limites inferior e superior das linhas verticais).

A remoção de esporos variou consideravelmente em cada uma das etapas de tratamento: (i) 0,02 a 1,4 log (mediana e média iguais a 0,65 log) na decantação; (ii) 0,49 a 3,29 log (mediana igual a 1,61 log e média igual a 1,71 log) na filtração; (iii) 0,14 a 2,45 log (mediana igual a 0,71 log e média igual a 0,85 log) na desinfecção; (iv) 1,21 a 3,02 log (mediana igual a 2,08 e média igual a 2,10 log) na decantação e filtração, conjuntamente; e (v) 1,70 a 4,14 log (mediana e média iguais a 3,14 e 3,04 log, respectivamente) no total (decantação + filtração + desinfecção). Em resumo, a remoção se deu de forma mais efetiva na filtração do que na decantação e na desinfecção.

De certa forma, esses resultados são similares a informações de literatura, tais como as citadas a seguir. Hijnen *et al.* (2007) analisaram a remoção de esporos de bactérias aeróbias e anaeróbias por tratamento convencional em onze estudos diferentes, totalizando 62 dados, computando valores de  $2,4 \pm 0,9$  log de remoção total. Dugan *et al.* (2001), avaliando três estações de tratamento convencional em escala real, observaram que a decantação atingiu as seguintes remoções: 0,8 log (dp = 0,5); 1,0 log (dp = 0,5) e 1,5 log remoção (dp = 0,3). Ainda de acordo com esses autores, a remoção de esporos na decantação foi mais efetiva com valores de turbidez mais elevados (270 uT). No que diz respeito à filtração, foram observadas remoções médias de 1,0 log (0,61 log e dp = 0,38; 1,3 log e dp = 0,14) para doses de coagulante abaixo da ótima e de 2,0 log (0,73 log e dp = 0,44; 3,4 log e dp = 0,94) para doses ótimas. A remoção de esporos aeróbios no processo de filtração foi inferior, em ambas situações, à remoção de oocistos de *Cryptosporidium*.

#### **5.4 Remoção de turbidez na ETA UFV**

Os dados de turbidez dos mesmos eventos de amostragem selecionados para cálculo da remoção de esporos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Estatística descritiva dos dados de turbidez (uT) nas amostras de água da ETA UFV analisadas para esporos de bactérias aeróbias

Parâmetro	Água Bruta	Água Decantada	Água Filtrada
N (número de amostras)	41	41	41
Mínimo	2,38	0,62	0,15
Máximo	71,31	2,26	0,93
Mediana	5,32	0,98	0,21
Primeiro Quartil (25%)	4,29	0,80	0,18
Terceiro Quartil (75%)	7,08	1,49	0,30
Média Aritmética	8,77	1,17	0,26
Desvio Padrão	11,98	0,47	0,14
Coefficiente de Variação (%)	136,53	40,26	56,34

Nota-se que a turbidez da água bruta no período analisado foi baixa e que sua variabilidade, natural, foi bem absorvida na decantação e na filtração – o que pode ser mais bem visualizado na Figura 11.

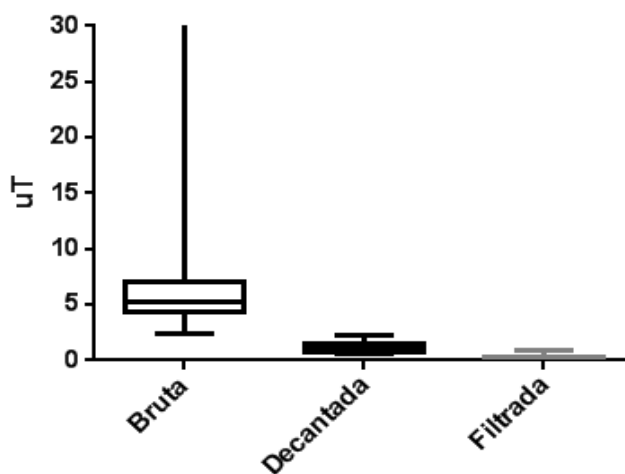


Figura 11 - Representação gráfica da estatística descritiva dos dados de turbidez da água na ETA UFV. Primeiro e terceiros quartis (limites inferior e superior dos retângulos nos gráficos box-plot); medianas (linhas horizontais internas aos retângulos), valores mínimos e máximos (limites inferior e superior das linhas verticais).

A Figura 12 apresenta a estatística descritiva dos valores de remoção de turbidez relativos aos 41 eventos de amostragem para monitoramento de esporos de bactérias aeróbias.

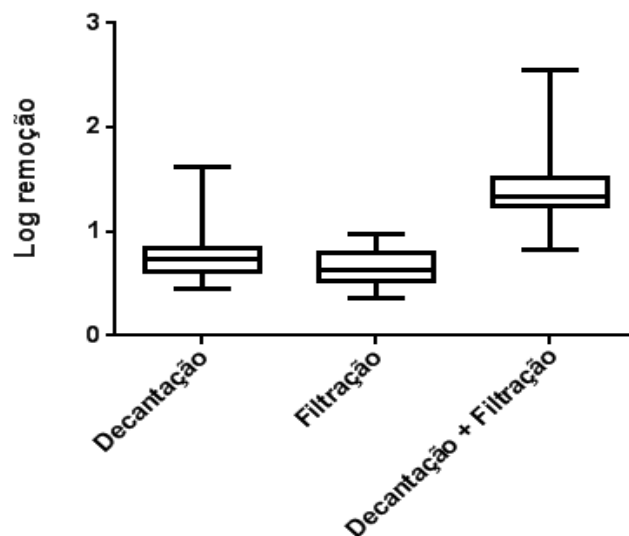


Figura 12 - Representação gráfica da estatística descritiva da remoção de turbidez da água na ETA UFV. Primeiro e terceiros quartis (limites inferior e superior dos retângulos nos gráficos box-plot); medianas (linhas horizontais internas aos retângulos), valores mínimos e máximos (limites inferior e superior das linhas verticais)

A remoção de turbidez na decantação variou de 0,45 a 1,62 log (média igual a 0,75 log) e na filtração de 0,36 a 0,97 (média de 0,65 log), perfazendo remoção total média de 1,41 log (0,82 – 2,55 log). Diante dos valores de turbidez da água bruta (2,38 - 71,31 uT) e do fato de que a remoção de turbidez na decantação e na filtração foi semelhante em magnitude, é de se supor que mecanismos de adsorção-neutralização de cargas e, ou de varredura tenham atuado na remoção de turbidez.

De forma complementar, incluem-se aqui informações sobre a turbidez da água filtrada alcançada na ETA UFV ao longo do período do presente estudo, sistematizadas a partir do banco de dados de monitoramento de rotina (horário) de turbidez. Para facilitar a discussão os dados foram organizados na forma de distribuição de frequência (Tabela 9).

Tabela 9 - Distribuição dos valores de turbidez de água filtrada, ETA UFV, março de 2014 a fevereiro de 2015.

Turbidez (uT)	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Total
0,00 – 0,09	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
0,10 – 0,19	10	10	57	138	260	301	392	248	133	5	32	29	1615
0,20 – 0,29	44	37	137	75	40	43	75	249	266	30	136	37	1169
0,30 – 0,49	116	47	21	2	2	6	23	79	95	129	108	90	718
0,50 – 0,74	51	38	1	0	0	1	4	0	10	49	15	28	197
0,75 – 0,99	13	38	0	0	0	0	1	0	0	8	4	8	72
1,00 – 1,24	4	7	0	0	0	0	0	0	0	4	3	0	18
1,25 – 1,49	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
1,50 – 1,74	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3
≥ 1,75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total de ocorrências	238	180	216	215	302	353	495	576	504	227	298	192	3796

No total foram avaliados 3796 dados de turbidez; destes, dois (0,05%) estiveram entre o 0,00 – 0,09 uT; 1615 (42,54%) entre 0,10 – 0,19 uT; 1169 (30,80%) entre 0,20 – 0,29 uT; 718 (18,91%) entre 0,30 – 0,49 uT; 197 (5,19%) entre 0,5 – 0,74 uT; 72 (1,90%) entre 0,75 – 0,99 uT; o restante representou aproximadamente 1% dos dados: 18 dados entre 1,00 – 1,24 uT; dois entre 1,25 – 1,49 uT; três entre 1,50 – 1,74 uT e nenhum acima de 1,75 uT. Em suma, no período analisado, cerca de 73% (0,00 – 0,29) e 92% (0,00 – 0,49) dos dados de turbidez da água filtrada estiveram abaixo de 0,3 e 0,5 uT, valores estes indicativos de remoção de, respectivamente, 3 log remoção de oocistos de *Cryptosporidium* e 2,5 log de cistos de *Giardia*.

Mais detalhadamente, esses dados são rerepresentados em forma gráfica, mês a mês - gráficos de Pareto, que permitem visualizar a distribuição de frequência e a frequência acumulada dos dados de turbidez (Figuras 13 a 24).

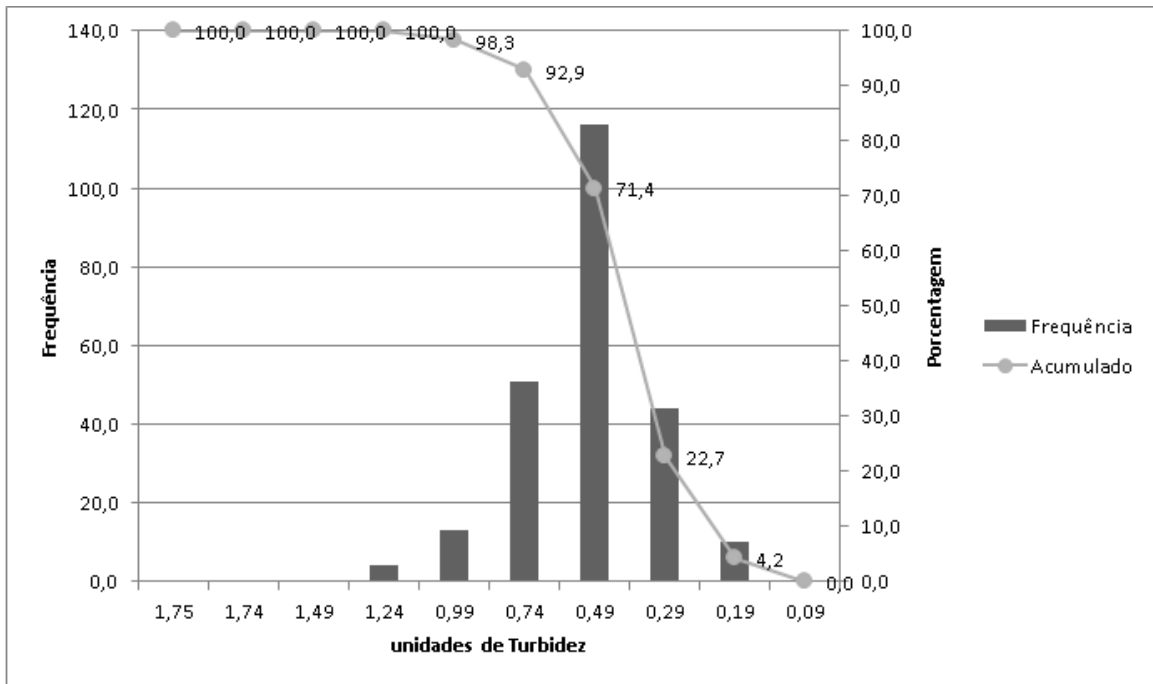


Figura 13 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, março de 2014.

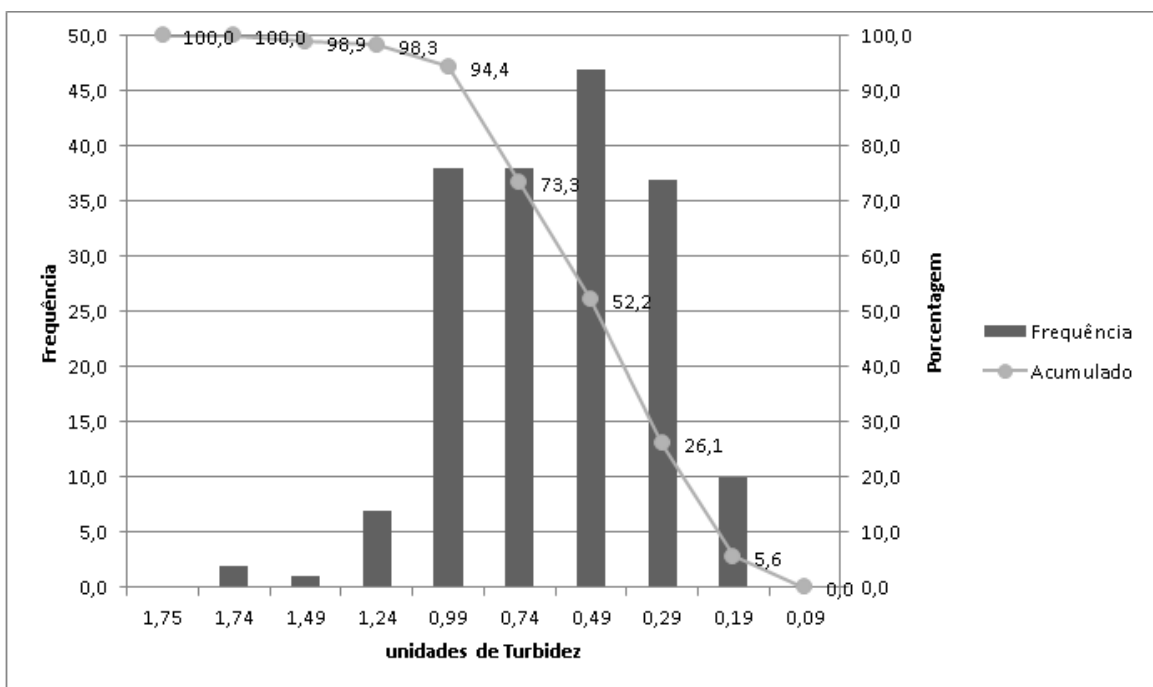


Figura 14 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, abril de 2014.

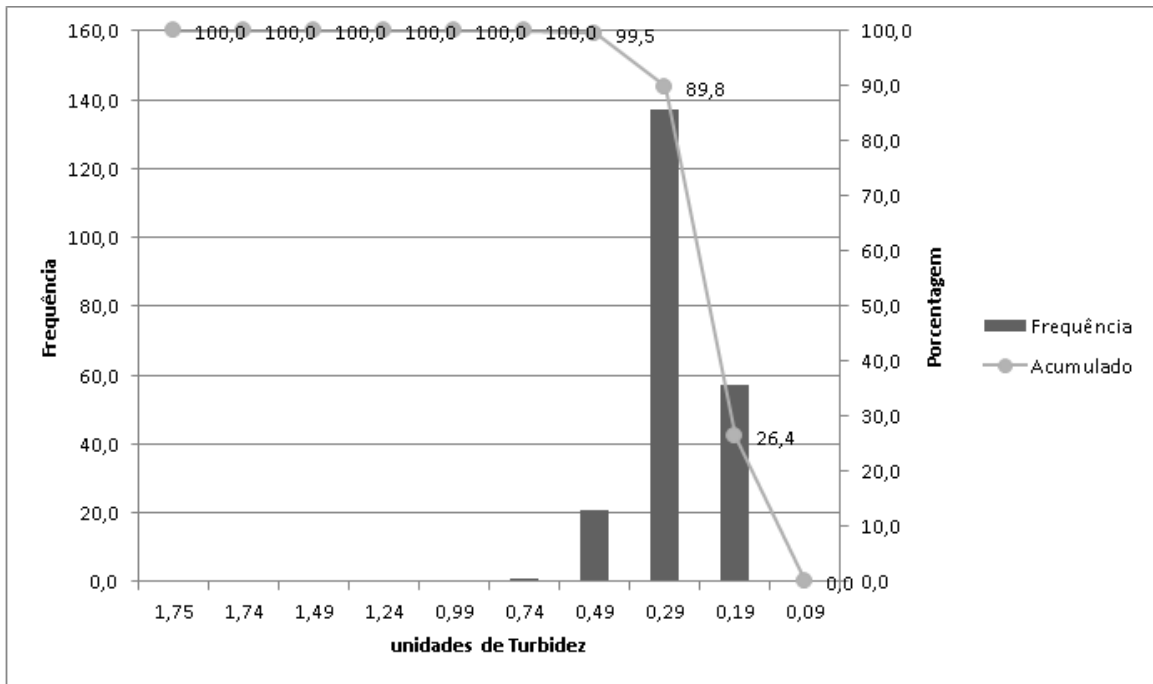


Figura 15 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, maio de 2014.

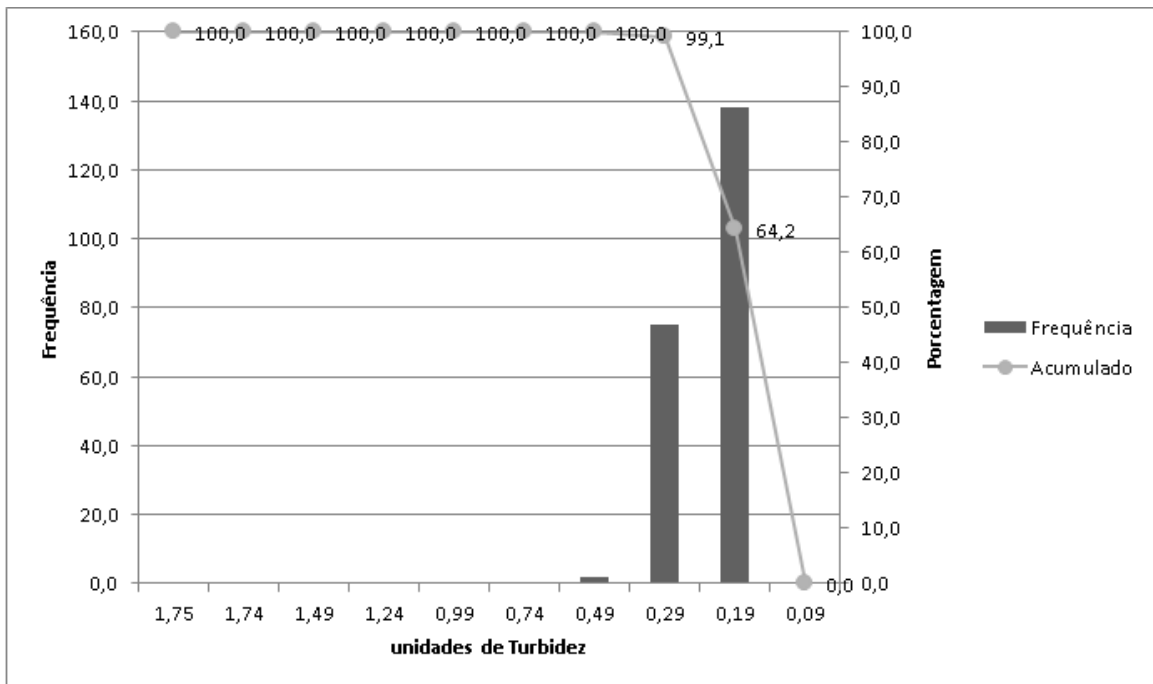


Figura 16 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, junho de 2014.

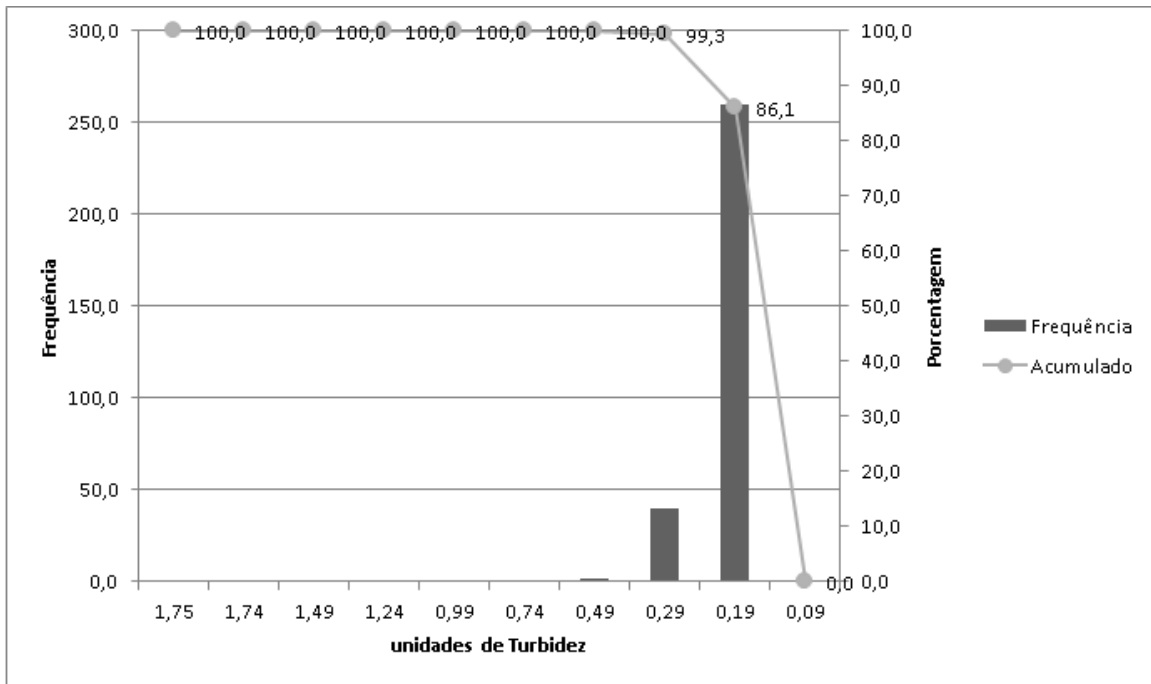


Figura 17 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, julho de 2014.

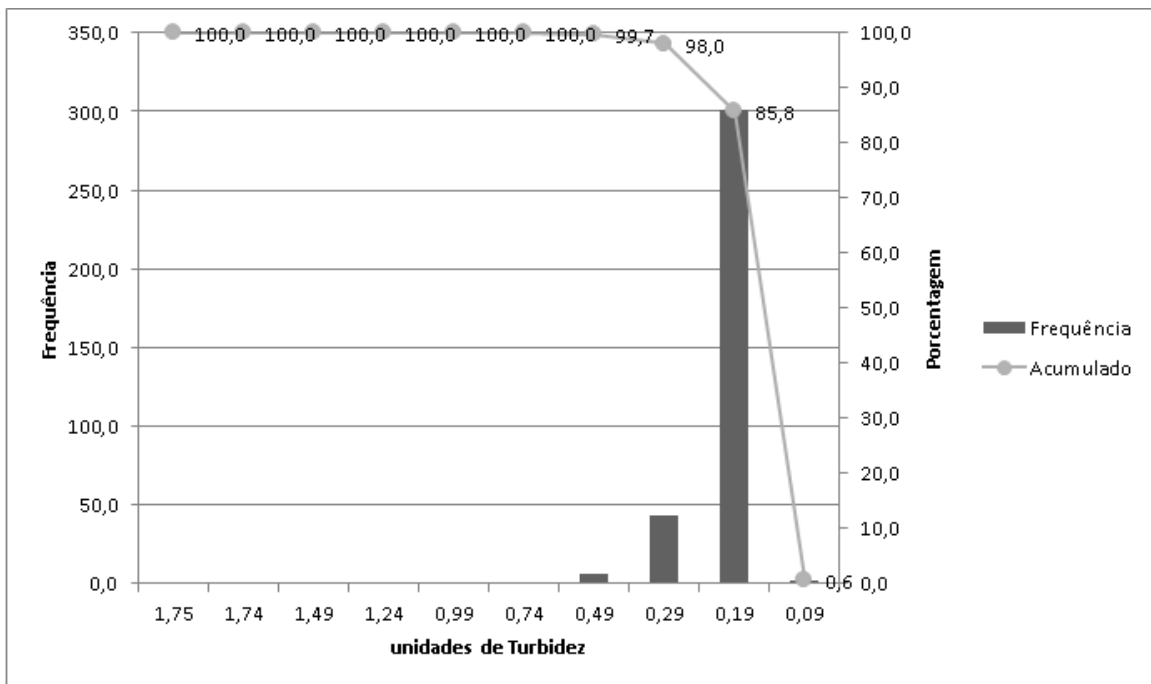


Figura 18 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, agosto de 2014.

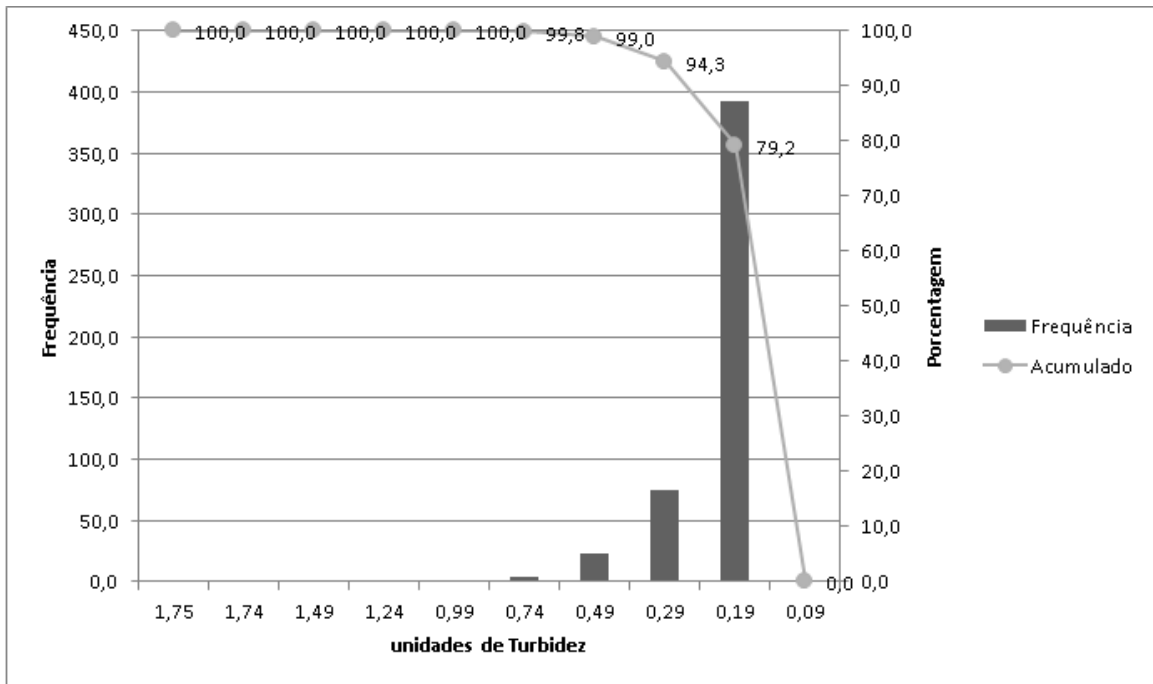


Figura 19 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, setembro de 2014.

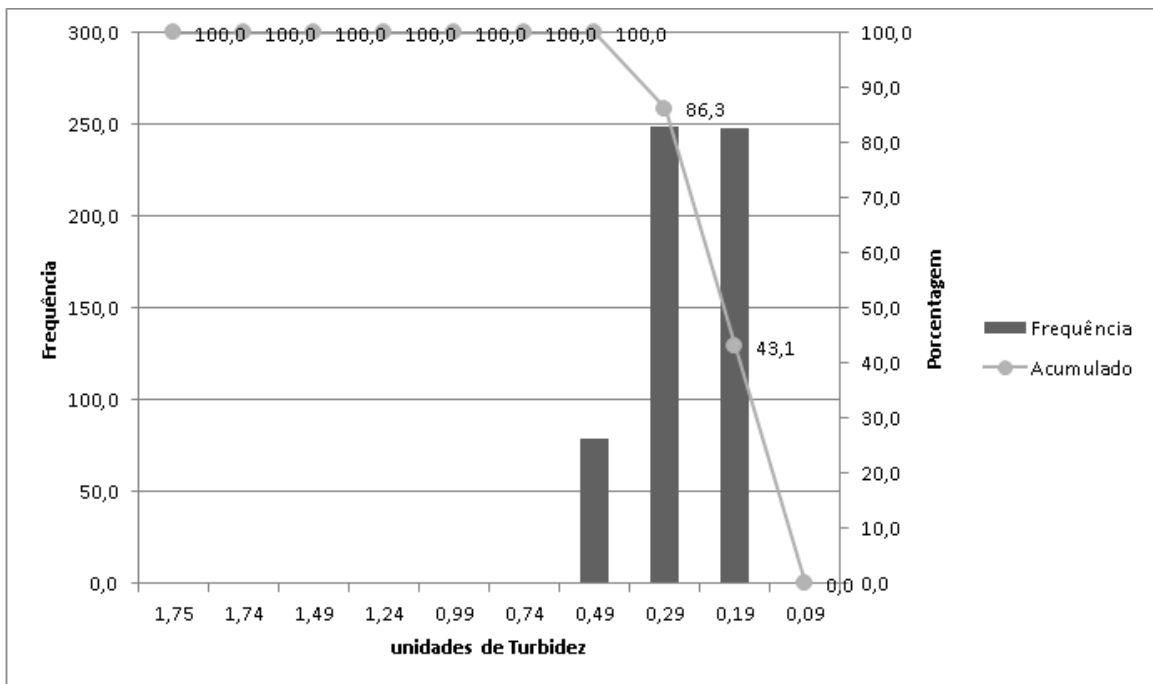


Figura 20 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, outubro de 2014.

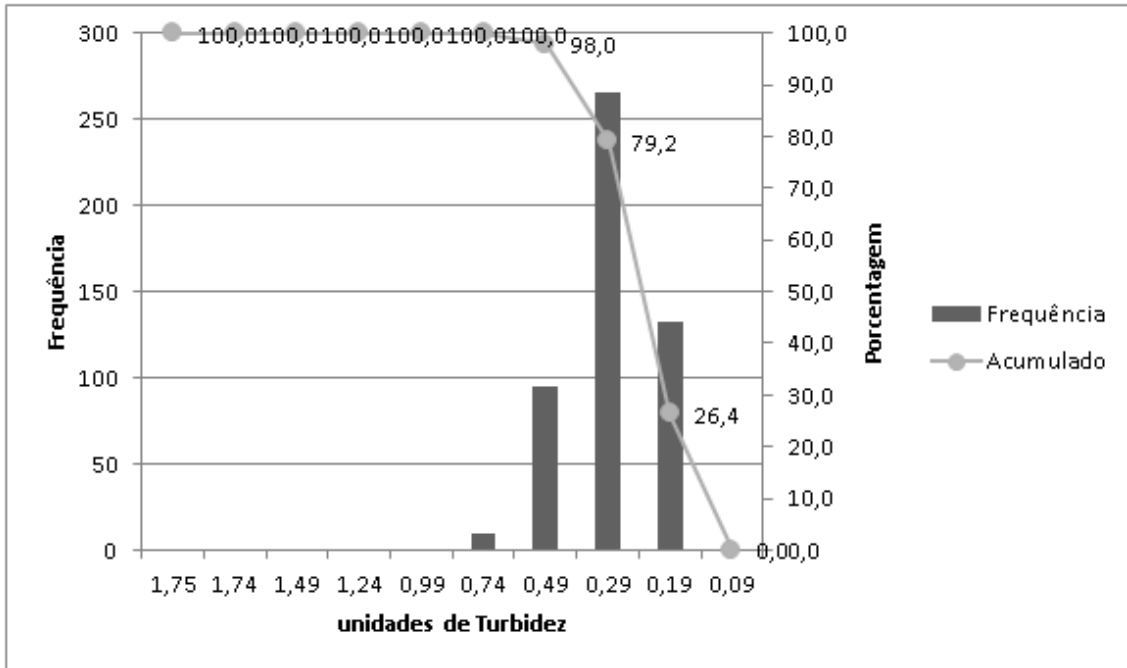


Figura 21 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, novembro de 2014.

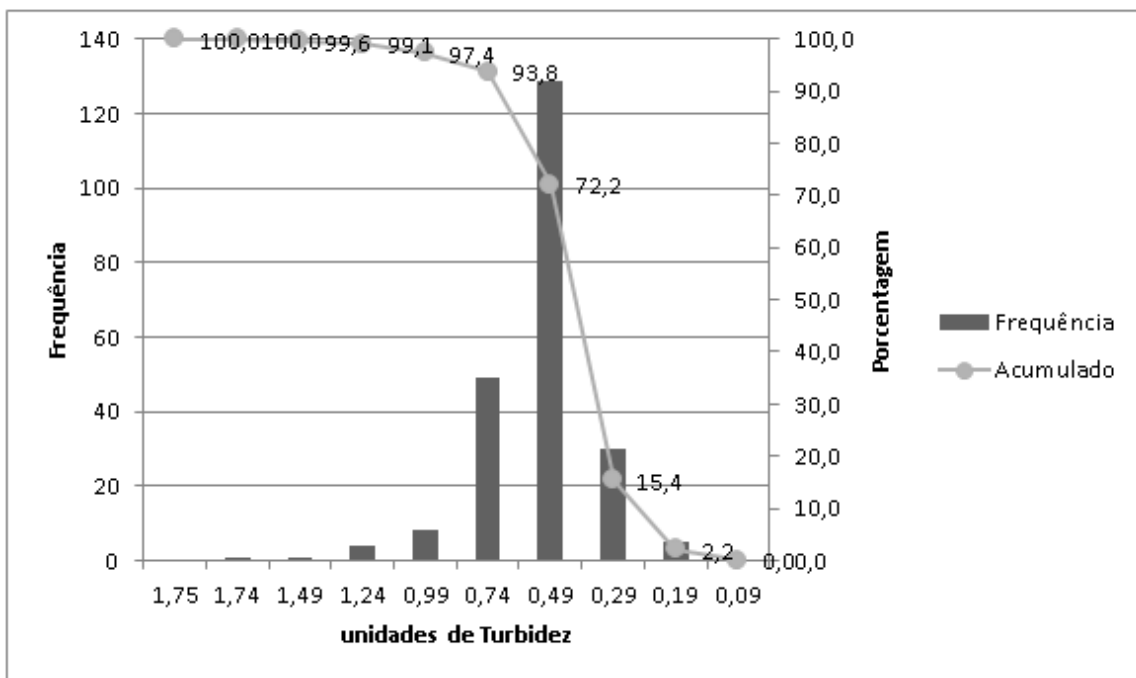


Figura 22 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, dezembro de 2014.

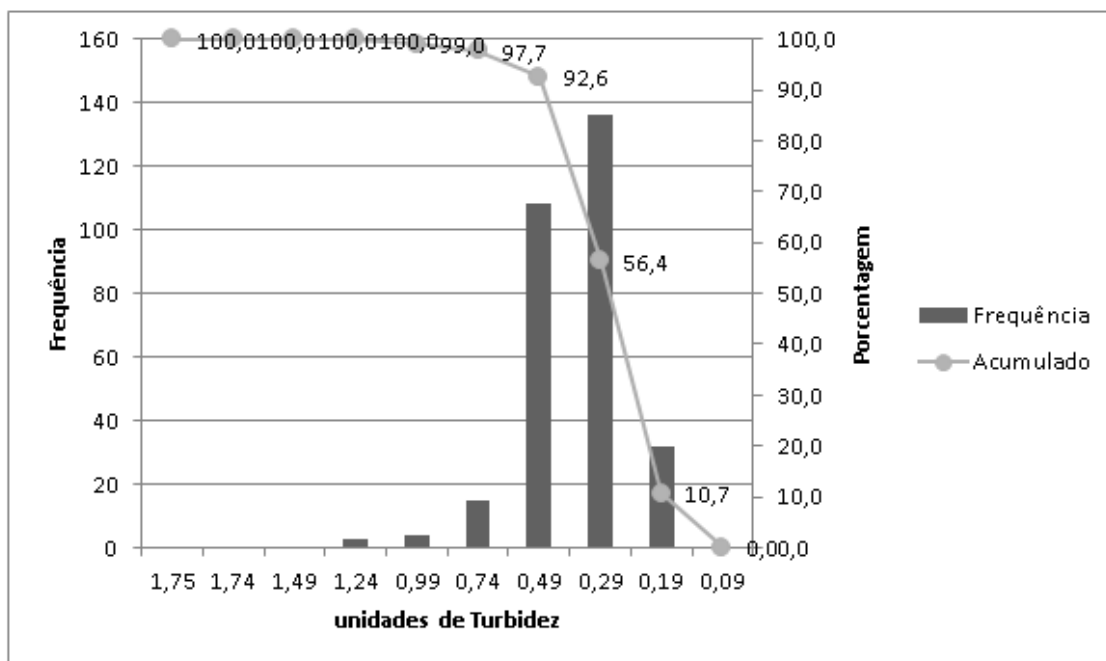


Figura 23 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, janeiro de 2015.

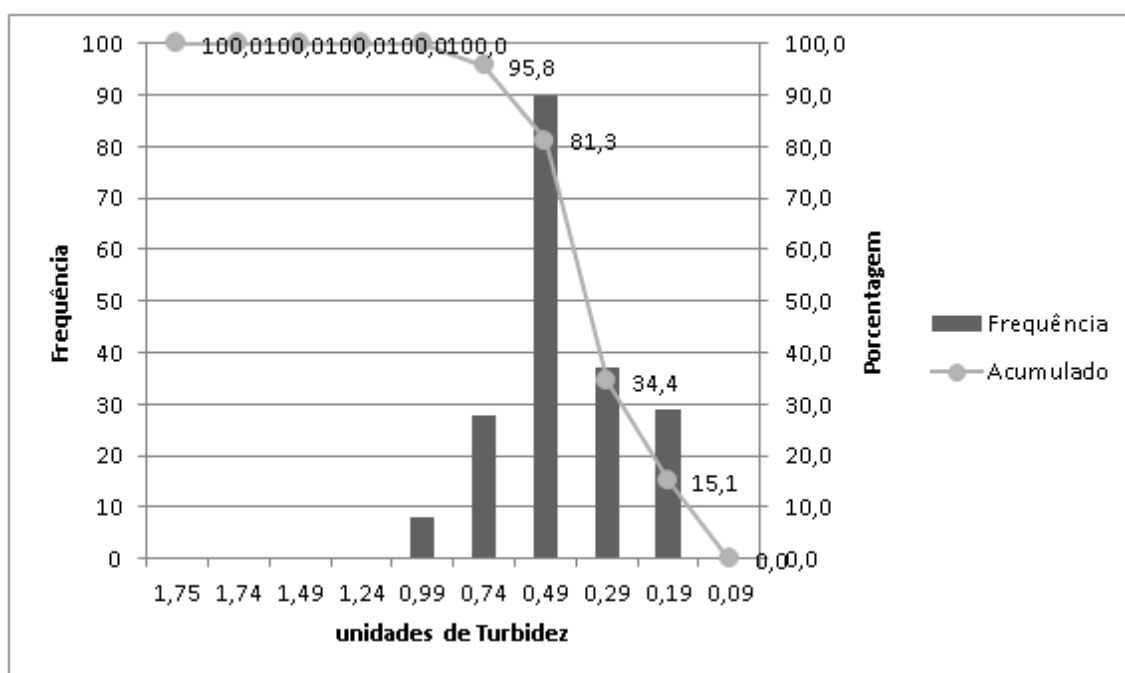


Figura 24 - Distribuição de frequência e frequência acumulada dos dados de turbidez da ETA UFV, fevereiro de 2015.

Dos gráficos acima, destaca-se que: (i) em março 71,4% dos dados de turbidez da água filtrada ficaram abaixo de 0,5 uT e 21,7% abaixo de 0,3 uT; (ii) em

abril, 52,2% dos dados ficaram abaixo de 0,5 uT e 26,1% abaixo de 0,3 uT; (iii) em maio 99,5 % dos dados ficaram abaixo de 0,5 uT e 89,8% abaixo de 0,3 uT; (iv) em junho 100% dos dados mensais de turbidez da água filtrada ficaram abaixo de 0,3 uT; (v) em julho 100% dos dados filtrada ficaram abaixo de 0,5 uT e 99,3% abaixo de 0,3 uT; (vi) em agosto, 99,7% dos dados mensais de turbidez da água filtrada ficaram abaixo de 0,5 uT e 98,0% abaixo de 0,3 uT; (vii) em setembro, 99,0% dos dados ficaram abaixo de 0,5 uT e 94,3% abaixo de 0,3 uT; (viii) em outubro, uma vez mais, 100% dos dados abaixo de 0,5 uT e 86,0% abaixo de 0,3 uT; (ix) em novembro, 98,0% dos dados ficaram abaixo de 0,5 uT e 79,2% abaixo de 0,3 uT; (x) em dezembro, 72,2% dos dados ficaram abaixo de 0,5 uT e 15,4% abaixo de 0,3 uT; (xi) em janeiro, 97,7% dos dados ficaram abaixo de 0,5 uT e 92,6% abaixo de 0,3 uT; e (xii) em fevereiro, 81,3% dos dados ficaram abaixo de 0,5 uT e 34,4% abaixo de 0,3 uT.

Em resumo, à exceção de março, abril, dezembro e fevereiro (meses de precipitação e turbidez da água bruta mais elevadas), o padrão de potabilidade brasileiro foi plenamente atendido (95% dos dados mensais abaixo de 0,5 uT). No período de junho a setembro, 95% dos dados mensais estavam abaixo de 0,3 uT, abaixo portanto do que estabelecido no padrão de potabilidade. Em maio, outubro e janeiro o atendimento a essa meta foi também elevado: 89,8%, 86,3% e 92,6%, respectivamente.

### **5.5 Associação entre a remoção de esporos de bactérias aeróbias e de turbidez na ETA UFV**

As tabelas 10 e 11 resumem os resultados dos testes de correlação de Pearson aplicados aos dados de esporos e turbidez, respectivamente, valores absolutos e remoção dessas variáveis.

Tabela 10 – Resultados dos testes de correlação de Pearson entre valores absolutos de esporos de bactérias aeróbias e dados de turbidez nas amostras de água da ETA UFV

Variáveis	Coefficiente de correlação	p-valor
Bruta	0,218	0,23
Decantada	-0,003	0,98
Filtrada	0,225	0,18

Tabela 11 – Resultados dos testes de correlação de Pearson entre os valores de remoção em Log de esporos de bactérias aeróbias e de turbidez na ETA UFV

Etapas do tratamento	Coefficiente de Correlação	p-valor
Decantação	0,336	0,109
Filtração	0,324	0,081

Os valores absolutos de esporos e de turbidez se mostraram correlacionados de forma positiva, porém fracamente e sem significância estatística na água bruta e na água filtrada. Na água decantada sequer foi observada correlação positiva (Tabela 10). Por sua vez, as remoções de turbidez e de esporos na decantação e na filtração se mostraram correlacionadas positivamente, mas também de forma não muito forte e com significância estatística, ou próxima de, somente se fosse considerado nível de significância de 10% (Tabela 11).

Os valores médios de remoção (log) de esporos e de turbidez foram: (i) 0,65 e 0,75 log, respectivamente, na decantação (ii) 1,71 e 0,65 log, respectivamente, na filtração e (iii) 2,10 e 1,41 log na decantação + filtração.

Observa-se que a decantação e a filtração se mostraram igualmente importantes na remoção de turbidez. Infere-se então, como já referido, que mecanismos de adsorção-neutralização de cargas e, ou de varredura tenham atuado na remoção dessa variável. Observa-se também que os valores absolutos de remoção de turbidez e de esporos na decantação foram próximos. Sugere-se, assim, que a remoção de esporos na decantação esteve associada à de partículas em suspensão, por adsorção aos, ou varredura pelos flocos. Nota-se que remoção de esporos foi mais efetiva na filtração, o que, nesse caso, indica atuação determinante de mecanismos de adsorção-neutralização de cargas. Por fim, cabe destacar que no ciclo completo de clarificação (decantação + filtração) a remoção de

turbidez foi inferior à de esporos, indicando que a primeira poderia ser utilizada como estimativa conservadora da segunda.

## **5.6 Considerações sobre o emprego de esporos de bactérias aeróbias como indicador de remoção de protozoários no tratamento da água**

Uma vez que o presente trabalho não incluiu o monitoramento de protozoários, a discussão anunciada no título do presente tópico será realizada de forma remoção indireta, ou triangulada, envolvendo a remoção de esporos de bactérias aeróbias, de turbidez e de valores de *Ct*.

### **5.6.1 Etapas de clarificação da água – decantação e filtração**

De início, cabe ressaltar que, em se aceitando valores reduzidos de turbidez, ou a remoção de turbidez, como um indicador válido da remoção de cistos de *Giardia* e de oocistos de *Cryptosporidium*, o fato de que neste estudo a remoção de turbidez e de esporos de bactérias aeróbias mostrou-se correlacionada (ainda que de forma frágil) poderia ser interpretado como indício também da possibilidade do emprego dos esporos como indicador da remoção de (oo)cistos em processos de clarificação da água.

Em termos de discussão numérica, caberia primeiramente registrar que na maioria (75%) dos eventos de monitoramento realizados neste trabalho, a turbidez da água filtrada esteve abaixo de 0,3 uT (Tabela 9), o que, de acordo com os critérios da USEPA, sugeriria potencial de alcance de 3 log de remoção de oocistos de *Cryptosporidium* (0,5 log na decantação e 2,5 log na filtração) e, por decorrência, acima de 2,5 log de remoção de cistos de *Giardia* (0,5 log na decantação e 2,0 log na filtração). A análise do banco de dados do monitoramento de rotina de turbidez na ETA UFV (ver discussão no item 5.4), de certa forma confirma essa suposição (com exceção dos meses de março, abril, dezembro e fevereiro). Como a remoção média de esporos de bactérias aeróbias foi de 0,65 log, na decantação, 1,71 log na filtração e 2,10 log na decantação + filtração, inferior portanto ao sugerido pela USEPA para a remoção de (oo)cistos, estaria cumprido um dos requisitos básicos do emprego dos esporos como indicador da remoção de (oo)cistos.

Tomando agora como referência: (i) a remoção de turbidez registrada na ETA UFV durante o período do presente estudo (ver item 5.4), e (ii) os modelos empíricos propostos por Lopes (2008) (Equação 4) e por Nieminski e Orgerth (1995) (Equação 1) que fornecem, respectivamente, as mais baixas e mais altas estimativas de remoção de oocistos de *Cryptosporidium* com base na remoção de turbidez nas etapas de clarificação da água (decantação + filtração), a remoção de oocistos de *Cryptosporidium* na ETA UFV no período em questão poderia ser assim estimada: entre 1,04 e 2,75 log, com valor médio de 1,54 log com base na Equação 4 e entre 1,89 e 3,55 log com valor médio de 2,38 log com base na Equação 1. De forma análoga, tomando o modelo de Nieminski e Ongerth (1995) (Equação 5), a remoção de cistos de *Giardia* poderia ser estimada entre 2,49 e 4,24 log, com valor médio de 3,01 log.

Comparando essas estimativas com os valores obtidos de remoção de esporos de bactérias aeróbias na decantação e na filtração (em conjunto) (entre 1,21 e 3,02 log, com valor médio de 2,10 log), infere-se que a remoção de esporos apresenta potencial de indicador da remoção de (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium*, pois fornece estimativas conservadoras de remoção de cistos e próximas à de oocistos.

### **5.6.2 Etapa de desinfecção da água – cloração**

Com base no modelo da USEPA (1991) (Equação 6) e nos dados de *Ct* computados nos mesmos dias do monitoramento de esporos na saída do tanque de contato (Tabela 12), estimou-se a inativação de cistos de *Giardia* por cloração na ETA UFV tal como apresentado na Tabela 12.

Comparando as estimativas de inativação de cistos de *Giardia* com os valores medidos de inativação esporos de bactérias aeróbias para os mesmos valores de *Ct* (Figura 25), observa-se, no geral, maior resistência dos esporos ao processo de cloração. A inativação média de esporos de bactérias aeróbias na cloração foi de 0,85 log, enquanto a inativação média estimada de cistos de *Giardia* foi de 2,39 log.

Tabela 12 – Estimativa de inativação de cistos de *Giardia* na ETA UFV

Data	Vazão (L/s)	TDH (min)	Clr Livre (mg/L)	Ct (mg.min)/L	Log remoção esporos	Log remoção
23/04/2014	59,00	9,52	1,71	16,28	1,76	1,17
29/04/2014	50,00	11,23	1,62	18,20	0,71	1,32
05/05/2014	47,25	11,89	1,70	20,21	0,38	1,40
19/05/2014	43,36	12,95	1,41	18,26	1,05	1,22
17/06/2014	45,00	12,48	1,10	13,73	0,52	0,89
24/06/2014	51,82	10,84	1,00	10,84	0,98	0,77
30/06/2014	36,67	15,32	1,18	18,07	0,21	1,13
07/07/2014	32,00	17,55	1,07	18,78	0,74	1,21
15/07/2014	31,13	18,04	0,94	16,96	0,68	1,08
06/08/2014	52,00	10,80	1,16	12,53	0,99	0,76
11/08/2014	51,11	10,99	1,21	13,30	0,16	0,75
18/08/2014	22,00	25,53	1,18	30,13	0,64	1,79
25/08/2014	26,35	21,32	1,26	26,86	0,61	1,75
01/09/2014	19,61	28,64	1,21	34,66	0,65	2,38
08/09/2014	21,39	26,26	1,29	33,87	0,50	1,99
15/09/2014	19,83	28,32	1,32	37,39	1,31	2,63
22/09/2014	23,00	24,42	1,11	27,11	1,43	2,59
01/10/2014	19,52	28,77	1,28	36,83	0,79	3,48
06/10/2014	20,00	28,08	1,13	31,73	0,70	2,07
13/10/2014	19,63	28,61	1,12	32,05	0,33	2,90
20/10/2014	10,00	56,17	1,53	85,94	0,59	8,25
27/10/2014	12,00	46,81	1,38	64,59	0,14	5,04
06/01/2015	24,00	23,40	1,71	40,02	1,88	3,87
12/01/2015	22,00	25,53	1,69	43,15	1,07	4,14
21/01/2015	30,00	18,72	1,35	25,28	1,24	2,67
29/01/2015	20,00	28,08	1,57	44,09	2,45	4,29
03/02/2015	24,00	23,40	1,49	34,87	1,21	3,23
05/02/2015	24,00	23,40	1,49	34,87	0,68	2,89
09/02/2015	34,00	16,52	1,38	22,80	1,12	1,94
11/02/2015	34,00	16,52	1,92	31,72	0,16	2,64
19/02/2015	50,33	11,16	2,00	22,32	0,95	2,00

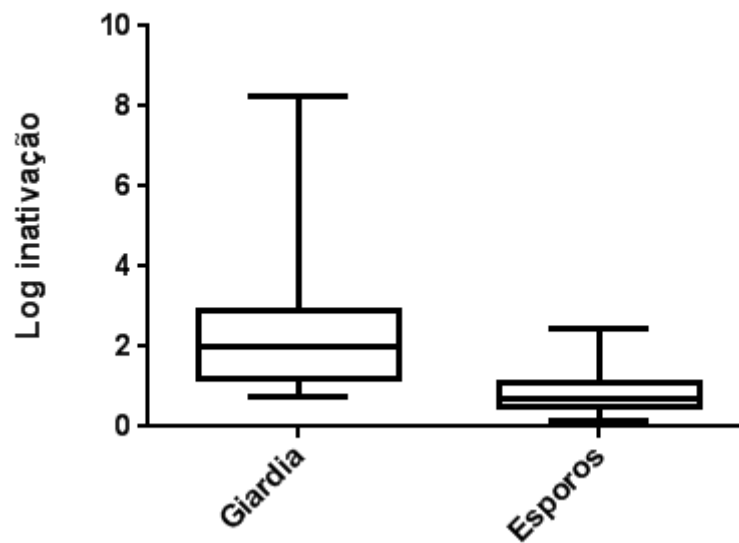


Figura 25 - Valores observados de inativação de esporos de bactérias aeróbias e estimados de inativação de cistos de *Giardia* para os mesmos valores de *Ct*.

Outros trabalhos confirmam a elevada resistência de esporos de bactérias aeróbias à cloração, superior à de cistos de *Giardia*. Barbeau *et al.* (1998), observaram que, nas mesmas condições experimentais, foram necessários valores de *Ct* de 50 (mg.min)/L e 150 (mg.min)/L para 2 log de inativação por cloração de, respectivamente, cistos de *Giardia* e esporos de bactérias aeróbias. Rice *et al.* (1996), observaram que para inativação de *B. cereus* por cloração a 23°C e pH 7,0, foram necessários valores de *Ct* de 41, 62 e 82 (mg.min)/L, respectivamente para 2, 3 e 4 log de inativação.

Na Figura 26 nota-se que a inativação de esporos foi pouco susceptível às variações de *Ct*. Embora os dados obtidos não permitam estabelecer relação numérica entre *Ct* e inativação de esporos, tampouco entre inativação de esporos e cistos de *Giardia*, os resultados sugerem que alcançada inativação de 0,5 log de esporos de bactérias aeróbias, essa mesma eficiência de inativação estaria assegurada para cistos de *Giardia*, sendo esta a meta da Portaria 2914 / 2011.

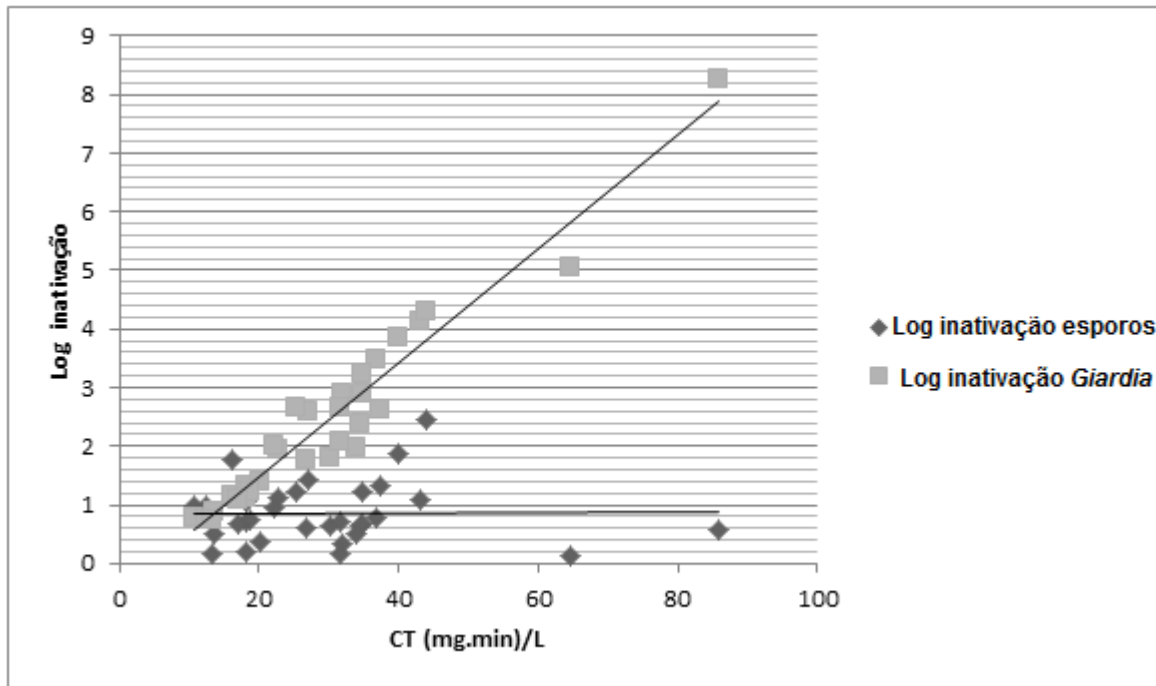


Figura 26 - Valores observados de inativação de esporos de bactérias aeróbias e estimados de inativação de cistos de *Giardia* para os mesmos valores de *Ct*.

## 6 CONCLUSÕES

Esporos de bactérias aeróbias foram detectados em números elevados na água bruta, foram removidos de forma consistente ao longo das etapas do tratamento, mas permaneceram presentes nos efluentes de cada uma dessas etapas. Isso demonstra o potencial de quantificação de decaimento ao longo do tratamento e, por conseguinte, de uso como indicadores da remoção de patógenos.

Os resultados obtidos sugerem que no tipo de estudo do presente trabalho (avaliação da eficiência do tratamento em escala real) não é necessária a pesquisa detalhada ao nível de espécie formadora de esporo, bastando a informação ao nível de gênero (*Bacillus*).

A remoção de turbidez no ciclo completo de clarificação (decantação + filtração) foi inferior à de esporos de bactérias aeróbias. Embora não tenha sido possível estabelecer relação numérica entre a remoção dessas duas variáveis, isso indica que a remoção de turbidez poderia ser utilizada como estimativa conservadora da remoção de esporos.

A remoção observada de esporos de bactérias aeróbias no ciclo completo de clarificação (decantação + filtração) foi inferior à remoção estimada, com base na remoção de turbidez, de cistos de *Giardia* e próxima à de oocistos de *Cryptosporidium*. Infere-se, pois, que a remoção de esporos apresenta potencial de indicador da remoção de (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium*. Poderia ser utilizada como estimativa conservadora da remoção de cistos de *Giardia* e comparável à de oocistos de *Cryptosporidium*. Entretanto, que tais observações devem ser verificadas com estudos complementares, bancos de dados mais robustos, que contemplem variações sazonais e maior período de tempo.

A inativação observada de esporos de bacterias aeróbias por cloração foi inferior à inativação estimada, com base nos valores de *Ct*, de cistos de *Giardia*. Embora os dados obtidos não permitam estabelecer relação numérica entre *Ct* e inativação de esporos, os resultados sugerem que alcançada inativação de 0,5 log de esporos de bactérias aeróbias, estaria assegurada a meta da Portaria 2914 / 2011 de 0,5 log de inativação de cistos de *Giardia*.

## 7 REFERÊNCIAS

ABDULKADIR, M.; WALIYU, S. Screening and Isolation of the Soil Bacteria for Ability to Produce Antibiotics. *European Journal of Applied Sciences*, v. 4, p. 211-215, 2012.

AGUILAR, C.; VLAMAKIS, H.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Current Opinon in Microbiology*, v. 10, n. 6, p. 638 - 643, 2007.

AGULLÓ-BARCELO, M.; OLIVIA, F.; LUCENA, F. Alternative indicators for monitoring *Cryptosporidium* oocysts in reclaimed water. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 20, n. 7, p. 4448 - 4454, 2013.

ALCARAZ, L.D.; MORENO-HAGELSIEB, G.; EGUIARTE, L.E.; SOUZA,V.; HERRERA-ESTRELLA, L.; OLMEDO, G. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics*, v. 11, p. 332 – 349, 2010.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22<sup>a</sup> Ed. Washington: APHA, AWWA, WEF, 2012.

ASSAVASILAVASUKUL, P; LAU, B.L.T.; HARRINGTON, G.W.; HOFFMAN, R.M.; BORCHARDT, M.A. Effect of pathogen concentrations on removal of *Cryptosporidium* and *Giardia* by conventional drinking water treatment. *Water Research*, v. 42, n. 10-11, p. 2678 - 2690, 2008.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2004 - 2010. *Water Research*, v. 45, n. 20, p. 6603 - 6614, 2011.

BARBEAU, B.; MYRE, I.; FACILE, N.; DESJARDINSAND, R.; PRÉVOST, M. Evaluating disinfection processes: aerobic spore formers as a surrogate for *Giardia* and *Cryptosporidium*. In: WATER QUALITY TECHNOLOGY CONFERENCE. 1998, San Diego, California. Proceedings... San Diego, California : AWWA, november 1-5, 1998

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: AIDIS. Anais... Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000. (CD-ROM).

BASTOS, R.K.X.; BEVILACQUA, P.D.; KELLER, R. Organismos patogênicos e efeitos sobre a saúde humana. In: GONÇALVES, R.F. (Coord.) *Desinfecção de efluentes sanitários*. Rio de Janeiro: ABES, RiMa, p.27 - 88, 2003.

BASTOS, R. K. X.; HELLER, L.; VIEIRA, M.B.M.; BRITO, L.A.; BEVILACQUA, P.D.; NASCIMENTO, L.E. *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium* spp. Oocysts dynamics in southeast Brazil: occurrence in surface water and removal in water treatment processes. *Water Science and Technology: Water Supply*, v. 4, n. 2, p.15 - 22, 2004.

BASTOS, R.K.X.; BRANDÃO, C.C.S.; CERQUEIRA, D.A. Tratamento de água e remoção de protozoários. In: PÁDUA, V. L. (coord.). *Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano*. Rio de Janeiro: ABES, p.109 - 150, 2009.

BETANCOURT, W. Q.; ROSE, J. B. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Veterinary Parasitology*, v. 126, n. 1 - 2, p. 219 - 234, 2004.

BEVILACQUA, P.D.; AZEVEDO, S.M.F.O.; CERQUEIRA, D.A. Microrganismos emergentes: protozoários e cianobactérias. In: PÁDUA, V. L. (coord.). *Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano*. Rio de Janeiro: ABES, p.74 - 108, 2009.

BHANDARI, V; AHMOD, N.Z; SHAH, H.N.; GUPTA, R.S. Molecular signatures for *Bacillus* species: demarcation of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* clades in molecular terms and proposal to limit the placement of new species into the genus *Bacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, p. 2712 – 2726, 2013.

BITTON, G. *Wastewater Microbiology*, 3rd. Ed. Wiley - Liss, Hoboken, NJ. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 518 de 25 de março de 2004. 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, 26 de março de 2004, Seção 1, pg. 266.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, 14 de dezembro de 2011.

BRITO, L.A.; CARDOSO, A.B.; SALVADOR, D.P.; HELLER, L. Amadurecimento de filtros lentos de areia e remoção de microrganismos indicadores de qualidade da água ao longo da profundidade do leito: uma avaliação em instalação piloto. Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 10, n. 4, p. 307 – 317, 2005.

BROWN, R.A.; CORNWELL, D.A. Using spore removal to monitor plant performance for *Cryptosporidium* removal. *Journal of the American Water Works Association*, v. 99, n. 3, p. 95 - 109, 2007.

BUSTAMANTE, H.A; SHANKER, S.R., PASHLEY, R.M.; KARAMAN, M.E. Interaction between *Cryptosporidium* oocysts and water treatment coagulants. *Water Research*, v. 35, n. 13, p. 3179 – 3189, 2001.

CAREY, C. M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, v. 38, n. 4, p. 818 - 862, 2004.

CARTIER, C.; BESNER, M. C.; BARBEAU, B.; LAVOIE, J.; DESJARDINS, R.; PRÉVOST, M. Evaluating aerobic endospores as indicators of intrusion in distribution systems. *Journal of the American Water Works Association*, v. 101, n. 7, p. 46 - 58, 2009.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Parasites – *Cryptosporidium*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/crypto/index.html>>, Acesso em 21 de outubro de 2014.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Parasites - *Giardia*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/giardia/index.html>>, Acesso em 21 de outubro de 2014.

CERQUEIRA, D. A. *Remoção de oocistos de Cryptosporidium e indicadores no tratamento de água por ciclo completo, filtração direta descendente e dupla filtração, em escala piloto*. 2008. 214 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Departamento de Engenharia Hidráulica e Recursos Hídricos, 2008.

COFFEY, B. M. *et al.* The effect of optimizing coagulation on the removal of *Cryptosporidium parvum* and *Bacillus subtilis*. In: WATER QUALITY TECHNOLOGY CONFERENCE. 1999, Tampa, USA. *Proceedings...* Tampa, USA: AWWA, 1999.

CRAIK, S. A.; SMITH, D. W.; BELOSEVIC, M.; CHANDRAKANTH, M. Use of *Bacillus subtilis* spores as model-microorganisms for ozonation of *Cryptosporidium parvum* in drinking water treatment. *Journal of Environmental Engineering and Science*, v. 1, n. 3, p. 173 - 186, 2002.

DAI, X.; BOLL, J. Settling velocity of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. *Water Research*, v. 40, n. 6, p. 1321 - 1325, 2006.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A.D.B. Métodos e técnicas de tratamento de água. v. 1, 2ª ed. São Carlos: Rima, 2005.

DROZD, C.; SCHWARTZBROD, J. Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of *Cryptosporidium parvum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 4, p. 1227 - 1232, 1996.

DUGAN N. R.; FOX, K. R.; OWENS, J. H.; MILTNER, R. J. Controlling *Cryptosporidium* oocysts using conventional treatment. *Journal of the American Water Works Association*, v. 93, n. 12, p. 64 - 76, 2001.

DUGAN, N. R.; WILLIAMS, D. J. Removal of *Cryptosporidium* by in-line filtration: effects of coagulant type, filter loading rate and temperature. *Journal Water Science Research Technology*, Aqua, n. 53, p. 1 - 15, 2004.

DUMÈTRE, A.; AUBERT, D.; PUECH, P.H.; HOHWEYER, J.; AZAS, N.; VILLENA, I. Interaction Forces Drive the Environmental Transmission of Pathogenic Protozoa. *Applied Environment Microbiology*, v.78, n. 4, p. 905 - 912, 2012.

EMELKO, M. B.; HUCK, P. M.; DOUGLAS, I. P. *Cryptosporidium* and microsphere removal during late in-cycle filtration. *Journal of the American Water Works Association*, v. 95, n. 5, p.173 - 182, 2003.

FACILE, N.; BARBEAU, B.; PRÉVOST, M.; KOUDJONOU, B. Evaluating bacterial aerobic spores as a surrogate for *Giardia* and *Cryptosporidium* inactivation by ozone. *Water Research*, v. 34, n. 12, p. 3238 - 3246, 2000.

FAGUNDES, A.P. *Remoção de oocistos de Cryptosporidium por filtração direta: influencia de alguns fatores operacionais*. 2006. 148 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) - Faculdade de Tecnologia, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, 2006.

FALCCHI, R.L.C. *Contaminação por protozoários potencialmente patogênicos ao homem na água de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS*. 2006. 96f. Dissertação [Mestrado em Ciências (Microbiologia)] Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas - RS, 2006.

FARIAS, E. W. C. *Pesquisa de oocistos de Cryptosporidium spp. e Salmonella spp. em amostras de águas de esgoto e águas de córrego da cidade de São Paulo*. 2000. 109f. Dissertação [Mestrado em Ciências (Microbiologia)] Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2000.

FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. In: Fayer R. and Xiao L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Second Edition London: IWA Publishing, p.79 -118, 2007.

FERNANDES, N. M. G. *Influência do pH de coagulação e dosagem de sulfato de alumínio na remoção de oocistos de Cryptosporidium por filtração direta descendente*. 2007. 163 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília. Brasília, julho de 2007.

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 de São Paulo*, v. 43, n. 2, p.109 -111, 2001.

FRANCO, R. M. B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em Saúde Pública. *Revista Panamericana Infectologia*, v. 9, n. 4, p. 36-43, 2007.

GARVEY, M., CLIFFORD, E.; O'REILLY, E.; ROWAN, N.J. Efficacy of Using Harmless *Bacillus* Endospores to Estimate the Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Water. *Journal of Parasitology*, v. 99, n. 3, p. 448-452, 2013.

HALL, T.; PRESSDEE, J.; GREGORY, R; MURRAY, K. *Cryptosporidium* Removal during water treatment using dissolved air flotation. *Water Science and Technology*, v. 31, n. 3-4, p. 125-35, 1995.

HARRINGTON, G.W.; XAGORARAKI, I.; ASSAVASILAVASUKUL, P.; STANDRIDGE, J.H. Effect of filtration conditions on removal of emerging waterborne pathogens. *Journal of the American Water Works Association*, v. 95, n. 12, p. 95-104, 2003.

HACHICH, E. M. *et al.* *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of São Paulo State, Brazil. *Water Science and Technology*, v. 50, n. 1, p. 239 - 245, 2004.

HEALTH CANADA. FEDERAL PROVINCIAL TERRITORIAL COMMITTEE ON DRINKING WATER. Guidelines for Canadian drinking water quality. Summary table. Ottawa: Health Canada, 2012.

HUERTAS, A.; BARBEAU, B.; DESJARDINS, C.; GALARZA, A.; FIGUEROA, M. A.; TORANZOS, G.A. Evaluation of *Bacillus subtilis* and coliphage MS2 as indicators of advanced water treatment efficiency. *Water Science and Technology*, v. 47, n. 3, p. 255 – 259, 2003.

HIJNEN, W; MEDEMA, G. *Elimination of micro-organisms by water treatment processes: a review*. Kiwa Water Research, 3rd Edition, 2007.

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, n. 1, p. 1 - 38, 2007.

LACAZ - RUIZ, R. *Manual Prático de Microbiologia Básica*. São Paulo: Editora da Universidade São Paulo, 266 p. 2000.

LADEIA, M. M. Avaliação da eficiência da filtração rápida descendente na remoção de oocistos de *Cryptosporidium* sp em instalação piloto. 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

LADEIA, M. M.; HELLER, L.; VIEIRA M. B. C. M. Pesquisa de (oo)cistos de protozoários em amostras de águas de mananciais de abastecimento em Montes Claros/MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23, Campo Grande - MS, 2005. Anais... Campo Grande: ABES, 2005 (CD ROM).

LeCHEVALLIER, M. W.; NORTON, W. D. Examining relationships between particle counts and *Giardia*, *Cryptosporidium*, and turbidity. *Journal of the American Water Works Association*, v. 84, n. 12, p. 54 - 60, 1992.

LeCHEVALLIER, M. W.; AU, K.K. Water treatment and pathogen control: process efficiency in achieving safe drinking water. Geneva: WHO, IWA, p. 112, 2004.

LOGAN, N. A.; De VOS, P. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 21–128. Edited by P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer & B. L. Williams. New York: Springer, 2009.

LOGAN, N.A. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology*, v. 112, n. 3, p. 417 – 429, 2011.

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. 143f. Dissertação (mestrado em Engenharia Civil).

Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 2008.

MARSHALL M. M.; NAUMOVITZ, D.; ORTEGA, Y.; STERLING, C.R. Waterborne protozoan pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 10, n. 1, p. 67- 85, 1997.

MAZOUA, S.; CHAUVEHEID, E. Aerobic spore-forming bacteria for assessing quality of drinking water produced from surface water. *Water Research*, v. 39, n. 20, p. 5186 - 5198, 2005.

MEDEMA, G.J., SCHETS, F.M., TEUNIS P.F.M, HAVELAAR, A. H. Sedimentation of Free and Attached *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts in Water. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 64, n. 11, p. 4460 - 4466, 1998.

MUHAMMAD, N.; SINHA, R.; KRISHNAN, E.R., *et al.* Ceramic filter for small system drinking water treatment: Evaluation of membrane pore Size and importance of integrity monitoring. *Journal of Environmental Engineering-Asce*, v. 135, n. 11, p. 1181 - 1191, 2008.

NAKAMURA, L.K.; ROBERTS, M.S.; COHAN, F.M. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* subsp. nov, and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, p. 1211 -1215, 1999.

NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H.J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, n. 3, p. 548 – 572, 2000.

NIEMINSKI, E. C.; BELLAMY, W. D.; MOSS, L. R. Using surrogates to improve plant performance. *Journal of the American Water Works Association*, v. 92, n. 3, p. 67-78, 2000.

NIEMINSKI E.C.; ONGERTH, J.E. Removing *Giardia* and *Cryptosporidium* by conventional treatment and direct filtration. *Journal of the American Water Works Association*, v. 87, n. 9, p. 96 - 112, 1995.

ONGERTH, J.; E. PERCORARO, J. P. Removing *Cryptosporidium* using multimedia filters. *Journal of the American Water Works Association*, v. 87, n. 12, p. 83-89, 1995.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). Millennium development goals, 2008. Disponível em: <<http://www.um.org/millenniumgoals>>. Acessado em: setembro de 2014.

RICE, E.W.; FOX, K.R.; MILTNER, R.J.; LYTLE, D.A.; JOHNSON, C.H. Evaluating plant performance with endospores. *Journal American Water Works Association*, v. 88, n. 9, p. 122 - 130, 1996.

ROBERTSON, L.J.; GJERDE, B.K. Effects of the Norwegian winter environment on *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Microbiology Ecology*, v. 47, n. 4, p. 359-65, 2004.

ROSE, J.B.; HUFFMAN, D.E.; GENNACCARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26, n. 2, p. 113 - 123, 2002.

ŠLAPETÁ, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow?. *International Journal for Parasitology*, v.43, p. 957 – 970, 2013.

SEARCY, K.E.; PACKMAN, A.I; ATWILL, E.R.; HARTER, T. Association of *Cryptosporidium* parvum with suspended particles: impact on oocyst sedimentation. *Applied Environmental. Microbiology*, v. 71, n. 2, p. 1072 - 1078, 2005.

SETLOW, P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, v. 101, n. 3, p 514 - 525, 2006.

SHAW, K.; WALKER, S.; KOOPMAN, B. Improving filtration of *Cryptosporidium*. *Journal of the American Water Works Association*, v. 92, n. 11, p. 103 - 111, 2000.

SINCLAIR, R.G; ROSE, J.B.; HASHSHAM, S.A.; GERBA, C.P; HAAS, C.N. Criteria for selection of surrogates used to study the fate and control of pathogens in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 6, p. 1969 –1977, 2011.

SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; COOK, N.; NICHOLS, R.A.B.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*. v. 149, n. 1 - 2, p. 29 - 40, 2007.

SWERTFEGER, J.; METZ, D. H.; DE MARCO, J.; JACANGELO, J. G.; BRAGHETTA, A. Effect of filter media on cyst and oocyst removal. *Journal of the American Water Works Association*, v. 91, n. 9, p. 90 - 100, 1999.

THURSON, A.; FITZPATRICK, C.; TATTERSALL, J. The effects of filtration rate fluctuations on *Cryptosporidium* sized particle breakthrough. In: WATER QUALITY TECHNOLOGY CONFERENCE, 2000, Salt Lake City, USA. *Proceedings...* Salt Lake City, USA : AWWA, 2000.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *Guidance manual for compliance with the filtration and disinfection requirements for public water systems using surface water sources*. Washington, DC: USEPA, 1991.

Disponível em:  
<<http://www.epa.gov/safewater/mdbp/guidsws.pdf>> Acesso em: 22 Out. 2013

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *Guidance manual for Compliance with the Interim Enhanced Surface Water Treatment Rule: Turbidity Provisions*. EPA 815 –R 99-010. 1999.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY National Primary Drinking Water. Regulations: Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule; Final Rule. *Federal Register* – Part II – 40CFR, Parts 9, 141 and 142. 2006.

VERHILLE, S; HOFMANN, R; CHAURET, C.; ANDREWS, R. Indigenous bacterial spores as indicators of *Cryptosporidium* inactivation using chlorine dioxide. *Journal of Water and Health*, v. 1, n. 2, p 91 - 100, 2003

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. 2011. 163f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 2011.

VIEIRA, M.B.C.M; *et al.* Verificação da ocorrência de cistos de *Giardia*, oocistos de *Cryptosporidium* e indicadores bacterianos nos esgotos sanitários da Bacia do Ribeirão Arrudas, Belo Horizonte - MG. In: IX SILUBESA - SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITARIA E AMBIENTAL, Porto Seguro. *Anais...* Rio de Janeiro: ABES, 2000.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal Parasitology*, v. 38, n. 11, p. 1239 - 1255, 2008.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Report 2008 – Primary Health Care - Now More Than Ever. Disponível em: <<http://www.who.int/whr/2008/en/index.html>>. Acessado em: Setembro de 2014.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for drinking water quality*, 4th 3 edition. Geneva: WHO, 2011.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Progress on sanitation and drinking-water - 2013 update. Geneva: WHO, 2013.