

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE PESQUISAS HIDRÁULICAS

**OCORRÊNCIA E DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* sp E *Giardia* sp  
EM ÁGUAS BRUTAS DE ABASTECIMENTO DE  
FORMADORES DO LAGO GUAÍBA**

**EMÍLIA DO C. S. BERINO**

Porto Alegre, Setembro de 2004.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE PESQUISAS HIDRÁULICAS

**OCORRÊNCIA E DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* sp E *Giardia* sp  
EM ÁGUAS BRUTAS DE ABASTECIMENTO DE  
FORMADORES DO LAGO GUAÍBA**

**EMÍLIA DO C. S. BERINO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Recursos Hídricos.

**Orientador: Sérgio João de Luca**

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. David L. da Mota Marques	IPH/UFRGS
Prof. Dr. Carlos Nabuyoshi Ide	UFMS
Dra. Lúcia Cabral Schifino	Bolsista Pós-Doc/CNPq
Dra. Luciana de Souza Cardoso	Fundação Zoobotânica/RS

Porto Alegre, Setembro de 2004.

À minha mãe, a quem devo o  
meu caráter. Que sempre lutou,  
se sacrificou e pediu a Deus  
por mim, e tenho certeza,  
sempre fez o que acreditava ser  
o melhor.

Ao meu pai, “ *in memoriam* ”.

## Agradecimentos

A Deus, sem a permissão de quem eu jamais teria conseguido realizar algo.

À UFRGS e ao Instituto de Pesquisas Hidráulicas por contribuírem para o meu aprimoramento profissional.

Ao Prof. Sérgio João de Luca, que propositadamente, me deixou fazer tudo sozinha para que eu realmente pudesse aprender. Espero, de alguma forma, ter correspondido às suas expectativas enquanto orientador.

Ao PROSAB e FUNASA financiadores parciais deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa concedida, a qual viabilizou a minha permanência no curso.

À CORSAN, que abriu as portas das ETAs para as coletas.

À FEPAM, na pessoa do Engenheiro Enio Henriques Leite, pelo fornecimento dos dados de qualidade das águas dos Rios Taquari, Caí, Sinos e Gravataí.

Ao Centro de Biotecnologia da UFRGS, por partilhar equipamentos conosco.

À PUC, na pessoa do Prof. Luiz Gloc, por me conceder um bolsista do PET, Gustavo Piccinini.

A você Gustavo (Gu) meu bolsista, sem a ajuda de quem seria extremamente difícil realizar as análises e por agüentar meu mau humor e "atacume" nas semanas de coletas. Valeu Gú.

Aos meus colegas Jean Ricardo do Nascimento, que inúmeras vezes foi me auxiliar nas coletas e Altemar Vilar dos Santos que sempre tinha uma palavra de conforto nas horas de "pânico dourístico" (embora muitas vezes não conseguisse me convencer, mas era bom ter com quem contar) e Nilson Oliveira que muito me auxiliou nas configurações. Obrigada meninos.

Aos motoristas do IPH, Srs. Mário Manoel Cardoso e Anselmo Einlost.

A Vladimir, meu esposo, pelo companheirismo.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos cães e gatos do Campus que me permitiram ajudá-los proporcionando-me momentos de satisfação.

## Resumo

A giardiase e a criptosporidiose estão entre as enfermidades de veiculação hídrica originadas por protozoários que têm ganhado maior notoriedade nas últimas décadas. Os microrganismos causadores dessas doenças têm-se tornado um desafio para as empresas de abastecimento de água. Este trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência dos protozoários *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp nas águas brutas de quatro afluentes do Lago Guaíba: Rios Taquari, Caí, dos Sinos e Gravataí. Juntos, abastecem uma população de dezenas de municípios da Região Metropolitana de Porto Alegre. Foram feitas amostragens mensais, durante doze meses, em cada afluente. Foi empregado o método de filtração em membrana para pré-concentração, centrifugação para concentração, separação imunomagnética para purificação e comparados três métodos de detecção para ambos os microrganismos: DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), Safranina e Kinyoun para *Cryptosporidium* e DAPI, Iodo Lugol e Iodo Tricrômico para *Giardia*. A avaliação microscópica e contagem de (oo)cistos foram feitas utilizando-se microscopia de imunofluorescência e contraste de fase para o DAPI e microscopia óptica para as demais colorações. Obtiveram-se os seguintes resultados: para os Rios Taquari, Caí, dos Sinos e Gravataí, respectivamente: 75, 42, 33 e 25% das amostras foram positivas para *Cryptosporidium* e 92, 83, 67 e 50% para *Giardia*. As concentrações médias de *Giardia* foram superiores às de *Cryptosporidium* em todos os quatro afluentes. Os valores médios observados foram: 80 oocistos e 176 cistos/100L no Taquari; 47 oocistos e 66 cistos/100L no Caí; 19 oocistos e 53 cistos/100L no Sinos; 16 oocistos e 92 cistos/100L no Gravataí. Estes podem estar subestimados devido à baixa recuperação dos métodos analíticos existentes e empregados. As densidades encontradas indicam que os protozoários estão disseminados nas águas superficiais dos formadores do Lago Guaíba.

## Abstract

Giardiasis and cryptosporidiosis are waterborne diseases caused by protozoans that have become well-known in the last few decades. The microorganisms that cause these diseases have been a challenge to water supply utilities. The purpose of this study was to look at the occurrence of *Cryptosporidium* sp and *Giardia* sp protozoans in the bulk waters of four tributaries flowing into the Guaíba Lake: the Taquari, Cai, dos Sinos and Gravataí rivers. Together, they supply the population of dozens of municipalities in the metropolitan region of Porto Alegre. Monthly samplings were performed for twelve months in each tributary. The method used was membrane filtration for pre-concentration, centrifuging for concentration, immunomagnetic separation for purification and three detection methods were compared for both microorganisms: DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole), Safranin and Kinyoun for *Cryptosporidium* and DAPI, Lugol Iodine and Trichrome Iodine for *Giardia*. The microscopic evaluation and (oo)cyst count were performed using immunofluorescent microscopy and phase contrast for DAPI and optical microscopy for the other stains. The following results were obtained: for the Taquari, Cai, dos Sinos and Gravataí rivers, respectively: 75, 42, 33 and 25% of the samples were positive for *Cryptosporidium* and 92, 83, 67 and 50% for *Giardia*. The mean concentrations of *Giardia* were higher than those of *Cryptosporidium* in all four tributaries. The mean values observed were: 80 oocysts and 176 cysts /100L in the Taquari; 47 oocysts and 66 cysts/100L in the Cai; 19 oocysts and 53 cysts/100 L in the Sinos; 16 oocysts and 92 cysts/100L in the Gravataí. It is possible that these have been underestimated due to the low recovery of the existing analytic methods used. The densities found indicate that the protozoans are disseminated in the surface waters of the rivers forming the Guaíba Lake.

## Índice

Agradecimentos .....	iv
Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Índice .....	vii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas .....	xii
Lista de Anexos.....	xv
Lista de Abreviaturas e Símbolos .....	xvii
1 Introdução .....	1
2 Objetivos.....	4
2.1 Objetivo principal.....	4
2.2 Objetivos secundários.....	4
3 Revisão Bibliográfica.....	6
3.1 Informações gerais sobre protozoários .....	6
3.1.1 Morfologia.....	7
3.1.2 Ciclos Biológicos .....	8
3.1.3 Transmissão.....	10
3.1.4 Especificidade de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> .....	11
3.2 Registros de ocorrências de surtos de giardíase e criptosporidiose .....	14
Doses efetivas .....	18
3.3 Barreiras físicas e químicas contra <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> .....	19
3.4 Métodos de Detecção.....	21
3.4.1 Concentração .....	23
3.4.1.1 Concentração através da filtração com cartuchos e/ou membranas .....	23
3.4.1.2 Concentração através da centrifugação de fluxo contínuo (CF).....	27
3.4.1.3 Concentração através da filtração em coluna de areia.....	27
3.4.1.4 Filtros alternativos .....	28

3.4.2	Purificação .....	29
3.4.3	Detecção .....	30
3.5	Detecção de (oo)cistos em recursos hídricos.....	37
	Detecção de (oo)cistos em águas brutas e potabilizadas .....	39
3.6	Detecção de (oo)cistos em efluentes domésticos.....	44
3.7	Relações entre a ocorrência de (oo)cistos e variáveis ambientais.....	45
4	Metodologia.....	49
4.1	Localização das bacias hidrográficas.....	49
4.1.1	Rio Taquari.....	50
4.1.2	Rio Cai.....	50
4.1.3	Rio dos Sinos .....	51
4.1.4	Rio Gravataí.....	51
4.2	Qualidade histórica das águas avaliadas .....	52
4.2.1	Rio Taquari.....	54
4.2.2	Rio Cai.....	55
4.2.3	Rio dos Sinos.....	56
4.2.4	Rio Gravataí.....	57
4.3	Pontos de coletas .....	58
4.4	Amostragem .....	62
4.5	Processamento das amostras para detecção de (oo)cistos .....	62
4.5.1	Filtração.....	62
4.5.2	Eluição .....	65
4.5.3	Concentração .....	66
4.5.4	Separação Imunomagnética (SIM) .....	66
4.5.5	Coloração da amostra .....	67
4.6	Expressão dos resultados .....	72
4.7	Controles .....	72
4.7.1	Das colorações .....	72
4.7.2	Do aparelho de filtração.....	73
4.8	Análises das variáveis físico-químicas e biológicas.....	75



4.9	Metodologias de análises estatísticas dos dados .....	76
5	Resultados .....	78
5.1	Rio Taquari .....	79
5.1.1	Microrganismos: concentrações detectadas, comparação entre colorações e sazonalidade.....	80
5.1.2	Análises das correlações lineares e regressões múltiplas.....	83
5.2	Rio Caí.....	86
5.2.1	Microrganismos: concentrações detectadas, comparação entre colorações e sazonalidade.....	86
5.2.2	Análises das correlações lineares e regressões múltiplas.....	90
5.3	Rio dos Sinos .....	92
5.3.1	Microrganismos: concentrações encontradas, comparação entre colorações e sazonalidade.....	92
5.3.2	Análises das correlações lineares e regressões múltiplas.....	96
5.4	Rio Gravataí .....	97
5.4.1	Microrganismos: concentrações encontradas, comparação entre colorações e sazonalidade.....	97
5.4.2	Análises das correlações lineares e regressões múltiplas.....	100
5.5	Resultados dos três rios agrupados .....	102
5.5.1	Comparação entre técnicas e observação de sazonalidade.....	102
5.5.2	Análises das correlações lineares e regressões múltiplas.....	104
6	Discussão .....	107
6.1	Concentrações de microrganismos encontrados nos afluentes .....	107
6.2	Índices de recuperação .....	110
6.3	Colorações.....	111
6.4	Relações entre parâmetros de qualidade de água e microrganismos .....	113
7	Conclusões.....	118
8	Recomendações.....	121
9	Referências Bibliográficas.....	123
	Anexos.....	140

## Lista de Figuras

Item		Página
Figura 3.1	Ciclo de <i>Giardia lamblia</i>	8
Figura 3.2	Ciclo de <i>Cryptosporidium</i> sp	9
Figura 4.1.	Mapa da localização dos afluentes do Lago Guaíba e pontos de amostragem	52
Figuras 4.2.a a 4.2.d	Ponto de coleta às margens do Rio Taquari, (a) inverno e (b) verão, (c) ETA General Câmara e (d) ponto de coleta de água bruta na ETA; setas indicando gado pastando às margens do rio	58
Figuras 4.2.e a 4.2.g	(e) Ponto de coleta às margens do Rio Caí no inverno, (f) ETA Montenegro e (g) ponto coleta de água bruta dentro da ETA	59
Figuras 4.2.h a 4.2.j	(h) Ponto de coleta às margens do Rio dos Sinos no inverno, (i) ETA Niterói e (j) ponto de coleta de água bruta na ETA.	60
Figuras 4.2.k a 4.2.m	(k) Ponto de coleta às margens do Rio Gravataí no inverno, (l) ETA Alvorada e (m) ponto de coleta de água bruta na ETA (seta indicando torneira de água bruta)	61
Figura 4.3	Equipamento de filtração (seta indicando suporte onde é colocada a membrana)	63
Figura 4.4	Agitador e tubos cônicos de centrífuga contendo membranas para eluição	66
Figura 4.5	Fotomicrografia de (a) oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp e (b) cistos de <i>Giardia</i> sp corados com DAPI (400x) Fonte: Vieira (2002)	69
Figura 4.6	Fotomicrografia de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp em amostra controle de kit Merifluor <i>Cryptosporidium</i> / <i>Giardia</i> sp (Meridian Diagnostic, cat. no. 250050) corados com Kinyoun (aumento 1000x).	70
Figura 4.7	Fotomicrografia de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp em amostra controle de kit Merifluor <i>Cryptosporidium</i> / <i>Giardia</i> sp (Meridian Diagnostic, cat. no. 250050) corados com Safranina (aumento 1000x).	70

Figura 4.8	Fotomicrografia de cistos de <i>Giardia</i> sp em amostra controle de kit Merifluor <i>Cryptosporidium</i> / <i>Giardia</i> sp (Meridian Diagnostic, cat. no. 250050) corados com Iodo Lugol (400x)	71
Figura 4.9	Fotomicrografia de cistos de <i>Giardia</i> sp em amostra controle de kit Merifluor <i>Cryptosporidium</i> / <i>Giardia</i> sp (Meridian Diagnostic, cat. no. 250050) corados com Iodo Tricrômico (aumento de 400x)	71
Figura 5.1	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp no Rio Taquari detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Kinyoun (K) e Safranina (S) entre agosto/2002 e julho/2003	81
Figura 5.2	Cistos de <i>Giardia</i> sp no Rio Taquari detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Iodo Lugol (L) e Iodo Tricrômico (T) entre agosto/2002 e julho/2003	81
Figura 5.3	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp no Rio Caí detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Kinyoun (K) e Safranina (S) entre agosto/2002 e julho/2003	87
Figura 5.4	Cistos de <i>Giardia</i> sp no Rio Caí detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Iodo Lugol (L) e Iodo Tricrômico (T) entre agosto/2002 e julho/2003	88
Figura 5.5	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp no Rio dos Sinos detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Kinyoun (K) e Safranina (S) entre agosto/2002 e julho/2003	93
Figura 5.6	Cistos de <i>Giardia</i> sp no Rio dos Sinos detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Iodo Lugol (L) e Iodo Tricrômico (T) entre agosto/ 2002 e julho/2003	94
Figura 5.7	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp no Rio Gravataí detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Kinyoun (K) e Safranina (S) entre agosto/2002 e julho/2003	98
Figura 5.8	Cistos de <i>Giardia</i> sp no Rio Gravataí detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Iodo Lugol (L) e Iodo Tricrômico (T) entre agosto/ 2002 e julho/2003	99

## Lista de Tabelas

Item		Página
Tabela 3.1	Espécies de <i>Cryptosporidium</i> e seus respectivos hospedeiros	13
Tabela 3.2	Espécies de <i>Giardia</i> e seus respectivos hospedeiros	13
Tabela 3.3	Registros de ocorrências de surtos de Criptosporidiose e Giardiase em vários países	17
Tabela 3.4	Características de <i>Cryptosporidium</i> sp e sua significância epidemiológica	19
Tabela 3.5	Valores de K para a inativação de diversos microrganismos [K= C x T, em que C = concentração do desinfetante (mg/L) ; T = tempo de contato (min)]	19
Tabela 3.6	Recuperação de cistos de <i>Giardia</i> sp utilizando vários métodos de concentração	25
Tabela 3.7	Recuperação de oocistos em sistemas de colunas de areia a diferentes taxas de fluxo	28
Tabela 3.8	Porcentagem de recuperação de (oo)cistos com metodologias que utilizam separação imunomagnética	29
Tabela 3.9	Turbidez e número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp e cistos de <i>Giardia</i> sp detectados em águas superficiais do Rio Atibaia por RM (membrana lavada e raspada) /ADM (membrana dissolvida em acetona)	32
Tabela 3.10	Metodologias utilizadas na detecção de cistos de <i>Giardia</i> sp e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp	36
Tabela 3.11	Ocorrência média de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> e cistos de <i>Giardia</i> detectados em águas da África do Sul	39
Tabela 3.12	Resultados de investigações de ocorrência de <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> em amostras de água bruta e tratada de seis ETAs na Alemanha (julho a dezembro de 1995)	41
Tabela 3.13	Registros de ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em diversos ambientes aquáticos	44

Tabela 3.14	Registros de ocorrência de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em esgotos brutos e tratados em vários países	45
Tabela 4.1	Coordenadas UTM dos pontos de coleta	52
Tabela 4.2	Valores médios dos parâmetros de qualidade da água do Rio Taquari (Ponto TA 004), obtidos ao longo dos anos 2002 e 2003	53
Tabela 4.3	Valores médios dos parâmetros de qualidade da água do Rio Caí (Ponto CA014), obtidos ao longo dos anos 1999 e 2000	53
Tabela 4.4	Valores médios dos parâmetros de qualidade da água do Rio Sinos (Ponto SI 008), obtidos ao longo dos anos 2002 e 2003	54
Tabela 4.5	Valores médios dos parâmetros de qualidade da água do Rio Gravataí (Ponto GA 006), obtidos ao longo dos anos de 2002 e 2003	54
Tabela 4.6	Percentagens médias de recuperação de <i>Cryptosporidium</i> sp e <i>Giardia</i> sp com as diferentes técnicas de detecção (teste de calibração)	74
Tabela 4.7	Variáveis ambientais e técnicas analíticas empregadas	75
Tabela 5.1	Teste de aleatorização entre os quatro rios com dados de qualidade de água, obtidos durante o período compreendido entre agosto/2002 e julho 2003	79
Tabela 5.2	Detecção de (oo)cistos nas águas brutas do Rio Taquari, utilizando Imunofluorescência, Kinyoun, Safranina, Iodo Lugol e Iodo Tricrômico	80
Tabela 5.3	Resultado do teste de hipóteses para diferença entre os meses em relação ao microrganismo <i>Giardia</i> sp no Rio Taquari (valores de contrastes significativos)	83
Tabela 5.4	Correlação linear entre o número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp e cistos de <i>Giardia</i> sp detectados e variáveis ambientais analisadas no Rio Taquari	84
Tabela 5.5	Detecção de (oo)cistos nas águas brutas do Caí, utilizando Imunofluorescência, Kinyoun, Safranina, Iodo Lugol e Iodo Tricrômico	87
Tabela 5.6	Resultado do teste de hipóteses para diferença entre os meses em relação ao microrganismo <i>Giardia</i> sp no Rio Caí (valores de contrastes significativos)	89
Tabela 5.7	Correlação linear entre o número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp e cistos de <i>Giardia</i> detectados e variáveis ambientais analisadas no Rio Caí	90

Tabela 5.8	Detecção de (oo)cistos nas águas brutas do Rio dos Sinos, utilizando Imunofluorescência, Kinyoun, Safranina, Iodo Lugol e Iodo Tricrômico	93
Tabela 5.9	Resultado do teste de hipóteses para diferença entre as técnicas utilizadas para detecção do microrganismo <i>Cryptosporidium</i> sp no rio dos Sinos	95
Tabela 5.10	Resultado do teste de hipóteses para diferença entre os meses em relação ao microrganismo <i>Giardia</i> sp no Rio dos Sinos (valores de contrastes significativos)	95
Tabela 5.11	Correlação linear entre o número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp e cistos de <i>Giardia</i> sp detectados e variáveis ambientais analisadas no Rio dos Sinos	96
Tabela 5.12	Detecção de (oo)cistos nas águas brutas do Rio dos Gravataí, utilizando Imunofluorescência, Kinyoun, Safranina, Iodo Lugol e Iodo Tricrômico	98
Tabela 5.13	Correlação linear entre o número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp e cistos de <i>Giardia</i> sp detectados e variáveis ambientais analisadas no Rio Gravataí	101
Tabela 5.14	Resultado do teste de hipóteses para diferença entre as técnicas utilizadas para detecção do microrganismo <i>Cryptosporidium</i> sp nos três rios agrupados (Taquari, Caí e dos Sinos)	103
Tabela 5.15	Resultado do teste de hipóteses para diferença entre os meses em relação ao microrganismo <i>Cryptosporidium</i> sp nos três rios agrupados (Taquari, Caí e dos Sinos) (valores de contrastes significativos)	103
Tabela 5.16	Resultado do teste de hipóteses para diferença entre os meses em relação ao microrganismo <i>Giardia</i> sp nos três rios agrupados (Taquari, Caí e dos Sinos) (valores de contrastes significativos)	104
Tabela 5.17	Correlação linear entre o número de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp e cistos de <i>Giardia</i> sp detectados e variáveis ambientais analisadas nos três rios agrupados (Taquari, Caí e dos Sinos, agrupados)	105

## Lista de Anexos

Item		Página
Anexo 1.1	Método de Coloração com DAPI	141
Anexo 1.2	Método modificado de Kinyoun (a frio)	142
Anexo 1.3	Método modificado da Safranina (a quente)	143
Anexo 1.4	Método Iodo de Lugol	144
Anexo 1.5	Método Corante Iodo Tricrômico	144
Anexo 2.1	Resultados de análises físico-químicas e biológicas do Rio Taquari, ponto TA 004, nos anos de 2002 e 2003 (Fonte: Fepam)	145
Anexo 2.2	Resultados de análises físico-químicas e biológicas do Rio Caí, ponto CA 014, nos anos de 1999 e 2000 (Fonte: Fepam)	146
Anexo 2.3	Resultados de análises físico-químicas e biológicas do Rio dos Sinos, ponto SI 008, no ano de 2002 (Fonte: Fepam)	147
Anexo 2.4	Resultados de análises físico-químicas e biológicas do Rio dos Sinos, ponto SI 008, no ano de 2003 (Fonte: Fepam)	148
Anexo 2.5	Resultados de análises físico-químicas e biológicas do Rio Gravataí, ponto GR006, no ano de 2002 (Fonte: Fepam)	149
Anexo 2.6	Resultados de análises físico-químicas e biológicas do Rio Gravataí, ponto GR006, no ano de 2003 (Fonte: Fepam)	150
Anexo 2.7	Dados de vazão dos Rios Taquari, Caí, dos Sinos e Gravataí (Fonte: CPRM)	151
Anexo 3.1	Resultados das análises realizadas no Rio Taquari entre agosto/2002 e julho/2003	152
Anexo 3.2	Resultados das análises realizadas no Rio Caí entre agosto/2002 e julho/2003	153
Anexo 3.3	Resultados das análises realizadas no Rio dos Sinos entre agosto/2002	

	e julho/2003	154
Anexo 3.4	Resultados das análises realizadas no Rio Gravataí entre agosto/2002 e julho/2003	155



## Lista de Abreviaturas e Símbolos

- ADM - Método da Dissolução em Acetona
- ANOVA- Análise de variância
- CDC - Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA
- CDSC - Communicable Disease Surveillance Center, Atlanta, EUA
- CF-Centrifugação por fluxo contínuo
- CORSAN - Cia Riograndense de Saneamento
- DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio
- DQO - Demanda Química de Oxigênio
- ETA - Estação de Tratamento de Água
- ETE - Estação de Tratamento de Esgoto
- FAURGS - Fundação de Apoio à Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS
- FEPAM - Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Roessler/SEMA/RS
- FINEP - Financiadora de Estudos de Projetos/MCT
- FUNASA - Fundação Nacional de Saúde/MS
- ICR - "Information Collection Requeriment Rule"
- IFA - Ensaio de Imunofluorescência
- IPH - Instituto de Pesquisas Hidráulicas
- MLCG - Nível Máximo de Contaminante (Maximum Contaminant Level Goal)
- MS - Ministério Público
- NTU - Unidade Nefelométrica de Turbidez
- OD - Oxigênio dissolvido
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- PBS - Tampão Salina Fosfato
- PBS - Tampão Salina Fosfato
- PCR - Reação de Polimerase em Cadeia

PUC - Pontifícia Universidade Católica

RM - Membrana Cortada e Enxaguada

SIM - Separação Imunomagnética

TDH - Tempo de Detenção Hidráulica

THMs - Trihalometanos

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos EUA

UV - Ultravioleta

# 1 INTRODUÇÃO

A giardíase e a criptosporidiose estão entre as enfermidades de veiculação hídrica originadas por protozoários que têm ganhado maior notoriedade nas últimas décadas. A *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp, microrganismos que desencadeiam estas doenças, têm sido referenciados como “patógenos emergentes”. Por serem muito resistentes aos tratamentos convencionais, estes organismos têm causado problemas na produção e distribuição de água potável em muitos países.

Segundo Sogayar (2001), o protozoário *G. lamblia* (= *G. duodenalis* = *G. intestinalis*) foi observado pela primeira vez, em suas próprias fezes, por Anton van Leewenhoek (1681) *apud* Sogayar (2001), inventor do microscópio. Vilem Lambl (1859) *apud* Sogayar (2001) redescreveu o parasita e as formas de trofozoíta e cisto, porém as primeiras evidências da sua patogenicidade foram sugeridas por Fantham & Porter (1916) *apud* Sogayar (2001), ao correlacionarem o parasita com os sintomas e as fezes diarréicas de soldados que retornavam da guerra. Estes autores também demonstraram que microrganismos isolados de fezes destes pacientes poderiam produzir diarréia em pintinhos. Embora o estudo clínico de Renddtorff tenha sugerido o papel patogênico da *Giardia* ao homem, o fato de que a maioria das infecções se mostrava assintomática fez com que a idéia de a *Giardia* não ser patogênica prevalecesse por muitos anos. Recentemente, Nash et al. (1987) *apud* Sogayar (2001), em estudo experimental com voluntários humanos, conseguiram preencher os postulados de Kock para a *G. lamblia*, estabelecendo dessa maneira sua patogenicidade.

Além de humanos, a *G. duodenalis* afeta outros animais causando uma variedade de sintomas: diarréia, flatulência, distensão e câimbras abdominais, perda de peso, anemia e retardo no crescimento. Este microrganismo é considerado uma das causas mais comuns de gastroenterites no mundo (Pickerling & Engelkirk, 1988 *apud* Franco et al., 2001). O período de

incubação é de uma a quatro semanas, com média de 7 a 10 dias (Furtado, 2002). Os tratamentos mais utilizados são albendazol e mebendazol (Lane & Lloyd, 2002).

O outro patógeno em questão, *Cryptosporidium*, foi descrito como parasita de animais inferiores em 1907. Porém, a infecção em humanos, só veio a ser reconhecida em 1976 e, até o surgimento dos primeiros casos clínicos de AIDS, foi considerada eventualidade rara. A partir de 1983, em decorrência do desenvolvimento de técnicas de diagnóstico coprológico mais sensíveis, surtos de diarreia causados por este microrganismo foram identificados em grande quantidade de pacientes HIV positivos. Posteriormente, ficou evidente que este patógeno não se limitava a desenvolver comportamento oportunista em pacientes imunodeprimidos (pacientes sob tratamento para certos tipos de câncer, transplantados e, principalmente, portadores de AIDS), mas freqüentemente era encontrado associado a processos diarreicos autolimitados em indivíduos imunocompetentes (Chieffi, 2001).

Este microrganismo causa uma doença de remissão espontânea em adultos saudáveis, mas extremamente grave em grupos mais vulneráveis, tais como crianças, idosos e imunodeprimidos (Hachich et al., 2000). Esta enfermidade pode ser particularmente severa e os sintomas comuns são: diarreia, vômito, dores abdominais, febre e sintomas de gripe (Fricker & Clancy, 1998; Harwood, 2001). O período de incubação é de 2-14 dias. Embora hospedeiros saudáveis possam ser assintomáticos ou apresentar leves sintomas, pacientes imunodeprimidos apresentam diarreia aquosa, copiosa e contínua por um extenso período. Em tais pacientes a infecção com *Cryptosporidium* é normalmente restrita ao trato intestinal, contudo, dependendo do grau de imunodepressão e da cepa do protozoário, podem ocorrer infecções extra-intestinais. Em certos indivíduos imunocomprometidos, os sintomas da doença podem persistir indefinidamente e não existe tratamento efetivo com droga específica para esta enfermidade (Smith, 1992). O método mais comum de diagnóstico é a identificação microscópica dos oocistos nas fezes, utilizando técnicas de corantes “acid-fast”. Mas a utilização da imunofluorescência direta, com anticorpos monoclonais e policlonais tem aumentado. Este último teste é mais aplicado a pesquisas em plantas de tratamento de água (Fahey, 2003).

Pelo fato de serem microrganismos hidrottransmissíveis, alguns países já começaram a estipular regras no sentido de melhorar o controle destes patógenos, durante o tratamento d' água. Um dos primeiros países a se preocupar com esta questão foram os EUA. Os Estados

Unidos (1998) estabeleceram um nível máximo de contaminante (MLCG - Maximum Contaminant Level Goal) de zero e o monitoramento de índices como a turbidez, além de determinar a remoção de 99% para *Cryptosporidium*, quando usado somente processo de filtração. Acredita-se que a implementação dessas medidas irá reduzir significativamente os níveis do protozoário na água final, diminuindo a ocorrência de surtos da doença aumentando a proteção contra a exposição a outros microrganismos patogênicos, incluindo *Giardia* sp, bactérias e vírus (Hachich et al., 2000; Quintero-Betancourt et al., 2002). A USEPA tem sugerido que 1 infecção por 10.000 hab./ano é um risco aceitável para agentes infecciosos adquiridos através de água potável (Rose & Gerba, 1991; Haas, 1996). Porém, apesar de estipular avaliações para as performances dos tratamentos, não exige um monitoramento rotineiro para *Cryptosporidium*.

No Reino Unido, a legislação exige que a água seja monitorada diariamente e estipula um nível máximo aceitável de 10 oocistos/100L (Fairley et al., 1999; Schor, 2000). Segundo Mara & Feachem (1999), o risco mínimo associado a *Cryptosporidium* na água potável é de 10 oocistos/100L (0,1 oocisto/dia para ingestão em 1 L de água).

As estações de tratamento de água brasileiras não foram projetadas para remover ou inativar estes microrganismos, a não ser indiretamente. Brasil (2004) recomenda a inclusão de pesquisa de organismos patogênicos, tendo como meta atingir um padrão de ausência de enterovírus, cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. Ainda visando assegurar a adequada eficiência de remoção daqueles organismos, recomenda que, para a filtração rápida, se estabeleça como meta a obtenção de efluente filtrado com valores de turbidez inferiores a 0,5 UNT em 95% dos dados mensais e nunca superiores a 5,0 unidades de turbidez.

São poucos os dados e inexitem, ainda, informações numéricas confiáveis a respeito da ocorrência desses patógenos nos recursos hídricos da Região Metropolitana de Porto Alegre. Este trabalho procura alertar para este fato e pretende mostrar a necessidade de se considerar a variável protozoários emergentes no tratamento e distribuição de água potável na região.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo principal

Não existem, na literatura especializada, dados a respeito da ocorrência ou das densidades dos protozoários emergentes, *Cryptosporidium* e *Giardia*, em águas de formadores do Lago Guaíba, os quais são empregados como fonte de abastecimento público de água, indicando a necessidade de ser avaliada a sua segurança sanitária.

O principal objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em águas brutas aduzidas dos rios Taquari, Caí, dos Sinos e Gravataí, em tomadas d'água junto à foz, empregando distintos métodos de corantes específicos para a detecção daqueles protozoários.

### 2.2 Objetivos secundários

Considerando-se que há muita discussão na literatura a respeito de métodos clássicos de detecção que poderiam ser empregados em estações de tratamento de água, efetuou-se, como objetivo secundário, uma comparação entre três corantes específicos para a qualificação dos protozoários patogênicos ora estudados, visando identificar quais os métodos mais sensíveis e adequados para a utilização na detecção destes microrganismos.

Ainda, secundariamente, objetivou-se verificar a associação entre as contagens de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* e variáveis ambientais tais como Temperatura,

Turbidez, Sólidos Totais, pH, UV 254, Condutividade, OD, DBO<sub>5</sub>, DQO, Nitrogênio Total, Fósforo Total, Vazão e Coliformes fecais/*E.coli*.

Finalmente, pelos indicativos de Brasil (2004), anteriormente citado, recomendando que para uma adequada eficiência na remoção de (oo)cistos bastaria controlar a turbidez a valores menores que 0,5 UNT em 95% dos dados mensais, este trabalho também teve a finalidade de verificar se haveria segurança sanitária, no que concerne a *Cryptosporidium* e *Giardia*, seguindo-se aquela norma.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica abordou aspectos sobre características gerais dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia*, tais como: morfologia, ciclos de vida, formas de transmissão e especificidade parasita x hospedeiro. Além dos tópicos anteriores, foi feito um levantamento de registros de surtos causados por estes microrganismos e sua ocorrência em diversos países e doses efetivas capazes de desencadear as enfermidades, métodos químicos e físicos que têm sido utilizados para conter e/ou inativar estes microrganismos.

Entre os métodos físicos, observou-se especialmente os métodos de recuperação e detecção de (oo)cistos utilizados em águas brutas e tratadas e a detecção em recursos hídricos e efluentes domésticos.

Finalmente, foram citadas algumas pesquisas sobre a associação dos microrganismos com variáveis ambientais normalmente avaliadas em índices de qualidade de água.

### 3.1 Informações gerais sobre protozoários

Os protozoários são organismos eucarióticos unicelulares. Segundo Levine (1980) *apud* Vitor (2000), o sub-reino Protozoa compõe-se de sete filos, sendo quatro de interesse para a parasitologia: Filo Sarcomastigophorea, Filo Apicomplexa, Filo Ciliophora e Filo Microspora. A *Giardia* pertence ao primeiro filo e o *Cryptosporidium* ao segundo.



### 3.1.1 Morfologia

A descrição da morfologia, aqui referenciada, foi realizada por Sogayar & Guimarães (2000).

#### *Giardia lamblia*

Este microrganismo apresenta duas formas: o trofozoíto (forma ativa do protozoário, na qual ele se alimenta e se reproduz, por diferentes processos) e o **cisto** (forma de resistência). O trofozoíto tem formato de pêra, com simetria bilateral e mede 20  $\mu\text{m}$  de comprimento por 10  $\mu\text{m}$  de largura. O cisto é oval ou elipsóide, medindo cerca de 12 $\mu\text{m}$  de comprimento por 8 $\mu\text{m}$  de largura. Quando corado, pode mostrar uma delicada membrana destacada do citoplasma. No seu interior encontram-se dois ou quatro núcleos, um número variável de fibrilas (axonema de flagelos) e os corpos escuros com forma de meia-lua, situados no pólo oposto aos núcleos.

#### *Cryptosporidium* sp

Este parasito apresenta diferentes formas estruturais que podem ser encontradas nos tecidos (formas endógenas), nas fezes e no meio ambiente (formas exógenas - os **oocistos**). Os oocistos do *Cryptosporidium* são pequenos, esféricos ou ovóides (4 a 6  $\mu\text{m}$ ) e, quando eliminados nas fezes, contêm quatro esporozoítos livres no seu interior.

Portanto, tem-se que **Cistos e Oocistos** são formas de resistência dos protozoários *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp, respectivamente. O protozoário secreta uma parede resistente (parede cística) que o protegerá quando estiver em meio impróprio ou em fase de latência (os cistos podem ser encontrados em tecidos ou fezes dos hospedeiros; os oocistos são encontrados em fezes do hospedeiro e provenientes de reprodução sexuada do protozoário) (Vitor, 2000).

### 3.1.2 Ciclos Biológicos

#### *Giardia*

A *Giardia lamblia* tem um ciclo de vida simples em dois estágios (figura 3.1). O estágio infeccioso é o **cisto**, que o hospedeiro ingere através do contato fecal-oral. A exposição ao ácido estomacal e aos sais biliares estimula a liberação dos trofozoítos dos cistos. Aqueles atacam e colonizam a superfície dos intestinos, passam através do intestino delgado, são encistados e liberados pelas fezes (Monis & Thompson, 2003).

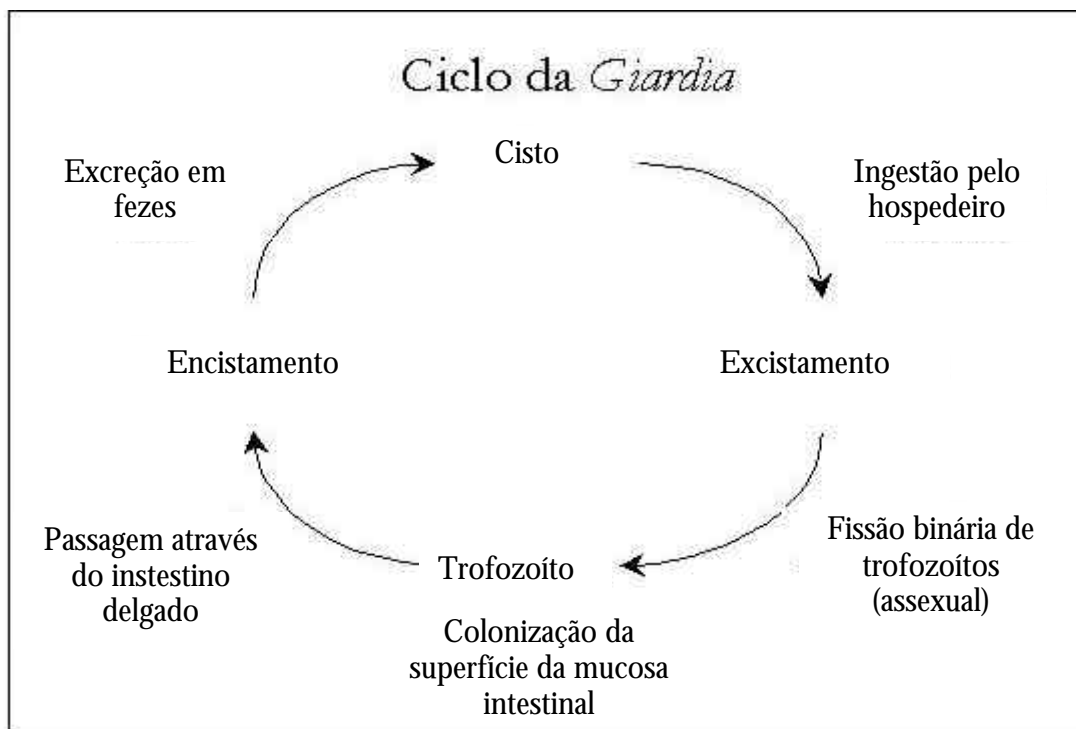


Figura 3.1. Ciclo de *Giardia lamblia* (Fonte: Monis & Thompson, 2003).

## *Cryptosporidium* sp

O *Cryptosporidium* tem um ciclo de vida mais complexo que a *Giardia*. O estágio infeccioso é o oocisto. Após a ingestão pelo hospedeiro, os esporozoítos são liberados dos oocistos e infectam as células dos intestinos. Os esporozoítos diferenciam-se em trofozoítos que por sua vez irão se transformar em merontes tipo I. Os merozoítos tipo I, liberados pelos merontes tipo I, saem das células hospedeiras podendo infectar outras células. Estes merozoítos podem então iniciar uma reprodução sexual diferenciando-se em trofozoítos ou iniciar um ciclo sexual diferenciando-se em merontes tipo II. Os Oocistos são produzidos seguindo a reprodução sexual, sendo produzidos dois tipos: de parede espessa, que são as formas infecciosas encontradas no meio ambiente e de parede fina, que causam a auto-infecção (Monis & Thompson, 2003).

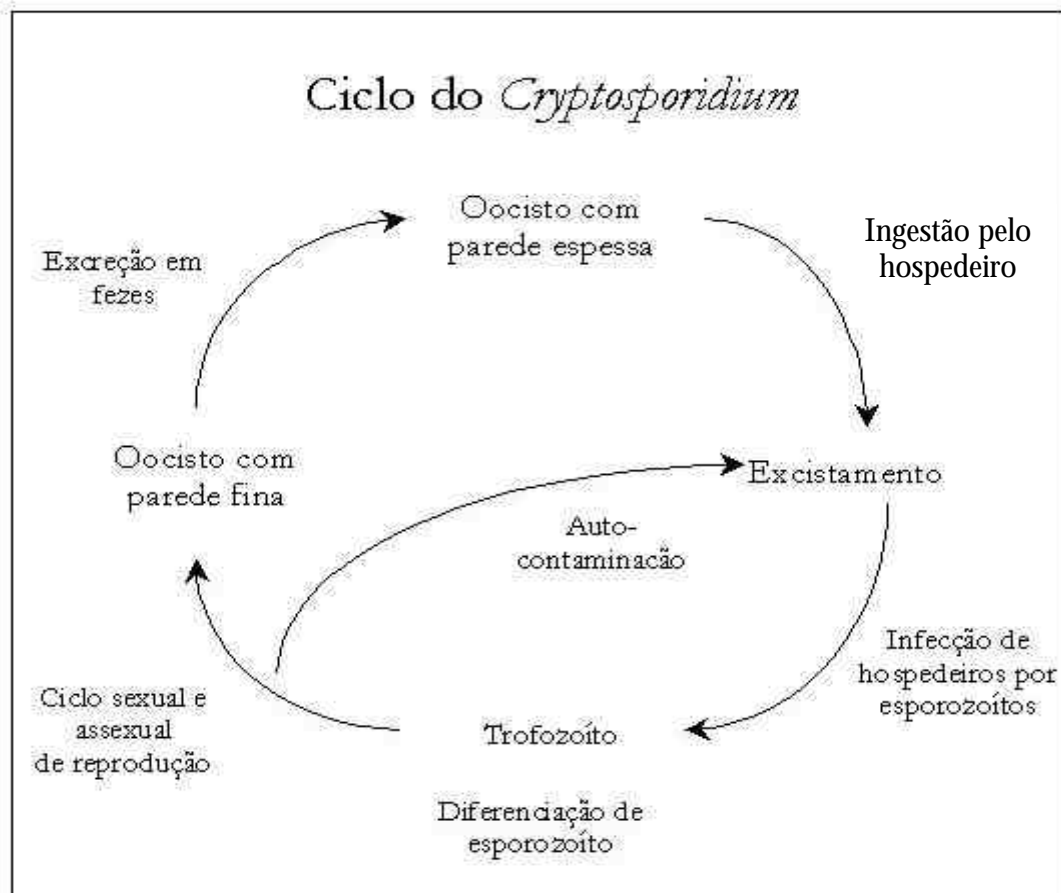


Figura 3.2. Ciclo de *Cryptosporidium* sp (Fonte: Monis & Thompson, 2003).

### 3.1.3 Transmissão

#### *Giardia lamblia*

De acordo com Sogayar & Guimarães (2000), a via normal de infecção do homem dá-se pela ingestão de cistos maduros, que ocorrem, principalmente, através de:

- ingestão de águas superficiais sem tratamento ou deficientemente tratadas (só com cloro); alimentos contaminados (verduras cruas e frutas mal lavadas); esses alimentos também podem ser contaminados por cistos veiculados por moscas e baratas;
- as águas superficiais e recreacionais podem ser contaminadas também com fezes de animais contaminados através do carreamento da água da chuva;
- de pessoa a pessoa, por meio das mãos contaminadas, em locais de aglomeração humana (creches, orfanatos, etc.); e entre membros familiares, quando se tem um dos membros da família com giardiase ou em creche;
- através de contatos sexuais;
- e por contato com animais domésticos infectados com *Giardia* de morfologia semelhante à humana. Este último mecanismo ainda é discutível, apesar de a OMS considerar a giardiase uma zoonose.

#### *Cryptosporidium* sp

Segundo Sogayar & Guimarães (2000) e Kosek et al. (2001), a transmissão da criptosporidiose é feita pelas seguintes vias:

- pessoa a pessoa: observada em ambientes com alta densidade populacional, como creches e hospitais;

- animal a pessoa: ocorre como consequência do contato direto de pessoas com animais jovens, principalmente bezerros e cordeiros que apresentam diarreia e se encontram eliminando oocistos;
- pessoa a animal: ocorre quando indivíduos infectados manipulam animais suscetíveis.

A contaminação do meio ambiente com fezes humanas ou de animais infectados pode atingir alimentos e fontes de água usadas para consumo (poços artesianos, reservatórios e rede de distribuição) ou para recreação (piscinas), resultando em surtos de criptosporidiose. Estes surtos têm sido assinalados em diversas localidades dos EUA e da Europa (Kosek et al., 2001).

### 3.1.4 Especificidade de *Cryptosporidium* e *Giardia*

Algumas pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de reconhecer as espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* que são patogênicas ao homem. Estudos de transmissão cruzada têm demonstrado pequena especificidade parasita-hospedeiros em alguns isolados (Levine, 1984).

Xiao et al. (2001) identificaram, genotipicamente, *Cryptosporidium* em 132 amostras fecais de 80 crianças residentes em Lima-Perú. De 85 episódios de infecção, 67 (79%) foram devidos ao genótipo humano de *Cryptosporidium parvum* e 18 devidas a espécies que são consideradas zoonóticas: 8 do genótipo bovino de *C. parvum*, 7 do *C. meleagridis*, 2 do *C. canis* e 1 do *C. felis*. Nenhuma infecção com mais de um tipo de genótipo foi verificada. Para as crianças infectadas com genótipo humano de *Cryptosporidium* comparadas àquelas infectadas com genótipos zoonóticos, não havia diferenças quanto ao consumo de água, saneamento, ou convívio com animais (não havia gado na comunidade urbana ou diferenças sócio-econômicas).

Embora mais de 23 espécies de *Cryptosporidium* já tenham recebido nomenclatura oficial, apenas oito (*C. baileyi*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. nesorum*, *C. parvum*, *C. serpentis* e *C. wrairi*) são aceitas como espécies individuais baseadas em características biológicas (Kosek et al., 2001).

Pesquisas recentes têm mostrado que *Cryptosporidium parvum* apresenta dois genótipos distintos: Genótipo 1 (ou genótipo H para humanos) e o Genótipo 2 (ou genótipo C - “calf” - para gados) o qual ocorre em vários animais, incluindo humanos. Raramente, ambos os genótipos foram encontrados infectando a mesma pessoa. Os principais estudos de transmissão cruzada de criptosporidiose, especialmente antes da década de 1990, foram conduzidos sem confirmação da identificação genética dos isolados (O’Donoghue et al., 1987 *apud* Monis & Thompson, 2003).

Kosek et al. (2001) e Dillingham et al. (2002) também se referem a dois genótipos distintos, o genótipo 1, que infecta humanos, e o genótipo 2, que infecta humanos e bovinos. Estes são ditos os mais importantes agentes em doenças humanas, embora *C. meleagridis*, *C. felis* e *C. canis* tenham sido identificados em fezes de HIV positivos e negativos. Tanriverdi et al. (2003) e Monis & Thompson (2003) descrevem estes genótipos como duas espécies distintas *C. parvum* e *C. hominis*. Ainda, segundo Tanriverdi et al. (2003) infecções experimentais em gado e ovelha indicam, no entanto, que a especificidade não é absoluta. Na verdade, até hoje, segundo Monis & Thompson (2003), poucos estudos têm examinado a prevalência destas enfermidades caracterizando genotipicamente os isolados.

Originalmente, ovelhas eram tidas como fontes suspeitas de infecção (Crockett & Haas, 1997), mas estudos revelaram que o genótipo prevalente nestes animais não estava correlacionado com isolados de amostras humanas resultantes de surtos. Da mesma forma, cães e outros animais de companhia podem não ser importantes reservatórios destas enfermidades. Em relação a ambos os microrganismos, *Cryptosporidium* e *Giardia*, são necessários estudos mais aprofundados para determinar se há riscos de infecção advindos de “pets” (Monis & Thompson, 2003). A tabela 3.1. exibe os nomes das espécies conhecidas de *Cryptosporidium* com seus respectivos hospedeiros.

Tabela 3.1. Espécies de *Cryptosporidium* e seus respectivos hospedeiros.

<b>Espécies reconhecidas e hospedeiros de <i>Cryptosporidium</i></b>	
<b>Espécies</b>	<b>Hospedeiros</b>
<i>C. andersoni</i>	gado
<i>C. baileyi</i>	galinhas
<i>C. canis</i>	cachorros
<i>C. felis</i>	gatos
<i>C. hominis</i>	humanos
<i>C. meleagridis</i>	perús
<i>C. molnari</i>	peixes marinhos
<i>C. muris</i>	ratos
<i>C. nasorum</i>	peixes
<i>C. parvum</i>	152 espécies de mamíferos incluindo leões marinhos e ursos polares
<i>C. serpentis</i>	répteis
<i>C. ucairiri</i>	porcos
<i>C. wrairi</i>	porco da Guiné

Fonte: Szewzyk et al. (2000), Rose & Huffman (2002), Monis & Thompson (2003).

Quanto às espécies de *Giardia*, apenas seis são reconhecidas atualmente, e somente a *G. duodenalis* é conhecida por infectar múltiplas espécies (Thompson, 2000 *apud* Monis & Thompson, 2003). A tipagem molecular de diferentes isolados mostrou que, com poucas exceções, há uma alta similaridade entre as cepas (Szewzyk et al., 2000). A tabela 3.2 exibe os nomes das espécies conhecidas de *Giardia* com seus respectivos hospedeiros.

Tabela 3.2. Espécies de *Giardia* e seus respectivos hospedeiros.

<b>Espécies reconhecidas e hospedeiros de <i>Giardia</i></b>	
<b>Espécies</b>	<b>Hospedeiros</b>
<i>G. agilis</i>	sapos
<i>G. ardeae</i>	garças
<i>G. duodenalis</i> (sin. <i>G. intestinalis</i> , <i>G. lamblia</i> )	mamíferos (incluindo humanos e "pets")
<i>G. microti</i>	roedores
<i>G. muris</i>	camundongos
<i>G. psittaceae</i>	pássaros

Fonte: Monis & Thompson (2003).

De acordo com Lane & Lloyd (2002), embora cães e gatos possam apresentar infecção por este parasita, não significa que estes animais possam transmita-la ao homem, pois as cepas

são distintas. Porém, Szewzyk et al. (2000) afirmam que tipos moleculares diferentes de isolados de *Giardia* mostram que, com poucas exceções, ocorre uma alta similaridade entre todas as cepas.

### 3.2 Registros de ocorrências de surtos de giardiase e criptosporidiose

A ausência de detecção de um surto não indica a ausência da doença. A enfermidade pode estar presente mesmo que uma epidemia não seja notada (Haas & Rose, 1995). Por outro lado, mesmo durante ocorrências registradas de *Cryptosporidium*, algumas vezes, todas as amostras pontuais observadas registram zero oocistos (Craun et al., 1998).

O monitoramento pode super ou subestimar a concentração destes organismos presentes numa amostra qualquer de água. Em sendo uma amostra positiva, não significa que aquela água não é segura. O contrário também é verdadeiro: em sendo negativa, não significa que aquela água é segura para o consumo humano (Clancy, 2000).

A detecção de um surto de *Cryptosporidium* é difícil e muitos, provavelmente, passam sem serem detectados, devido ao fato de os métodos normalmente utilizados terem pouca sensibilidade e as análises não serem realizadas em tempo hábil. Não existem medidas determinadas que possam comprovar que está, ou não, ocorrendo uma epidemia, mesmo quando o prognóstico é feito em tempo hábil para uma intervenção. Como foi visto no surto de Milwaukee, a detecção pode ser demorada, com poucas evidências laboratoriais sobre o evento, apesar do enorme número de indivíduos que está sendo infectado (Hellard et al., 2000).

A infecção causada por espécies de *Cryptosporidium* é ubíqua e tem sido reportada em mais de 40 países, nos seis continentes (Kosek et al., 2001).

Nos EUA, o primeiro surto de criptosporidiose descrito ocorreu em 1987, como resultado de contaminação de um poço artesiano com esgoto (Rose, 1990). Em 1993, um episódio de infecção por *Cryptosporidium parvum* atingiu mais de 400.000 pessoas, 4.000 foram



hospitalizadas e 104 morreram na cidade de Milwaukee, EUA. Provavelmente, a contaminação tenha sido devido à água de piscinas e parques aquáticos, aos quais têm sido associados estes episódios de alta intensidade (Genera Technologies, 2000). Em dois surtos de criptosporidiose nos EUA (Milwaukee e Las Vegas), a taxa de mortalidade variou entre 52 a 68% em pessoas imunocomprometidas (Rose, 1997). Durante o episódio de Milwaukee, McDonald et al. (2001) realizaram testes sorológicos (o plasma testado para antígenos de *C. parvum*) em amostras de sangue coletadas de crianças residentes neste local. Os resultados dos testes levaram à conclusão de que o *C. parvum* foi a principal causa do surto de diarreia naquela cidade.

Também em fontes de águas recreacionais *Cryptosporidium* e *Giardia* são reconhecidos como a causa mais comum de surtos (Slifko et al., 2000). Mais de 56% dos 75 episódios de criptosporidiose entre 1984 e 1999 foram associados à água potável, enquanto 44% foram relacionados ao uso de águas recreacionais, incluindo piscinas, rios e lagos (Fayer et al., 2000 *apud* Quintero-Betancourt et al., 2002). Em piscinas num subúrbio de Melbourne, Austrália, durante os meses de setembro de 1997 e fevereiro de 1999, foram detectados 11 casos em sete famílias (Hellard et al., 2000).

A observação mais recente sobre surtos de doenças de veiculação hídrica nos Estados Unidos, feita pelo "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC-Atlanta, Georgia, EUA), cobriu o período de 1997-1998 e listou 49 eventos. Estima-se que 4.211 indivíduos ficaram doentes durante estas ocorrências e cinco morreram. Dezesete episódios foram causados por água potável, enquanto 32 foram causados por exposição a águas de recreação. A maioria dos 137.442 casos reportados nos EUA, durante o período de 1992-1997, não foi agrupada em surtos, mas ocorreram esporadicamente. Registros de giardiase foram concentrados no verão, diminuindo nas demais estações, sugerindo que a água recreacional é um fator de risco.

Na Inglaterra e País de Gales, desde 1990, uma média de 4.637 casos de criptosporidiose por ano tem sido noticiada pelo CDSC (Communicable Disease Surveillance Center, 2000).

No Brasil, a ocorrência mais recente desta infecção, foi constatada em outubro de 2001 na cidade de S. Jorge, RS (Comunicação pessoal Eng. Ricardo Furtado).

A água contaminada é uma importante fonte de infecção humana, tanto pelo consumo direto, como no preparo de alimentos. O *Cryptosporidium* também já foi encontrado em alimentos como salmão, salada de frutas, vegetais crus, alface, alho, tomate, leite cru e cidra de maçã (Slifko et al., 2000).

A *G. lamblia*, por sua vez, é um parasita cosmopolita de região temperada e tropical, sendo considerado o protozoário patogênico mais predominante. Sua prevalência é de 2-5%, em países industrializados e 20-30%, nos países em desenvolvimento. Na Gâmbia, por exemplo, é de 12% em crianças saudáveis e 45% em crianças com diarreia crônica. Nos Estados Unidos é, em geral de 5%. Na Rússia, varia de 30 a 40% (para os viajantes que passam em São Petersburgo). No Brasil, a média é de 28,5%, podendo variar de 11,35% no Estado do Rio de Janeiro a 51,8% no Estado do Rio Grande do Sul (Sogayar, 2001).

Entre 1946 e 1980 foram noticiadas, nos EUA, 672 epidemias de doenças de veiculação hídrica que afetaram mais de 150.000 pessoas. Em 52,1% dos casos se determinou a etiologia: bactérias (21,7%), vírus (11,8%), produtos químicos (7,3%) e protozoários parasitas (7,1%). A *Giardia lamblia* foi o agente causal de 42 surtos com 19.813 casos. No Canadá, Inglaterra e Suécia também foram citados casos de giardíase hídrica. Também na Argentina, este parasito intestinal é o de maior prevalência, segundo dados apresentados nas Jornadas Nacionales de Enteroparasitosis de 1987, 1988 e 1989 (Feldman et al., 1992).

O primeiro surto de giardíase transmitido por via hídrica reconhecido ocorreu em 1965, nos EUA, e até 1988 outros 106 foram noticiados (Rose et al., 1991).

Indivíduos que se engajam em atividades como trilhas ecológicas e camping nos EUA, estão mais sujeitos a se contaminar com *Giardia*. Tem-se assumido que o risco é associado a fezes de animais como racúns (mamífero carnívoro noturno, arborícola, relacionado ao urso, porém muito menor, que vive na América do Norte Setentrional) (Michaelis, 1998) e cervos, que infectam humanos quando defecam na água e esta é consumida sem tratamento (Harwood, 2001).

Segundo Furtado (2002), das doenças de veiculação hídrica apenas Cólera, Febre Tifóide e Hepatite são enfermidades de notificação obrigatória e apenas alguns hospitais com alas

especiais para portadores de HIV mantêm este tipo de registro. Desta forma, é difícil constatar a real situação destas doenças no Estado do Rio Grande do Sul ou no país. A tabela 3.3 traz um resumo de registros de surtos de *Cryptosporidium* e *Giardia* encontrados na literatura.

Tabela 3.3. Registros de ocorrências de surtos de Criptosporidiose e Giardiase em vários países.

Referência	Local	Patógeno	Fonte	Ocorrências
Akim & Jakubowski (1986)	Colorado	G	AB	123 casos
Rose (1990)	Inglaterra	C	AB	16 casos (1983)
Rose (1990)	Inglaterra	C	AB	50 casos (1985)
Rose (1990)	EUA	C	AB	2.006 casos (1984)
Rose (1990)	EUA	C	AB	13.000 casos (1987)
Rose (1990)	Escócia	C	AB	27 casos (1988)
Rose (1990)	Swendon/Oxford	C	AB	5.000 casos (1989)
Richardson et al. (1991)	Inglaterra	C	AT	19 surtos
Rose et al. (1991)	EUA	C	AR/AT	106 casos (entre 1965-1988)
Kramer et al. (1996)	Indiana	G	AR	80 casos em piscina (em 1994)
Kramer et al.(1996)	Maryland	G	AR	12 casos em lago (em 1993)
Kramer et al.(1996)	Missouri	C	AR	101 casos em piscina (em 1994)
Kramer et al.(1996)	New Jersey	G	AR	43 casos em lago (em 1993)
Kramer et al.(1996)	New Jersey	C	AR	418 casos em lago (1994)
Kramer et al.(1996)	Washington	G	AR	6 casos em rio (1993)
Kramer et al.(1996)	Wiscosin	C	AR	174 casos em piscinas (em 1993)
Outbreak (2000)	Florida	C	AR	170 surtos, s/ dados
Barwick et al.(2000)	EUA (97/98)	C	AR	49 eventos; 4211 doentes, 5 mortes
Hellard et al.(2000)	Austrália	C	AR	11 casos em 07 famílias
Cartwright & Colbourne (2001)	Mediterrâneo	C	AR	172 turistas britânicos afetados
Hachich et al.(2000)	EUA,Ingl.,Canadá, Japão, Austrália e N. Zelândia	C	AR	69 casos (1983/1999)
Kramer et al.(1996)	Minesota	C	AT	27 casos em lagos (em 1993)
Kramer et al.(1996)	Nevada	C	AT	103 casos em lagos (em 1993)
Kramer et al.(1996)	Pensilvânia	G	AT	20 casos em água subterrânea (em 1993)
Kramer et al.(1996)	South dakota	G	AT	7 casos em água subterrânea (em 1993)
Kramer et al.(1996)	Tennessee	G	AT	304 casos em reservatório (em 1994)
Kramer et al.(1996)	New Hampshire	G	AT	18 em reservat./36 em lagos (em 1994)
Kramer et al.(1996)	Washington	C	AT	7 casos em água subterrânea (em 1993)
Kramer et al.(1996)	Washington	C	AT	134 casos em água subterrânea (em 1994)
Kramer et al.(1996)	Wiscosin	C	AT	403000 casos em lagos (em 1993)
Craun et al.(1998)	EUA	C	AT	19 surtos
Newman et al.(1999)	Brasil (NE)	C	AT	1.476 episódios de diarreia (crianças)
Slifko et al (2000)	USA	C	AR	09 casos (1997/98)
Kramer et al.( 2001)	Inglaterra	CG	AR/AT	13 surtos de C e 1 de G (1986/96)
Kramer et al.( 2001)	Malta	G	AR/AT	1 surto de 1986/96
Kramer et al.( 2001)	Eslovênia	G	AR/AT	2 surtos de 1986/96
Kramer et al.( 2001)	Espanha	CG	AR/AT	1 surto de C e 7 de G (1986/96)
Kramer et al.( 2001)	Suécia	CG	AR/AT	1 surto de C e 4 de G (1986/96)
Rose & Huffman (2002)	Inglaterra	C	-	5.794 casos em 2000 e 3681 em 2001

C – *Cryptosporidium*; G – *Giardia*, AR- água recreacional; AT- água tratada; AB – água bruta

## Doses efetivas

Não é conhecido o risco associado à saúde com água potável contaminada com baixas concentrações de oocistos de *C. parvum*. Os métodos correntes de laboratório não conseguem determinar quais dessas estruturas biológicas são viáveis ou capazes de infectar humanos. As pesquisas não têm conseguido determinar se o número de oocistos, geralmente presentes em água potável, é suficiente para causar a doença; se pessoas imunocomprometidas são mais suscetíveis a baixas doses de oocistos do que pessoas imunocompetentes ou se cepas de *Cryptosporidium* variam em suas doses infectivas e capacidade de causar a doença (Juraneck et al., 1995).

Concentrações entre 10-30 (oo)cistos/100L de água tratada podem ser suficientes para desencadear epidemias, embora abaixo do mínimo epidemias possam ocorrer sem contudo serem notadas (Akim, 1983; Rose, 1990; Haas & Rose, 1995).

Pontius (1998) realizou uma pesquisa infectando 29 humanos voluntários com doses que variaram de 30 a 1 milhão de oocistos de *C. parvum* obtidos de gado. Dos 16 voluntários que receberam 300 oocistos ou mais, 88% tornaram-se infectados. De cinco voluntários que receberam baixas doses (30 oocistos), apenas um apresentou infecção. A dose média infectiva foi de 132 oocistos. Segundo Fairley et al. (1999) a dose infectiva varia muito entre os isolados deste gênero, podendo ir de menos de 10 a mais de 1500 oocistos.

Segundo Slifko et al. 2000, a *Giardia* e o *Cryptosporidium* tornaram-se significantes patógenos transmitidos pela água por três razões: 1) giardiase e criptosporidiose são infecções nativas em muitos animais; 2) as densidades das contaminações com cistos e oocistos infectivos são suficientes para poluir o ambiente aquático; 3) estas estruturas biológicas que penetram nos processos de tratamento de água, como já dito antes, são insensíveis aos desinfetantes nas quantidades comumente utilizadas no tratamento da água. Dillingham et al. (2002) reforçam estas observações levando em consideração os seguintes aspectos (tabela 3.4):

Tabela 3.4 Características de *Cryptosporidium* sp e sua significância epidemiológica.

Característica	Significância Epidemiológica
Extremamente pequeno	Difícil de filtrar; representa perigo para água utilizada pelas indústrias
Baixa dose infectiva	Provoca facilmente altas taxas de infecção (Milwaukee e outros surtos)
Causa infecções quando expelidos	Pessoa a pessoa (hospitais, prisões, creches, etc.)
Potencial zoonótico	Contatos com animais (estudantes de veterinária)

Fonte: Dillingham et al. (2002)

### 3.3 Barreiras físicas e químicas contra *Cryptosporidium* e *Giardia*

Por muitos anos, a adição de cloro à água potável parecia ser o tratamento suficiente para a inativação de organismos patogênicos. Contudo, o cloro pode reagir com a matéria orgânica na água e formar subprodutos clorados (ex. trihalometanos - THMs). Além disso, após inúmeras pesquisas realizadas, sabe-se que patógenos emergentes, como *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp são resistentes ao tratamento com este desinfetante, nas doses comumente utilizadas. A tabela 3.5 mostra que o cloro não é um biocida efetivo contra *Cryptosporidium* e *Giardia*, quando comparado a oxidantes alternativos como o ozônio (O<sub>3</sub>) e dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) (American Water Works Association, 1991 *apud* Gordon & Bubnis, 2000).

Tabela 3.5 Valores de K para a inativação de diversos microrganismos [K= C x T; onde: C = concentração do desinfetante (mg/L); T = tempo de contato (min)].

Organismo	Temperatura (°C)	Inativação (%)	Valores de K			
			Cloro Ativo (pH 6-7)	Cloraminas (pH 8-9)	Ozônio	Dióxido de cloro
<i>E. coli</i>	5	99	0,03-0,05	95 – 180	0,02	0,4-0,8
Rotavírus	5	99	0,01-0,05	3,806-6,476	0,01-0,06	0,2-2
Cistos <i>G. lamblia</i>	25	99,99	47-150	-	0,5 - 0,6	26
Cistos <i>G. muris</i>	5	99	30-630	2.200	-	-
Oocistos <i>C. parvum</i>	25	99	1.400	7.200	5-10	78

Fonte: Gordon & Bubnis (2000); Bastos et al. (2001)

O *Cryptosporidium* pode resistir até 18 horas em soluções de 1 a 3% de cloro livre (Estados Unidos, 1999). Os cistos de *Giardia* conservam sua viabilidade em água a 8°C por mais de dois meses, a 21°C até um mês e a 37°C cerca de quatro dias. Oocistos de *Cryptosporidium* podem permanecer viáveis por vários meses em água entre 4 e 10°C (Medema et al., 1997 *apud* Hsu et al., 1999). Percebe-se, então, que a temperatura não é um fator tão crítico entre a coleta e acondicionamento das amostras a serem avaliadas, caso não se tenha pretensão de avaliar a viabilidade dos microrganismos, principalmente a *Giardia* que é mais resistente.

De acordo com Weber & Rutala (2001), além de ser relativamente resistente ao cloro, nas concentrações em que este é utilizado em água potável, o *C. parvum* não é completamente inativado pela maioria dos desinfetantes usados no cuidado com a saúde, quais sejam: álcool etílico, hipoclorito a 5,25%, ácido peracético, ortoftaldeído e componentes da amônia quaternária, além de glutaraldeído, fenol e iodo-povidona. Segundo Barbee et al. (1999) *apud* Weber & Rutala (2001), o único desinfetante químico capaz de inativar mais que 3 log de *C. parvum* é o peróxido de hidrogênio (6 a 7,5%) e os métodos de esterilização que podem inativar totalmente o microrganismo incluem vapor, óxido de etileno e Sterrad 100 ®.

Embora o *Cryptosporidium* seja mais resistente ao ozônio que a *Giardia*, dados publicados sugerem que este desinfetante é um dos mais efetivos para controlar este microrganismo (Finch et al., 1994 *apud* States et al., 2000; Facile et al., 2000 *apud* Lane & Lloyd, 2002).

Em função do aumento do grau de exigência na regulamentação da água potável nos EUA, os procedimentos com membrana estão sendo cada vez mais utilizados. São empregados para remover um amplo número de contaminantes e, dependendo do seu uso, podem ser operados com a mínima adição ou mesmo sem pré-tratamento químico. As membranas são utilizadas, principalmente, para dessalinização, desinfecção, clarificação e remoção de químicos sintéticos e inorgânicos, na purificação de águas servidas para reuso. Embora meios tradicionais de processos de filtração possam remover entre 1,5 e 4,5 logs de cistos e oocistos, a remoção não é absoluta (Jacangelo et al., 1997).

Membrana de filtração à baixa pressão, particularmente microfiltração (tamanho do poro aproximadamente de 0,1 a 1 µm) e ultrafiltração (tamanho do poro aproximadamente de

0,005 a 0,1  $\mu\text{m}$ ), têm recebido grande atenção nos anos mais recentes, como uma alternativa ao tratamento convencional (Jacangelo et al., 1995). Ribeiro e De Luca (1998) comentam que somente a osmose inversa e a nanofiltração podem remover cistos e oocistos.

Em geral, os sistemas de filtração com membrana também oferecem uma série de vantagens e desvantagens. O fator positivo é que não produzem subprodutos e, geralmente, são designados para serem monitorados e operados remotamente. A passagem de água através dos finos poros da membrana requer um significativo diferencial de pressão, o que normalmente se consegue através de uma bomba. Adicionalmente, os elementos do filtro membrana devem ser substituídos em intervalos de 5 ou 7 anos, dependendo da qualidade da água que vem sendo tratada e dos parâmetros operacionais (States et al., 2000).

A adoção de membranas de filtração como tratamento para abastecimento público de água potável está sendo considerado o mais eficiente, especialmente em sistemas federais e estaduais de água potável, devido às restrições dos padrões de potabilidade.

### 3.4 Métodos de Detecção

As doses de infecção (número de unidades infectantes necessárias para causar a infecção) variam entre os patógenos microbianos, para a maioria dos protozoários e vírus entéricos. Usualmente apenas dez ou menos partículas infecciosas são suficientes. As bactérias, normalmente não causam infecção, se estão em número menor que  $10^3$  células (Estados Unidos, 1992). Nas últimas décadas, protozoários e vírus têm substituído patógenos bacterianos como agentes primários causadores de doenças de veiculação hídrica (Gale & Stanfield, 2000). Entre estes protozoários, como já citado anteriormente, o *Cryptosporidium* sp e a *Giardia* sp têm se tornado notórios. A transmissão de *C. parvum* é uma das mais proeminentes preocupações da saúde pública no mundo. A doença tem sido encontrada em todos os continentes e a associação com transmissão hídrica tem sido mostrada ou sugerida (Rose et al., 2002).

Portanto, a determinação do número de diferentes patógenos em amostras de água ou esgoto é de extrema importância. Igualmente, a otimização da contagem destes microrganismos em amostras de águas pré e pós-tratadas, pode permitir uma eficiente determinação das medidas a serem tomadas no processo de tratamento. Inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de se chegar a um ou mais métodos padrões para a detecção destes microrganismos.

O monitoramento destes parasitas pode ser realizado por muitos métodos, porém nenhum deles é tido, ainda, como padrão internacional. A imunofluorescência tende a ser um destes padrões podendo ser aplicado em águas brutas e tratadas e, ultimamente, testes com PCR encontram-se em intensa fase de pesquisa. As metodologias de coloração tradicionalmente utilizadas para exames parasitológicos, basicamente, os derivados de Ziehl-Neelsen para *Cryptosporidium* e colorações temporárias para *Giardia*, também são aplicados.

Os métodos que têm sido aprovados constituem-se de três passos chave: concentração, purificação e detecção. A concentração, normalmente, é feita através da filtração seguida da eluição do meio suporte e centrifugação do eluído. A purificação é o passo seguinte, podendo ser feito por "percoll-sucrose", flotação, coagulação, decantação e pela tecnologia mais aplicada ultimamente, que é a separação imunomagnética (SIM). Depois de purificado, o material é então quantificado, podendo-se utilizar metodologias de coloração tradicionalmente utilizadas para exames parasitológicos ajustadas ao exame de amostras ambientais ou a mais utilizada no momento: a imunofluorescência.

Em todos os métodos até hoje desenvolvidos, as etapas são extremamente críticas, desde a coleta em campo até à avaliação microscópica. Muitos tipos de membranas são utilizados, velocidades de centrifugação diferentes são aplicadas, entre tantas outras modificações que são propostas. Um dos exemplos de alterações verificados por Vesey & Slade (1991) é que sucessivas centrifugações podem danificar os epitopos dos oocistos, onde os anticorpos se fixam.

O método de detecção ideal deveria possuir, entre outras, as seguintes propriedades: rapidez, sensibilidade, exatidão, praticidade e reprodutibilidade a baixo custo (Toze, 1999). No que diz respeito às metodologias atualmente utilizadas, estas exigências estão longe de serem atendidas, pois ainda não há métodos padrões e aqueles ora conhecidos, têm severas limitações.



### 3.4.1 Concentração

Devido à limitada sensibilidade, a maioria das técnicas de enumeração disponíveis para *Cryptosporidium* e *Giardia* exigem, freqüentemente, pré-concentração das amostras de água (Kfir et al., 1995a) e esta etapa geralmente é feita utilizando-se a filtração, seja com cartucho ou membrana. Todavia, outras metodologias como centrifugação de fluxo contínuo, filtração em colunas de areia e alguns filtros alternativos, também são utilizados.

#### 3.4.1.1 Concentração através da filtração com cartuchos e/ou membranas

Perdas significativas podem ocorrer durante os processos de filtração. Para verificar isto, Vesey & Slade (1991) avaliaram um processo de filtração com cartucho (1  $\mu\text{m}$ ), filtrando 50 a 1000 L de água (inoculada com oocistos) a uma taxa de 1,5L/min. Para averiguar se algum oocisto escapava da membrana do cartucho, o filtrado foi passado através de uma outra membrana (142 mm de diâmetro e 0,2  $\mu\text{m}$ , de porosidade). Examinando o segundo eluído, descobriram que 5 a 30% dos oocistos haviam passado através do filtro do cartucho. Desmanchada a membrana e avaliadas as fibras, detectaram que de 1 a 30% dos oocistos ali permaneciam, extremamente danificados.

Whitmore & Carrington (1993) testaram um cartucho com filtro pregueado (5  $\mu\text{m}$ ) e dois de fibra de vidro purificados a quente (3 e 1  $\mu\text{m}$ ). Os testes foram realizados com amostras de 100L de água inoculadas com  $1 \times 10^7$  oocistos. Os filtros foram eluídos com uma solução de Tween 80 a 0,1%. A suspensão resultante foi centrifugada e o "pellet" purificado usando "percoll sucrose" ou flotação. A detecção foi feita utilizando microscopia de epifluorescência. A recuperação foi menor que 10%, para todos os tipos de filtro.

Os mesmos pesquisadores, citados no parágrafo anterior, testaram cartuchos de microfibras de vidro borossilicato (0,9; 2,0; e 8,0  $\mu\text{m}$ ), sendo que amostras de 10L de água inoculadas com  $1 \times 10^7$  oocistos foram utilizadas para os testes. Os filtros foram cortados longitudinalmente, as tiras colocadas em Tween 80 a 0,1% e agitadas vigorosamente num agitador

automático. Após eluição, o material foi centrifugado e o "pellet" resultante foi ressuspenso em PBS e examinado com microscopia de epifluorescência e contraste diferencial de fase. Com o uso deste procedimento, partículas do filtro ficaram no "pellet", impedindo a observação de prováveis oocistos presentes. Para tentar melhorar o processo, em experimentos subseqüentes, o eluído foi submetido à flotação e passagem em pré-filtro. Como nenhum dos dois procedimentos melhorou o processo de separação dos oocistos das partículas dos filtros, optou-se por eluir o cartucho enchendo-o com 2L de Tween 80 a 0,1% e agitando-o, enquanto as fibras permaneciam intactas. Desta forma, o eluído ficou bem mais claro e foi possível alcançar uma recuperação de 33%. Segundo os pesquisadores, o cartucho de 2,0 µm foi o mais efetivo.

Ainda em outros experimentos, utilizando os mesmos tipos de filtro citado no item anterior, foram utilizados 3L de eluente e foram coletadas, subseqüentemente, e processadas separadamente, 3 frações de 1L. A recuperação de cada fração foi de 31%, 4,7% e 3,5%, respectivamente. Pode-se verificar uma grande variação da primeira fração em relação às duas últimas.

Coffey et al. (1993) e Jacangelo et al. (1991) *apud* Jacangelo et al. (1995), utilizaram microfiltração e ultrafiltração e obtiveram mais de 4 logs de remoção de *Giardia*. Nestes estudos, o nível de remoção foi função da concentração do organismo nas águas avaliadas. LeChevalier & Norton (1992) afirmam que estudos indicam que a probabilidade de detenção de (oo)cistos em água tratada depende do número de organismos na água bruta.

Kfir et al. (1995a) realizaram um estudo de comparação entre técnicas de concentração utilizadas para detecção viral e outras, normalmente, utilizadas para detecção de protozoários, conforme descrito a seguir:

- 1) Membrana: amostras de 10 L de água de torneira (inoculadas com 10-30 cistos) foram passadas num suporte Sartorius contendo membrana (Milipore, diâmetro 142 mm, poro 1,2 µm). Após a filtração, a membrana foi sonicada por 10 min para soltar as partículas aderidas. A suspensão resultante foi concentrada por centrifugação (2.100 rpm durante 6 min) e o "pellet" utilizado para investigar a percentagem de recuperação de cistos.

2) Ultrafiltração: as amostras de água inoculadas foram passadas através de um ultrafiltro Amicon XM50 (poro 46-50Å, - com peso molecular de 50.000 daltons); o filtro foi eluído e a suspensão resultante concentrada por centrifugação (2000 rpm durante 1 min), sendo o "pellet" utilizado para investigar a percentagem de recuperação de cistos e o sobrenadante para a observação de vírus.

3) Cartucho com filtro - Filterite DFN 0,45-10µm: as amostras inoculadas foram passadas através do cartucho, juntamente com uma solução de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>), tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e ácido clorídrico (HCl). Depois de feita uma retro-lavagem usando eluente com glicina, o eluído foi passado através do filtro Amicon XM50, o filtrado concentrado por centrifugação (2000 rpm durante 1 min), o "pellet" utilizado para investigar a recuperação de cistos e o sobrenadante para a observação de vírus.

4) Cartucho com filtro AMF Cuno Wynd (DPPPY 1): as amostras inoculadas foram passadas através do cartucho e após a filtração o filtro foi cortado, colocado numa máquina de rotação manual, lavado com Tween 80 e sódio dodecil sulfato. A suspensão resultante foi concentrada por centrifugação (2400 rpm/10 min) e o "pellet" utilizado para investigar a recuperação de cistos.

Tabela 3.6. - Recuperação de cistos de *Giardia* sp utilizando vários métodos de concentração.

Método de concentração	% de recuperação			
	Membrana	Ultrafiltração	Cuno Wynd	DFN
Média	11,1	11,6	12,2	13,4
Mínimo	4,5	2,7	1,6	5,0
Máximo	23,0	25,5	46,0	24,2
Volume da amostra	10L	10L	100L	100L

Fonte: Kfir et al. (1995a).

Os resultados obtidos utilizando membrana (Milipore, diâmetro 142 mm, poro 1,2 µm) (4,5-23%) foram semelhantes aos da ultrafiltração (2,7 – 25,5%) (Tabela 3.6). A comparação desses métodos de isolamento de cistos e oocistos de amostras de águas ambientais também indicou uma eficácia similar. Por sua vez, o cartucho de filtro Cuno Wynd (1,6-46%) apresentou uma maior variação dos resultados quando comparado ao cartucho com filtro DFN (5-24,2%),

embora a média de recuperação tenha sido semelhante para ambos (Tabela 3.6). Observa-se, também, que ocorreu uma grande variação na percentagem de recuperação para todos os métodos. Os autores afirmaram que, diante dos resultados, as técnicas utilizadas para o isolamento de vírus entéricos também podem ser aplicadas para a detecção de protozoários e sugerem uma utilização destes procedimentos numa co-análise para vírus e protozoários, provendo mais rápida e menos dispendiosa avaliação da qualidade da água.

Diferentes tipos de membranas também foram avaliados por Jacangelo et al. (1995), para concentração de protozoários. Em escala de bancada e/ou escala piloto, foram avaliadas seis membranas comercialmente disponíveis, três de microfiltração (A - 0,2 µm em polipropileno; B - 0,2 µm derivada de polisulfona; C - 0,1 µm em politeflon) e três de ultrafiltração (D - 500.000 daltons em polisulfona; E - 300.000 daltons em cerâmica; F - 100.000 daltons em éster de celulose). Três microrganismos foram utilizados nos testes: *Cryptosporidium*, *Giardia muris* e o bacteriófago MS2. A densidade inicial de cistos e oocistos era de  $10^4 - 10^5$  unidades/L. Todas as membranas, exceto a membrana C, (que apresentou um defeito entre o anel de selagem e os canais permeáveis), removeram os cistos e oocistos abaixo dos limites de detecção (1 cisto/L). Segundo os autores, os resultados mostraram que ambas, a microfiltração e ultrafiltração, atuam como barreira absoluta para cistos de protozoários, desde que as membranas estejam intactas. Por isso a importância do monitoramento dos sistemas, pois qualquer falha pode comprometer o seu funcionamento e, conseqüentemente, permitir a passagem de microrganismos.

Outro tipo de membrana (SM 16275, Sartorius AG, Göttingen) foi avaliado por Falk et al. (1998). Os pesquisadores inocularam volumes iguais de água destilada e filtraram. Os (oo)cistos recuperados foram contados e identificados usando microscopia de contraste de fase. Conseguiram uma média de 78,7% de recuperação para cistos de *Giardia* e 42,1% de oocistos de *Cryptosporidium*. O estudo demonstrou que o sistema de filtração por membrana é um dos métodos mais eficientes e baratos para a concentração de *Giardia* em água. A baixa eficiência na recuperação de oocistos, em relação àquela conseguida com os cistos, pode ser explicada, segundo os autores, devido ao pequeno tamanho destas estruturas biológicas e aos efeitos da captura no material do filtro, pois existem diferenças nas aderências de *Giardia* e *Cryptosporidium* à superfície da membrana.

### 3.4.1.2 Concentração através da centrifugação de fluxo contínuo (CF)

Whitmore & Carrington (1993) testaram a centrifugação de fluxo contínuo, avaliando duas centrífugas: um modelo de escala de bancada (Alfa-Laval Sharples Gyrotester – com capacidade para 9.600g) e uma maior (que se apoia no piso - Alfa-Laval Sharples AS 16 – com capacidade para 13.200 g). A velocidade rotacional de ambas as centrífugas era fixa e a eficiência de retenção das máquinas é influenciada pela taxa de fluxo através das “tigelas” das centrífugas. Amostras de 10L ou 100L de água de torneira e rio foram inoculadas com, aproximadamente,  $4 \times 10^7$  oocistos e submetidas à centrifugação. Os "pellets" resultantes foram removidos com Tween 80 a 0,1% e passados para tubos menores de centrífuga, onde foram submetidos a uma nova centrifugação (1500 rpm/10min). Os novos "pellets" foram ressuspensos em PBS e avaliados por imunofluorescência. Quando havia partículas em excesso, era realizada purificação com flotação antes de proceder à imunofluorescência. Os pesquisadores verificaram que a centrífuga menor obteve melhor recuperação em ambos os tipos de água, a uma vazão de aproximadamente 0,3 L/min. A eficiência de recuperação correspondente foi de aproximadamente 30% para água limpa e 11% para água de rio. A centrífuga grande apresentou baixos índices de recuperação.

Swales & Wright (2000) também utilizaram a centrifugação de fluxo contínuo e compararam com filtração em cartucho, em amostras de 100 L de água com valores de turbidez de 1-5 UNT inoculadas com 10 oocistos/L. Obtiveram uma média de recuperação de 14,8 e 13% para as amostras com 1 e 5 UNT, respectivamente, comparados a 9,7 e 9,0% para o cartucho de filtração. Os autores afirmam que a CF pode alcançar iguais ou melhores índices de recuperação que o cartucho padrão utilizado, com substancial redução de tempo. Porém, o equipamento não é aplicável em campo.

### 3.4.1.3 Concentração através da filtração em coluna de areia

Whitmore & Carrington (1993) construíram colunas de areia em escala de bancada e bombearam através destas amostras de água, inoculadas com aproximadamente,  $4 \times 10^7$  oocistos. A areia foi removida, eluída por agitação vigorosa em PBS com Tween 80 a 0,1% e deixada para

sedimentar. O sobrenadante foi centrifugado (1500 rpm/20min) e o "pellet" dispersado em sódio dodecil sulfato/Tween 80 a 0,1%. Os oocistos foram purificados por flotação e enumerados usando contraste de fase. Verificou-se, que a baixas velocidades (< 0,5m/h), o filtro de areia para retenção de oocistos foi altamente eficiente. Porém, a altas velocidades, esta eficiência decaiu bruscamente (Tabela 3.7).

Tabela 3.7. – Recuperação de oocistos em sistemas de colunas de areia a diferentes taxas de fluxo.

Fluxo m <sup>3</sup> /h	% de recuperação de oocistos
0,1	98,4
0,4	97,3
1,0	43,2
6,3	19,6
19,8	2,3

Fonte: Whitmore & Carrington (1993)

#### 3.4.1.4 Filtros alternativos

Hsu et al. (2001a) realizaram testes de filtração em escala de laboratório usando dois tipos de filtro - com pérolas de vidro e poliestireno medindo 2 mm de diâmetro - para avaliar a eficiência de remoção de cistos e oocistos, através da colisão entre estas partículas e as pérolas. Os protozoários foram utilizados como partículas alvo, enquanto o sistema químico foi alterado por mudança de concentração eletrolítica e pH. Os resultados indicaram que a força iônica tem um efeito positivo na eficiência da remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. Contudo, esta eficiência é inversamente proporcional ao aumento de pH, reduzindo significativamente em valores de pH acima de 8,7. Fato que corrobora com as afirmações de Fogel et al. (1993) e Shaw et al. (2000), que dizem que oocistos de *Cryptosporidium* apresentam carga elétrica (potencial zeta) negativa na superfície. Sendo assim, a remoção de oocistos por filtração, sem um condicionamento químico, torna-se difícil devido à repulsão eletrostática entre os oocistos e a superfície do filtro. Estes últimos autores verificaram que camadas eletropositivas de filtro de areia aumentam a remoção de oocistos de *Cryptosporidium* (de 72 para 95%). Camadas

de hidróxidos, peróxidos e óxidos sobre o filtro melhoram a remoção de bactérias e vírus e reduzem a turbidez em águas e esgotos (Farrah et al., 1991 e Ahammed, 1996 *apud* Shaw, 2000).

### 3.4.2 Purificação

Esta etapa também demanda muitos cuidados no seu desenvolvimento. Um fato importante é que os anticorpos monoclonais aplicados precisam ser altamente específicos, pois podem reagir com outras partículas, que não *Cryptosporidium* e *Giardia*, presentes nas amostras ambientais (Ferrari et al., 1999). Todos os métodos microscópicos baseados em anticorpos monoclonais não fornecem informações a respeito da viabilidade ou infectividade dos (oo)cistos, além de não indicarem a espécie hospedeira que originou os microrganismos. São ainda conhecidos pela interferência (falsos-positivos) de algas ou outras espécies de protozoários, requerem laboratoristas bastante experientes, são muito caros, têm baixa ou errática recuperação e pobre precisão (Jakubowski et al., 1996).

McCuin et al. (2001) avaliaram uma das metodologias que utilizam a separação imunomagnética (técnica utilizada para purificação), para a recuperação de cistos e oocistos (kit GC-Combo IMS). Concentraram matrizes de águas brutas de rios de três Estados diferentes dos EUA (Califórnia, Pensilvânia e Nebraska). Fizeram ajustes nos concentrados, de tal forma que obtiveram matrizes com três níveis de turbidez: 5.000, 500 e 50 UNT. Em cada um foram inoculados aproximadamente 100 (oo)cistos/10 mL. Como grupo controle foi usada água deionizada. A percentagem média de recuperação obtida consta na tabela 3.8.

Tabela 3.8 Percentagem de recuperação de (oo)cistos com metodologias que utilizam separação imunomagnética.

	<b>Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> (%)</b>	<b>Cistos de <i>Giardia</i> (%)</b>
H <sub>2</sub> O deionizada	62	69
Matrizes	55,9 - 83,1	61,1 - 89,6

Fonte: McCuin et al. (2001).

Diante destes resultados, os autores inferiram que o kit GC-Combo IMS é uma eficiente técnica para separar *Cryptosporidium* sp/*Giardia* sp de matrizes ambientais de águas turvas.

Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores como Bukhari et al. (1998) e Connell (2001).

Contudo, existem pesquisadores que afirmam haver indícios de que a turbidez do concentrado de água é o fator mais crítico associado à eficiência da aeração, quando o IMS é utilizado (Fricker & Clancy, 1998). Além disso, pode-se verificar no folheto, que acompanha o próprio kit (GC-Combo IMS), a afirmação de que altos índices de turbidez podem afetar significativamente a recuperação. O método 1623 da USEPA afirma que a turbidez, causada por partículas orgânicas e inorgânicas, pode interferir na concentração, separação e exame das amostras para oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*.

Após a separação imunomagnética, que é a etapa chamada de purificação, pois separa os (oo)cistos presentes na amostra por ligação destes com os anticorpos específicos para *Cryptosporidium* e *Giardia*, vem a desagregação dos “beads” (parte magnética acoplada aos anticorpos) que consiste em dissociar os microrganismos capturados dos anticorpos.

Ware et al. (2003) resolveram modificar este passo através da introdução de uma fonte de calor (10 min a 80° C), comparando com o procedimento rotineiro de utilização de ácido. Perceberam que a dissociação a quente aumentou a média de recuperação de 41 para 71% em água reagente inoculada e de 10 para 51% em amostras de água de rio. A média de confirmação do DAPI também aumentou de 49 para 93% e de 48 para 73% nas amostras de água reagente e água de rio, respectivamente. Os autores crêem que este “choque térmico” deve aumentar a permeabilidade da parede dos oocistos, permitindo que uma maior quantidade de corante penetre nas estruturas, facilitando a visualização ao microscópio.

### 3.4.3 Detecção

A detecção é a última etapa do processamento das amostras. Alguns pesquisadores utilizam a coloração diretamente sobre as membranas ou a dissolução destas. Há ainda os métodos mais recentes que utilizam corantes para imunofluorescência, ICR e PCR.



Visando detectar *Cryptosporidium* e *Giardia*, em águas marinhas, Johnson et al. (1995) fizeram avaliações de amostras deste tipo de água no Havá (nas áreas de Honolulu), utilizando dois métodos de filtração. As amostras foram passadas através de um cartucho de filtro de polipropileno (1  $\mu\text{m}$ ), o qual foi eluído e a suspensão resultante concentrada por centrifugação. O "pellet" resultante foi colocado em membranas de policarbonato (de 1,2  $\mu\text{m}$ ) e corado com anticorpos primários, por 30 min. A membrana foi enxaguada com solução tampão salina, corada com anticorpos secundários, por 30 min, novamente, enxaguada e colocada sobre uma lâmina com glycerol-DABCO. A análise foi feita com o auxílio de microscopia de epifluorescência. O segundo método consistiu em filtração com filtro microporo, para concentração simultânea de protozoários e vírus. A amostra foi bombeada para um galão, o pH ajustado para 3,5 com HCl 1N tendo sido adicionado cloreto de alumínio. A água foi passada através de um filtro com cargas eletronegativas, sendo que a eluição do filtro e o restante do procedimento eram iguais ao da metodologia anterior. Os pesquisadores praticamente não conseguiram detectar os microrganismos, afirmando que o principal problema para a avaliação de água marinha, deve-se ao fato de que algas captadas com a amostra interferem no reconhecimento dos cistos e oocistos, por conterem pigmentos fluorescentes, tornando a observação mais cansativa e de difícil diferenciação entre as algas e (oo)cistos de *Cryptosporidium* e *Giardia*.

McCuin et al. (2000) testaram a técnica de dissolução de membrana proposta por Aldon & Chagla (1995) e obtiveram 0,4 a 83,9% e 3,2 a 90,3% de oocistos/cistos, respectivamente, mesmo com altas dosagens de inóculo,  $1 \times 10^5$  (oo)cistos. A recuperação com baixas doses de inóculo, 100 (oo)cistos, também demonstrou alta variabilidade. Os autores concluem que esta metodologia fornece índices de recuperação extremamente variáveis e baixos.

Franco et al. (2001) fizeram comparação entre duas metodologias para detecção da ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* no Rio Atibaia (São Paulo-SP): RM (membrana cortada e enxaguada) e ADM (método da dissolução em acetona). As amostras eram filtradas através de membrana (45 mm de diâmetro, 3 $\mu\text{m}$  da Millipore, Brasil) sob pressão negativa, com vazão de 4L/min. Em seguida, estas membranas eram cortadas em duas partes: a primeira era eluída com uma solução de Tween 80 a 0,1% e raspada (RM); a segunda dissolvida em acetona (ADM). O material era centrifugado e alíquotas de 10 $\mu\text{L}$  do "pellet" resultante processadas pelo kit Merifluor (Meridian Diagnostics, Cincinnati, Ohio) para coloração. Observam-se taxas de

recuperação mais altas em amostras tratadas pelo método RM, mas os autores não explicam as razões pelas quais se chegou a estes resultados (valores na tabela 3.9).

Tabela 3.9 - Turbidez e número de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* detectados em águas superficiais do Rio Atibaia por RM (membrana lavada e raspada)/ADM (membrana dissolvida em acetona).

Grupos	<i>Cryptosporidium</i> %		<i>Giardia</i> %		Turbidez (UNT)
	RM	ADM	RM	ADM	
I	60,8	5,0	33,0	7,5	46
II	44,5	7,5	44,5	8,3	32
III	57,0	0	95,0	7,0	48
IV	100,0	72,0	45,0	2,0	-

Fonte: Franco et al. (2001).

Durante os anos 90, a USEPA aprovou um método de detecção e quantificação de *Cryptosporidium* sp em amostras de água como parte de um programa de monitoramento conhecido como "Information Collection Rule". Este método foi chamado "ICR Protozoan Method for Detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Water by a Fluorescent Antibody Procedure" (Estados Unidos, 1996 *apud* Quintero-Betancourt et al., 2002). Este método ainda é usado nos EUA para monitorar protozoários parasitas em águas de superfície, subterrâneas e potáveis, além de efluentes domésticos recuperados (Quintero-Betancourt et al., 2002). Porém, é um método muito caro, complexo e difícil de realizar. Produz resultados altamente variáveis e demonstra respostas diversas dependendo da matriz de água; apresenta baixa eficiência de recuperação para oocistos de *Cryptosporidium* (menos de 3%) podendo subestimar a ocorrência e os níveis deste microrganismo na amostra; não tem ligações específicas com os anticorpos; sofre interferências pelas partículas presentes nas amostras e é incapaz de determinar viabilidade, infectividade e cepas de isolados de *Cryptosporidium* sp (LeChevalier & Norton, 1995; Juranek et al., 1995; Schaefer, 1997 e Dufour et al., 1999 *apud* Quintero-Betancourt, 2002).

Visando atender às futuras exigências legais da Safe Drinking Water Act Amendments, a USEPA começou em 1996, a investigar novas tecnologias para a detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia*. Inicialmente, a agência desenvolveu o método 1622, o qual foi validado através de um

estudo interlaboratorial, realizado em agosto de 1998. No ano seguinte, com algumas modificações, foi desenvolvido o método 1623.

O método 1622 - *Cryptosporidium* sp em água por filtração/IMS/IFA – Estados Unidos (1998) é portanto, precursor do método 1623 - *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em água por filtração/IMS/IFA – Estados Unidos (1999). Ambos consistem nas seguintes etapas: filtração, eluição, concentração, separação imunomagnética e, por fim, aplicação do corante DAPI seguida de avaliação microscópica para contagem de oocistos (1622) ou cistos e oocistos (1623), em amostras de água. Após a filtração da água, a membrana contida na cápsula é eluída, utilizando-se uma solução contendo Laureth-12, EDTA, Tris e antiespumante. A suspensão resultante é concentrada através de centrifugação (1050 g) e purificada por separação imunomagnética (SIM - com a utilização de anticorpos monoclonais) utilizando o kit Dynabeads®GC-Combo (Dynal cat no. 730.02) ou similar. O concentrado é corado empregando-se o DAPI. A observação da lâmina é feita utilizando-se microscopia de fluorescência e contraste de fase.

Foram feitas pesquisas simultâneas para os métodos 1623 e ICR, por Hsu et al. (2001c) para a detecção de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em amostras de água. Para fazer o ICR, após filtrar, eluir e centrifugar, o "pellet" recuperado foi colocado em formalina (a 10%), acrescentado de gradiente "percoll-sucrose" e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado, ao "pellet" foi acrescentada nova quantidade de solução eluente sendo a suspensão agitada e centrifugada. O concentrado resultante foi ressuspensão e aplicado em membrana de acetato-celulose (25 mm de diâmetro), corado com anticorpos marcadores fluorescentes e examinado com microscopia de epifluorescência. Os pesquisadores verificaram que o método 1623 apresentou alta recuperação de cistos e oocistos e baixo limite de detecção, quando comparado ao método ICR. Segundo os autores, estes resultados sugerem que o método 1623 é suscetível a variações na turbidez das amostras e que pelo fato de ter sido encontrada uma significativa correlação entre concentrações de oocistos e turbidez, este parâmetro poderia ser utilizado como indicador da presença de *Cryptosporidium*. Observaram também que, independente do método empregado, a turbidez reduziu a eficiência da recuperação e aumentou o limite de detecção para ambos os parasitas.

Grande parte dos pesquisadores acredita que os métodos 1622/1623 detectam menos falso-positivos que o ICR. É importante ressaltar, porém, que altas concentrações de ferro

dissolvido podem inibir o efeito do IMS-IFA (Quintero-Betancourt et al., 2002). Além disso, coagulantes à base de alumínio e certos polímeros adicionados à água durante o processo de tratamento, também podem interferir (Estados Unidos, 1999).

Os métodos 1622 e 1623 estão longe de serem perfeitos. São caracterizados por baixos índices de recuperação e não informam com precisão a respeito das espécies, viabilidade ou infectividade de *Cryptosporidium* e *Giardia* (Connell, 2001; Fontaine & Guillot, 2003). Este é, na verdade, um dos grandes problemas da maioria dos métodos existentes, pois um organismo inviável não representa risco à saúde pública. Por outro lado, onde há um ou mais inativos, pode haver outros tantos perfeitamente capazes de causar infecção.

De uma forma geral, verifica-se que o principal problema é que as técnicas laboratoriais atualmente existentes para a detecção de parasitas, são extremamente trabalhosas, dispendiosas e apresentam baixa eficiência. Várias pesquisas comprovam este fato. Foi realizada uma proficiência interlaboratorial entre seis laboratórios para detecção e recuperação de (oo)cistos em amostras de águas brutas e de torneira filtrada. A média de recuperação variou de 0 - 67% e 0 - 72%, dependendo do tipo de amostra e do laboratório. A melhor performance foi do laboratório que atingiu de 45% a 66% para água de torneira e 63 a 81% para amostras brutas. Apesar da experiência de todos os laboratórios participantes, alguns alcançaram baixos índices de recuperação e falsos positivos foram detectados (Roser et al., 2001).

Outra metodologia que vem sendo muito estudada é o PCR - técnica baseada na amplificação de seqüências específicas de fitas de DNA. Mas, apesar da aprovação por parte de muitos pesquisadores, trata-se de um método cuja eficácia ainda é muito questionada. Segundo Laxer et al. (1991) e Webster et al. (1993) *apud* Webster et al. (1996), o PCR tem potencial para diagnose de infecção criptosporidial. Porém, é consenso que a sensibilidade desta metodologia pode ser comprometida quando é usada para detectar pequeno número de organismos em amostras de águas brutas, fato que reduz a sua aplicabilidade.

Segundo Quintero-Betancourt et al. (2002), os métodos de detecção baseados no PCR permitem diferenciar as espécies de *Cryptosporidium* patogênicas ao homem e seguir a trilha da fonte de contaminação de oocistos no ambiente. Pode ser usado para determinar gênero, espécie

e o genótipo do parasita, sendo que esta informação genotípica pode ser usada para determinar uma cepa específica ou a fonte do surto.

Fontaine & Guillot (2003) desenvolveram um método baseado no PCR, chamado “TaqMan PCR” e que, segundo os autores, quantifica oocistos de *C. parvum* em amostras de águas brutas e tratadas. Fizeram testes em amostras inoculadas de água de torneira e água de rio (com concentrações de 78 e 775 oocistos). Os índices de recuperação variaram entre 47,4% e 99%, para a primeira concentração de inóculo e 39,1 a 68,3%, para a segunda. Os autores afirmam que estes valores são significativamente maiores que os reportados com os métodos da USEPA e os testes apresentaram muito menos variabilidade. Além disso, ainda segundo os pesquisadores, este novo método molecular oferece uma alternativa rápida, sensível e espécie específica para a quantificação de *C. parvum*, em água.

Higgins et al. (2003) utilizaram centrifugação de fluxo contínuo (CFC) em conjunto com separação imunomagnética (SIM) e microscopia de imunofluorescência (IFA), aliados ao PCR para recuperar e detectar (oo)cistos. No primeiro experimento realizado, 10 amostras (10 L cada) foram inoculadas com 100 oocistos, submetidas à CFC e SIM e o "pellet" foi avaliado utilizando-se IFA. No segundo experimento, o mesmo número de amostra nas mesmas condições também foram submetidas à CFC e IMS, porém a avaliação foi feita por PCR. Em ambos os experimentos 9/10 corridas foram positivas. Os pesquisadores fizeram também inoculações com apenas 10 oocistos (em 10 L) obtendo 10/12 positivos para IFA, com uma média de recuperação de  $3,25 \pm 3,25$  oocistos. Testaram ainda uma co-inoculação de 10 cistos de *Giardia* em 10 L de água, onde 5/7 corridas foram positivas, com  $0,85 \pm 0,7$  cistos. Os autores avaliaram a influência da turbidez na recuperação e afirmam que, enquanto uma cápsula de filtração eficiente baseada nos métodos 1622/1623 da USEPA, não for criada, a CFC e a SIM podem ser alternativas rápidas e econômicas para isolamento e detecção de (oo)cistos em matrizes de águas turvas, contendo pequenas concentrações destas estruturas biológicas.

Diante de tudo o que foi exposto anteriormente, verifica-se a necessidade do desenvolvimento de novas metodologias mais rápidas, eficientes e baratas. A tabela 3.10 apresenta um resumo de algumas das metodologias empregadas na atualidade. Observando-a, é possível verificar que o tipo de metodologia mais aplicada para detecção e recuperação de *Cryptosporidium* e *Giardia* é a utilização de membranas, provavelmente devido aos custos e eficácia.

Tabela 3.10. - Metodologias utilizadas na detecção de cistos de *Giardia* sp e oocistos de *Cryptosporidium* sp.

Referência	Local	Tipo de água	Volume (L)	Método	Conc. Inicial	Eficiência de recuperação(%):
Whitmore & Carrington (1993)	Inglaterra	fluvial e torneira		Fluxo contínuo (bancada: 9600g)	1x10 <sup>7</sup> oo/100L	fluvial: 0,9-31,2; torneira: 1:26,0-32,5 poço: 31,3-40,0; fluvial:26,0-32,5 37,1-86,1; 37,0-41,0 37 - 41 0,4 - 5,5 0,50 1,2-6,5 fluvial - 8,8; torneira - 4,7 2,3-98,4
		poço e fluvial inoc. deionizada	20	Filtração fluxo vortex	10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> /20L	
		torneira inoculada	1	Filtração fluxo-cruzado	1x10 <sup>7</sup> oo/L	
		torneira inoculada	100	Filtro polipropileno 5µm		
		torneira inoculada	100	Filtro fibra vidro 3 µm	1x10 <sup>7</sup> oo/100L	
		torneira inoculada	100	Filtro fibra vidro 1 µm		
		fluvial e torn. inoc.	100	Filtro fibra vidro 2 µm		
		torneira inoculada	2,5	Filtro com areia	4x10 <sup>7</sup> oo/2,5L	
Kfir et al. (1995a)	África Sul	torneira	10	Filtração com membrana	10-30 ci/mL	11,10
		torneira	10	Ultrafiltração		11,60
		torneira	100	Cartucho filtro: DFN 0,45-10 µm		13,40
		torneira	100	Cart. filt. AMF Cuno Wynd DPPPY		12,20
Ho & Tam (1998)	Hong Kong	fluvial	10	Gradiente percoll/sucrose	500 oo/mL	média de 40
Falk et al. (1998)	Inglaterra	destilada	1	Filtração com membrana Sartorius AG	10 <sup>2</sup> ,10 <sup>3</sup> ,10 <sup>4</sup> e 5 x 10 <sup>3</sup> oo(cist)/L	média de 42,1 oo; 78,7 ci
Oda et al. (2000)	Kobe-Japão	tratada inoculada	20	Filt. fluxo contínuo (dois holders)		67,3 -73,9 oo; 0ci. 77,2-85 oo; 55 ci. 76,9-82,2oo; 77,1ci.
				5µm + 3 µm	100 oo e	
				10µm + 3 µm	50 ci/20L	
Hsu et al. (2001b)	Taiwan	bruta	40	Filtro de cartucho (método ICR)		9,3+-3,3oo; 28,4+-11,0 ci
		bruta	20	Filtração c/membrana (método 1622)	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	16,0+-1,7 oo; 38,3 +- 18,5 ci
		tratada	40	Filtro de cartucho (método ICR)	(oo)cistos/L	9,8+-4,5 oo; 30,0+-11,7 ci
		tratada	20	Filtração c/membrana (método 1622)		17,5+-3,2 oo; 40,4+-9,7ci
Hsu et al. (2001c)	Taiwan	bruta e tratada	100	ICR 1623 (Estados Unidos)	ñ consta	AB:7,9 oo; 5,9 ci AT: 10,0 oo; 11,0 ci AB:52,7 oo; 63,0 ci AT:42,4 oo; 51,0 ci
Simmons III et al.(2001)	EUA	riacho	10	Membrana Método 1622 (EPA)	100 a 250 oo/10L	0-3 (bruta.); 6-63(inoc.); 22-53 (controle) 0-3%(bruta.); 2-23(inoc.); 28-82; (controle)

oo – oocistos; ci - cistos

Além de métodos quantitativos, alguns qualitativos são também empregados. Estes últimos, de uma forma geral, incluem procedimentos de concentração e coloração das amostras. Entre os métodos de coloração disponíveis, os mais utilizados são os derivados de Ziehl-Neelsen, indicados por Moura & Oliveira (1985).

De Carli & Moura (2001) recomendam o Ziehl-Neelsen e suas variações (“acid fast stain”), para a coloração de *Cryptosporidium*. Segundo os autores, são os métodos que oferecem os melhores resultados. No método de Kinyoun, os oocistos de *C. parvum* apresentam coloração que varia do rosa ao vermelho chegando à púrpura intenso. O fundo da preparação é corado em verde e alguns dos quatro esporozoítos (estruturas internas presentes nos oocistos) podem ser vistos. Com o método da Safranina, os oocistos aparecem arredondados, corados em brilhante vermelho-alaranjado sobre o fundo uniforme corado em verde. Este método apresenta uma coloração uniforme dos oocistos.

Para a observação de *Giardia*, rotineiramente usam-se as soluções de Iodo Lugol que têm a propriedade de colorir os cistos e permitem a visualização da estrutura dos núcleos. A solução de iodo é absorvida rapidamente, os cistos assumem uma coloração marrom-escura uniforme. O corante Iodo Tricrômico também é empregado, fazendo-se uma combinação da solução iodo de Iodo Lugol + corante Iodo Tricrômico. Nesta coloração, os cistos aparecem em marrom-amarelo (iodo) e os detritos em verde (Iodo Tricrômico), produzindo um contraste que facilita a identificação dos parasitos. Porém, os cistos de protozoários apresentam problemas na identificação em nível de espécie (depende dos detalhes e da clareza da morfologia). Essa coloração apresenta um matiz mais escuro que a coloração tradicional pela solução de Iodo Lugol, conseqüentemente, deve haver um aumento na intensidade de iluminação do microscópio (De Carli & Moura, 2001).

### 3.5 Detecção de (oo)cistos em recursos hídricos

A ubiquidade destes microrganismos foi constatada nos mais variados ambientes aquáticos por diversos pesquisadores. Percebe-se uma grande oscilação na frequência e quantidade observadas em todos os tipos de águas avaliadas.

Em águas de poços freáticos, nas Ilhas Virgínicas nos EUA, onde, segundo Crabtree et al. (1996), a maioria da população ainda usa o sistema de cisternas para captar água, estes pesquisadores fizeram avaliação de amostras de água deste tipo para a detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia*. Volumes de 400 L de água de nove cisternas privadas e quatro públicas foram coletadas durante o período de 1 ano, perfazendo um total de 44 amostras. Após a filtração, os microrganismos foram detectados utilizando-se anticorpos específicos e microscopia de epifluorescência. Um, ou ambos protozoários, foram encontrados em 81% das cisternas públicas e 47% das privadas. O *Cryptosporidium* foi encontrado com maior frequência que a *Giardia*. Águas de chuva são coletadas nas cisternas, o que sugere que a contaminação seja de origem ambiental, pois ocorre lavagem do solo e carreamento da água para os poços.

Em águas marinhas nas praias Waikiki, Black Point e Ala Wai Canal (Oahu, Hawaii), Johnson et al. (1997) verificaram a presença de *Giardia muris* e *Cryptosporidium parvum*. Um fato relevante foi a observação de que a sobrevivência dos protozoários variava de acordo com a luminosidade, salinidade e qualidade da água, esta última determinada pela quantidade de *Enterococcus*. Segundo os pesquisadores, os parasitas resistiram mais no escuro, ou seja, a luz solar afeta diretamente o tempo de vida destes organismos. Diante de tal fato, talvez fosse possível comprovar a eficiência da radiação UV no combate a estes patógenos.

Ho & Tam (1998) analisaram amostras dos Rios Lam Tsuen e Shing Mun, que são utilizados para abastecer grande parte da população de Hong Kong. Além disso, no Shing Mun desenvolvem-se atividades de recreação locais e internacionais, como, por exemplo, competição a remo. Foram coletadas amostras em 7 pontos, durante treze meses consecutivos. Os níveis de *Giardia* encontrados foram muito maiores (468 cistos/L) que os níveis de *Cryptosporidium* (3 a 30/10L). Segundo os autores, tal fato sugeriu que incidentes de infecção com *Giardia* na comunidade eram muito mais frequentes do que com *Cryptosporidium* e que os níveis de cistos observados nesta pesquisa demonstraram óbvia contaminação de esgoto em ambos os rios, pois eram de fato muito maiores que os níveis já registrados em águas de superfície não contaminadas, em outras regiões do mundo.

Na verdade, aqui no Brasil, como será visto mais adiante, Hachich et al. (2000) já encontraram contaminações em níveis maiores em águas de rio (521 cistos/L). Contudo, são rios com descargas de esgotos muito maiores, cuja capacidade de depuração já está muito esgotada.



Também já foram verificados em águas subterrâneas quando Hancock et al. (2000) analisaram 383 amostras coletadas em 166 lugares diferentes de 20 Estados de várias regiões dos EUA, visando avaliar a microbiota local com dimensões de 1 a 500  $\mu\text{m}$ . Utilizaram microscopia de epifluorescência, onde a análise dos dados mostrou que 16 locais (10%) foram positivos para *Cryptosporidium* e 10 (6%) para *Giardia*.

### Detecção de (oo)cistos em águas brutas e potabilizadas

LeChevalier & Norton (1995) analisaram 347 amostras de águas superficiais de sistemas americanos de tratamento, entre 1988 e 1993, ficando evidenciado que a ocorrência de *Giardia* e *Cryptosporidium* era de 53,9 e 60,2%, respectivamente.

Kfir et al. (1995b) investigaram águas superficiais e água potável na África do Sul (tabela 3.11). Nas águas superficiais, encontraram cistos em maior quantidade que oocistos e apenas 25,5% das amostras testadas, deste tipo de água, não estavam contaminadas. Somente 1% do total de amostras foi positivo para *Cryptosporidium* e 12% para *Giardia*. As concentrações de (oo)cistos encontradas neste tipo de amostra foram grandes, quando comparadas com amostras de esgotos brutos também avaliadas no experimento. Segundo os autores, é de extrema importância que a formulação de linhas de qualidade de água incorpore limites para cistos e oocistos de protozoários. Além disso, os procedimentos recomendados devem ser seguidos nos tratamentos, para a remoção desses parasitas. Isto é válido especialmente em países em desenvolvimento, onde o risco de contaminação das águas superficiais, por estes e outros organismos, deve ser muito maior.

Tabela 3.11 - Ocorrência média de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* detectados em águas da África do Sul.

Tipo de Amostra	Oocistos/10L		Cistos/10L	
Água superficial	Min	0	Min	0
	Max.	250	Max.	460
	Média	6	Média	30
Água potável	Min	0	Min	0
	Max.	1	Max.	4
	Média	0	Média	2

Fonte: Kfir et al. (1995b)

Em várias fontes ambientais, em Israel, Zuckerman et al. (1997) observaram a presença destes microrganismos durante um período de nove meses (maio 1995 a janeiro de 1996). Em 15 amostras de cinco rios, 12 (80%) foram positivas para *Cryptosporidium* (0,04-1,9 oocistos/L) e 8 (53,3%) para *Giardia* (0,05-0,78 cistos/L). O principal reservatório de água potável de Israel, Lake Kinneret, também foi amostrado seis vezes em dois lugares. O *Cryptosporidium* foi isolado em 4 (66,6%) das 6 amostras (0,3-1,09 oocistos/L) e a *Giardia* estava presente em 5 (83,3%) das 6 amostras (0,135 -16,2 cistos/L). Foram analisadas, também, 35 amostras de água de estação piloto de filtração. O *Cryptosporidium* foi encontrado em 65,7% (23/35) e a *Giardia* em 22,9% (8/35). Os autores ressaltaram que nesta área (Nordeste do país), além da agricultura, é uma região onde há criações de gado, ovelha e outros animais domésticos. Sabe-se que atividades são potenciais contribuintes para a contaminação de água, com ambos os protozoários.

Em Selangor, Malásia, Ahmad et al. (1997) verificaram a ocorrência dos protozoários em águas brutas e tratadas de duas estações de tratamento, entre julho de 1994 e janeiro de 1995. Variáveis como oxigênio dissolvido, pH, temperatura, condutividade, turbidez, cloro total livre e coliformes fecais foram avaliadas. Somente *Giardia* foi detectada em 90% das amostras de água bruta (0-60 cistos/L). Todas as amostras estavam contaminadas com coliformes fecais ( $4,6 \times 10^4$  a  $1,3 \times 10^5$  ufc por 100 mL). Estatisticamente, não foi observada nenhuma correlação entre a concentração de cistos e de coliformes fecais e nem com os parâmetros avaliados. Nas amostras de águas tratadas não foram observados cistos, oocistos ou coliformes fecais.

Bertolucci et al. (1998) investigaram a ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de 500 L de água bruta e tratada em estações de tratamento em Turin (Itália). Detectaram os protozoários em todas as amostras coletadas na entrada dos reservatórios (média de 137 cistos/100L e 70 oocistos/100L). Nas amostras de água tratada os microrganismos ainda estavam presentes, porém houve um decréscimo: 46 cistos/100L e 7 oocistos/100L.

Na Alemanha, Karanis et al. (1998) desenvolveram um estudo para estimar a distribuição de *Giardia* e *Cryptosporidium* e a eficiência de plantas de tratamento convencional na remoção destes microrganismos em águas de superfície. Amostras de seis Etas de diferentes locais do país foram examinadas, simultaneamente, para ambos os protozoários (entre julho de 1993 e dezembro de 1995). Os resultados confirmaram a ocorrência dos patógenos em todos os

tipos de águas avaliadas (tabela 3.12). Segundo os pesquisadores, foram obtidos bons resultados quanto à eliminação dos organismos, por otimização do processo de tratamento. Todavia, apesar das tecnologias de tratamento de água serem efetivas na remoção de *Giardia* e *Cryptosporidium*, os resultados da pesquisa mostram, claramente, que estes microrganismos escapam às barreiras dos filtros, quando não se percebem deficiências no tratamento, contaminando a água final.

Tabela 3.12 - Resultados de investigações de ocorrência de *Giardia* e *Cryptosporidium* em amostras de água bruta e tratada de seis ETAs na Alemanha (julho a dezembro de 1995).

Fonte de água	Amostras positivas para parasitas/ n°. amostras investigadas	Amostras positivas para <i>Giardia</i> / n° de amost. investig.	Média cistos <i>Giardia</i> / 100L e (n°. máximo)	Amostras positivas para <i>Cryptosporidium</i> /n° de amost. investig.	Média de oocistos de <i>Cryptosp</i> / 100L e (n° máximo)
Água bruta	80/105 (76,2%)	67/105 (63,8%)	88,2 (1314)	49/105 (46,7%)	116 (1081)
Passo intermed. de tratamento	50/150 (33,3%)	30/150 (20%)	2,86 (19,2)	44/150 (29,3%)	25,23 (66,6)
Água potável	18/47 (38,3%)	7/47 (14,9%)	3,77 (16,8)	14/47 (29,8%)	3,24 (20,8)

Fonte: Karanis et al. (1998)

Na tabela 3.12 é possível verificar que a *Giardia* foi encontrada em maior quantidade na água bruta e o *Cryptosporidium* na etapa intermediária do tratamento e na água potável. Isto pode ser relacionado ao tamanho dos oocistos, pois estas estruturas, sendo ainda menores que os cistos, passam com maior facilidade pelos sistemas de tratamento.

O tratamento de água baseado em coagulação química, usando flotação com ar dissolvido em manto de lodos, pode ser capaz de alcançar uma remoção superior a 99% de oocistos (Hall et al., 1995). A cinética de sedimentação está diretamente relacionada ao tamanho e densidade dos (oo)cistos, densidade e viscosidade do meio. Desta forma, a adesão de (oo)cistos em sedimentos nas ETAs influi na sua velocidade de sedimentação e, conseqüentemente, remoção durante as etapas do processo, pois a velocidade de sedimentação dessas estruturas biológicas difere quando elas se encontram soltas na água ou aderidas a algum sedimento (Medema et al., 1998).

Clancy (2000) avaliou a ocorrência dos surtos que aconteceram em Sidney (Austrália), no ano de 1998. Observou-se uma grande variação na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* e

cistos de *Giardia* (desde não detectados a milhares de (oo)cistos/100L de água tratada). Embora não houvesse sido detectado nenhum surto, altas concentrações de (oo)cistos foram repetidamente observadas em amostras de água coletadas no sistema de distribuição. Este trabalho discute as inúmeras dificuldades das metodologias existentes, que vão desde os cuidados com a coleta até à falta de especialistas na identificação dos microrganismos.

Em pesquisa mais recente, Hashimoto et al. (2002) fizeram um ano de monitoramento para detecção de *Giardia* e *Cryptosporidium* em uma ETA, no Japão. Analisaram um total de 13 amostras de águas de rios e 26 de água potável, tratadas por coagulação, floculação, sedimentação e filtração rápida. Em todas as amostras de águas brutas o *Cryptosporidium* foi detectado (média - 40 oocistos/100L) e a *Giardia* em 12 das 13 amostras (média - 17 cistos/100L). Das amostras de água potável, 35% (9) estavam infectadas com *Cryptosporidium* (média - 1,2 oocistos/1000L) e 12% (3) com *Giardia* (média - 0,8 cistos/1000L). Foram recuperados mais cistos e oocistos vazios do que intactos.

Hsu & Yeh (2003) avaliaram a remoção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em ETA, em escala piloto, em Taiwan. Segundo os autores, os resultados indicaram que a coagulação, sedimentação e filtração removem a maioria dos microrganismos e que a pré-ozonização pode destruir ambos os parasitas, especialmente cistos de *Giardia*. Indicaram, ainda, que sistemas de microfiltração, juntamente com a nanofiltração, podem interceptar completamente estas estruturas biológicas. A tabela 3.13, exhibe uma relação de registros de ocorrência de ambos os microrganismos em diversos ambientes aquáticos.

No Brasil, apenas recentemente têm sido realizados alguns estudos sobre a ocorrência destes patógenos em amostras de águas e esgotos. Ré (1999) pesquisou a ocorrência de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em águas de abastecimento público e poços rasos do município de Araras, Estado de São Paulo. As amostras foram submetidas a análises microbiológicas (coliformes totais e fecais, estreptococos fecais, *Clostridium perfringens* e bactérias heterotróficas). Na rede pública foi detectada a presença de *Giardia lamblia* em 16,66% das amostras, porém os testes foram negativos para *Cryptosporidium*. Nas amostras de águas de poços, nenhum dos protozoários foi detectado, embora 5 das 7 não atendessem aos padrões de potabilidade exigidos para consumo humano.

Ainda, no município de Araras, Dias Junior (1999) verificou a ocorrência de cistos de *Giardia* sp e oocistos de *Cryptosporidium* sp em águas superficiais e esgoto. Os resultados demonstraram a presença de cistos em 10 amostras analisadas, sendo duas de esgoto e oito de águas superficiais. Quanto aos oocistos foram detectados em nove amostras, sendo duas de esgoto e sete de águas superficiais. O autor verificou correlação positiva entre *Giardia* sp estreptococos fecais e pH, e entre *Cryptosporidium* e coliformes totais e *Clostridium perfringens*.

Em 1999, na cidade de São Paulo, Hachich et al. (2000) realizaram o monitoramento das concentrações desses protozoários em 28 mananciais da Rede Básica de Monitoramento do Estado. Durante o período de um ano (janeiro a dezembro), foram coletadas 162 amostras de água, das quais 31,5% foram positivas para *Giardia* e 5% para *Cryptosporidium*. Em relação aos mananciais estudados (total de 28), detectou-se *Giardia* em 57% e *Cryptosporidium* em 29%. Os autores ressaltaram que estes números podem estar subestimados, devido à baixa recuperação dos métodos analíticos empregados: floculação seguida de imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais. Apesar disto, os dados indicaram que estes protozoários estão disseminados nas águas superficiais do Estado. As percentagens de *Cryptosporidium* observadas foram menores que as de *Giardia*. Dentre os mananciais avaliados, os mais críticos foram o Rio Atibaia (na captação de Atibaia), Ribeirão dos Cristais e Rio da Cotia, no canal de captação da ETA, com densidades máximas de 521 cistos/L, 176 cistos/L e 215 cistos/L de *Giardia*, respectivamente. No manancial do Baixo Cotia, todas as amostras foram positivas para este protozoário, sendo o menor valor detectado 29 cistos/L. Onze dos mananciais estudados (34%) apresentaram três ou mais amostras positivas, durante todo o período de estudo. Quanto a uma possível relação com os indicadores bacterianos de contaminação fecal, foi observado maior número de amostras positivas para *Giardia*, nas faixas mais elevadas de concentrações desses indicadores, principalmente para estreptococos fecais.

Ainda no Brasil, Franco et al. (2001) fizeram um levantamento da ocorrência destes protozoários no Rio Atibaia que pertence à Bacia do Rio Piracicaba (São Paulo-SP). De acordo com os autores, este rio sofre contínuo impacto de descargas industriais, efluentes domésticos e fontes de contaminação agropecuária. Foram avaliadas amostras de 0,5L onde ambos os organismos foram detectados, variando de zero a 100 oocistos e 2,0 a 95 cistos.

Tabela 3.13 - Registros de ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* em diversos ambientes aquáticos.

Referência	Local	Patógeno	Tipo de Água	Quantidade
Rose (1988)	EUA	C	Rios e lagos	77% dos rios; 75% dos lagos
Colbourne (1989)	Inglaterra	C	ETA	10 <sup>6</sup> /100L sob. de tanque sedim.
Cornwell & Lee (1994)		CG	ETA	oo e ci > 150.000/100L
Kfir et al. (1995b)	África do Sul	CG	Água bruta	0,06 oo e 0,3 ci/100L
Kfir et al. (1995b)	África do Sul	CG	Água potável	s/oo; 0,0 2 ci/100L
Crabtree et al. (1996)	Ilhas Virgínicas/ EUA	CG	Água de cisternas (9 priv., 4 pub.)	2,41 oo e 1,09 ci/100L.
Zuckerman et al.(1997)	Israel	CG	Água fluvial (15 amostras)	12 (80%) oo *; 8(53,3%) ci*;
Johnson et al.(1997)	Havai	CG	Água marinha	não consta
States et al. (1997)	Nevada –EUA	CG	Água de poço (1800)	26% com ambos
Ho & Tam (1998)	Hong-Kong	CG	Água fluvial	0,03 a 0,3 oo/100L; 47 ci/100L
Hancock et al. (1998)	EUA	CG	Água subterrânea	5 oo e 8 ci /100L
Dias Junior (1999)	Araras/SP	CG	Águas superficiais	oo 7 amostras.; ci 8 amostras
Hsu et al. (1999)	Taiwan	CG	Água fluvial (8 amostras)	oo em 6 e ci em 7
Ré (1999)	Araras/SP	GC	Água de abast. público	neg. para oo e 16,66% c/ ci
Hancock et al.(2000)	EUA	CG	Água subterrânea (166 lugares)	10% oo e 6% ci
Hachich et al. (2000)	São Paulo/SP	CG	Rede básica de monitoram.	29% oo; 57% ci (28 mananciais)
Franco et al.( 2001)	Campinas/SP	CG	Rio Atibaia	65,5 oo; 54,3 ci
Arora et al. (2001)	EUA	CG	Água bruta	89 oo e 108 ci/100L
Hashimoto et al. (2002)	Japão	CG	Água bruta	40 oo e 17 ci/100L
Hashimoto et al. (2002)	Japão	CG	Água tratada (ETA)	12 oo e 8 ci/100L
Cardoso et al. (2002)	Diversos	CG	Diversos	diversos
Berino & DeLuca (2003)	Porto Alegre/RS	CG	Água bruta	0 a 32 oo e ci/100L

\*\* oo - oocistos; ci – cistos; C- *Cryptosporidium*; G- *Giardia*

### 3.6 Detecção de (oo)cistos em efluentes domésticos

A detecção destes parasitas em efluentes domésticos também tem sido objeto de estudo de muitas pesquisas, inclusive no Brasil. Em Belo Horizonte-MG, Vieira et al. (2000) verificaram a ocorrência de cistos de *Giardia*; oocistos de *Cryptosporidium* e indicadores bacterianos nos esgotos sanitários da Bacia do Ribeirão Arrudas. Encontraram oocistos na ordem de 10<sup>2</sup> a 10<sup>4</sup>/L e cistos de 10<sup>3</sup> a 10<sup>5</sup>/L. Não observaram correlação entre a ocorrência destes protozoários e presença dos indicadores bacterianos, nem com a turbidez das amostras.

Em Porto Alegre-RS, Cardoso et al. (2003) detectaram *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em efluentes domésticos tratados biologicamente e desinfetados, constatando uma densidade média de 1.042 oocistos/100 L e 431 cistos/100L. A tabela 3.14 traz um resumo da revisão de registros de ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* em esgotos brutos e tratados de várias regiões do mundo.

Tabela 3.14 - Registros de ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* em esgotos brutos e tratados em vários países.

Referência	Local	Patógeno	Tipo de Água	Quantidade
Kfir et al. (1995b)	África do Sul	CG	Esgoto bruto e tratado	Média: EB: 30 oo/130 ci ET: 30 oo/ 120 ci
Zuckerman et al.(1997)	Israel	CG	Esg dom. / eflu. estábulo	8,3-8,05 oo /L; 5-27,3 ci /L
Chauret et al. (1999)	Ottawa	C	Trat. esg. aerób. / anaerób	<250 até 3810 x 100g <sup>-1</sup>
Chauret et al. (1999)	Ottawa	G	Trat. esg. aerób./ anaerób.	<250 até 11800 x 100g <sup>-1</sup>
Dias Junior (1999)	Araras/SP	CG	Esgoto	oo e ci em 2 amostras
Robertson et al. (2000)	Escócia	G	ETE (6 tipos)	oo 38% (6/16); ci 94%(15/16)
Vieira et al. (2000)	Belo Horizonte/MG	C	Esgotos sanitários Bacia Ribeirão Arrudas	10 <sup>2</sup> a 10 <sup>4</sup>
Payment et al.(2001)	Montreal	CG	ETE	9.200 ci/L oo ã detectados ou detectados em baixos números
Vieira et al. (2002)	Belo Horizonte/MG	CG	Esgotos sanitários da Bacia Ribeirão Arrudas	10 <sup>2</sup> a 10 <sup>4</sup> /L oocistos 10 <sup>3</sup> a 10 <sup>5</sup> /L cistos
Cardoso et al. (2003)	Porto Alegre/RS	CG	Efluentes domésticos	1.042 oocistos/100 L 431 cistos/100L.

\*\* oo – oocistos; ci – cistos; C-*Cryptosporidium*; G – *Giardia*

### 3.7 Relações entre a ocorrência de (oo)cistos e variáveis ambientais

A busca por um índice indicativo de *Cryptosporidium* e *Giardia* tem sido constante, mas a dificuldade de detecção destes microrganismos requer, ainda, muitas pesquisas com este objetivo. A seguir estão relacionados alguns trabalhos desenvolvidos com o objetivo de conseguir um índice indicativo da presença desses microrganismos em águas.

Li et al. (1997) realizaram testes, com microesferas de poliestireno (4-6 $\mu$ m), visando utilizar este material como índice indicativo na determinação da remoção de *Cryptosporidium* em processo de filtração “in bag”. Segundo os autores, uma perfeita correlação linear foi observada entre a remoção de oocistos e a remoção das estruturas teste, indicando a possibilidade de utilização deste material como índice substitutivo.

Outra pesquisa foi feita por Akiba et al. (2001), onde testaram algas como índice substitutivo para a remoção de oocistos de *Cryptosporidium* por filtração direta. Foram utilizadas três espécies de algas (*Microcystis viridis*, *M. aeruginosa* e *Selenastrum capricornutum*) em tratamentos convencionais de água por filtração rápida em areia, coagulação e filtração. Segundo os autores, a alga *S. capricornutum* mostrou quase as mesmas características de coagulação que os oocistos de *Cryptosporidium*, exibindo padrões de filtração similares a este patógeno. Tais resultados levaram os pesquisadores a indicarem as algas como possíveis substitutas para a remoção de oocistos de *C. parvum*, sendo *S. capricornutum* cogitada como a mais apropriada para filtração rápida em areia.

Há ainda relatos de testes da utilização de oocistos inativados com formalina. Tais testes foram feitos por Emelko (2003), em dois meios diferentes de filtração: meio dual = composto por uma camada de 700 mm de antracito sobre 300 mm de areia; meio trial = uma camada de 650 mm de antracito sobre 250 mm de areia sobre 100 mm de brita. Após os testes, o autor afirma que oocistos inativados podem funcionar para o fim que foi pesquisado. Todavia, há trabalhos sugerindo que a utilização de oocistos inviáveis para tal fim não funciona devido à diferença na carga superficial, pois se tem verificado que esta carga (potencial zeta) apresenta um papel crucial na coagulação e conseqüente filtração (Lytle & Fox 1994 *apud* Emelko, 2003). A inativação química pode modificar o potencial zeta (Ongert & Percoraro 1996 *apud* Emelko, 2003). Contudo, durante o tratamento da água, existem inúmeros fatores que podem fazê-lo: qualidade da água, tipos e dosagem de coagulante e pH. Como a superfície da área destas partículas é relativamente insignificante em relação ao tamanho das demais, mesmo durante investigações que utilizem inoculação em massa de oocistos, essas estruturas biológicas podem passar sem serem afetadas (Emelko, 2003).

Além das pesquisas acima descritas, servindo-se de índices alternativos, são também desenvolvidos trabalhos para avaliar a correlação entre parâmetros de qualidade tradicionalmente utilizados e a ocorrência e/ou remoção de *Cryptosporidium* e *Giardia*. Embora alguns estudos



procurem esta associação com variáveis como temperatura, OD, DBO<sub>5</sub>, DQO, condutividade, fósforo e nitrogênio entre outros, os focos das pesquisas são os parâmetros turbidez e coliformes fecais. A turbidez por se tratar de partículas sólidas em suspensão, das quais os (oo)cistos fazem parte e às quais podem estar aderidos; e os coliformes, porque ainda são os indicadores mais utilizados para contaminação fecal nas águas. Há, contudo, controvérsias a respeito da utilização destes dois parâmetros como indicadores.

LeChevalier & Norton (1992) encontraram correlações da ordem de 1 log de remoção de partículas e turbidez para 0,66 e 0,89 log de remoção para *Giardia* e *Cryptosporidium*, respectivamente.

Há pesquisadores que afirmam que uma turbidez de 0,10 UNT ou menos, em água tratada, indica que *Cryptosporidium* e *Giardia* foram removidos (Rader, 1996 *apud* Tarquin et al., 1998). Segundo Bastos (2001), este parâmetro seria um bom indicador da qualidade parasitológica da água filtrada e a eficiência na sua remoção, seria um bom indicador de remoção de cistos e oocistos.

Hsu et al. (2001c) e Hsu & Yeh (2003) encontraram correlação significativa entre concentrações de oocistos e turbidez, que, de acordo com os autores, poderia ser utilizada como indicador da presença de *Cryptosporidium*, em amostras de águas brutas. Por outro lado, há aqueles que discordam dessa aplicação. Segundo Jakubowski et al. (1996), embora a turbidez seja usada como medida geral de qualidade de água, não é um padrão específico para organismos patogênicos.

Swetfeger et al. (1999) *apud* Vieira (2002), por sua vez, sugerem que o uso da turbidez e contagem de partículas para indicação da qualidade do tratamento pode subestimar a performance do processo e a sua utilização, como indicadores da remoção de microrganismos, não é segura. Vieira (2002) concorda com este ponto de vista, afirmando que a turbidez, embora adotada em alguns padrões como representante de protozoários e vírus entéricos (Brasil, 2004), também pode não ser uma medida adequada. Não somente devido aos recentes surtos de doenças veiculadas pela água, ocorridos nos EUA, onde aquele parâmetro estava dentro dos limites regulamentados, mas, também, porque as pesquisas têm mostrado que mesmo em níveis

de turbidez menores do que 0,10 UNT, amostras positivas para *Giardia* e *Cryptosporidium* têm sido registradas.

O que se tem de conclusivo, até o momento, é que as medidas de turbidez podem subestimar a performance do tratamento de água e, conseqüentemente, o risco de infecção para os consumidores. A variabilidade da performance dos tratamentos pode conduzir a variações substanciais na qualidade da água potável. Sem contínuo monitoramento é difícil associar um declínio na qualidade da água com casos esporádicos de criptosporidiose e outros agentes patogênicos de transmissão hídrica (Westrell et al., 2001).

Quanto ao outro parâmetro - coliformes fecais - em que o uso como indicador vem sendo questionado, a maioria dos pesquisadores afirma que este não é o indicador ideal para a presença/ausência dos dois protozoários, pois grande parte dos trabalhos realizados não observou correlação entre a ocorrência dos protozoários e a presença de tais indicadores bacterianos (Ahmad et al., 1997; Fricker & Clancy, 1998; Gordon & Bubnis, 2000; Vieira et al., 2000; Bastos et al., 2001; Bonadonna et al., 2001; Cardoso et al., 2003).

As razões para a rejeição, por parte de muitos pesquisadores, da utilização dos coliformes como bioindicadores para presença/ausência dos protozoários hora estudados, podem ser assim resumidas:

- a resistência ao tratamento com cloro, possibilita que a *Giardia* e o *Cryptosporidium* estejam presentes em amostras em que os coliformes já não existem. Gyürék et al. (1997), observaram, por exemplo, que a *Giardia* permaneceu viável por mais tempo na água que a *E. coli*.
- mesmo surtos de *Cryptosporidium* e *Giardia* não estão relacionados com a extrapolação do nível máximo contaminante de coliformes (Craun et al., 1997). Sendo assim, este parâmetro é duvidoso para relação com (oo)cistos.

## 4 METODOLOGIA

Neste tópico, indicou-se a localização das bacias hidrográficas e pontos de amostragem d'água onde foram feitas as coletas para a detecção dos microrganismos, bem como para as análises físico-químicas e microbiológicas. Em seguida, consta um rápido histórico da qualidade dessas águas com dados fornecidos pela FEPAM. Após a parte introdutiva, seguem as descrições das coletas e processamento das amostras, envolvendo as etapas abaixo descritas. Na seqüência é relatada a forma de expressão dos resultados e os controles realizados para as colorações e aparelho de filtração.

Etapas do processamento das amostras:

- a) concentração através de filtração;
- b) eluição dos filtros;
- c) centrifugação do eluído;
- d) purificação através de SIM (separação imunomagnética);
- e) coloração das amostras;
- f) metodologias utilizadas para as análises físico-químicas e microbiológicas.

### 4.1 Localização das bacias hidrográficas

A seguir é feita uma breve descrição dos Rios Taquari, Caí, dos Sinos e Gravataí, de onde eram coletadas as amostras de água para as análises. ETAs da CORSAN localizadas nas cidades de General Câmara, Montenegro, Canoas e Alvorada captam 26, 145, 1000 e 1300L/s de água dos Rios Taquari, Caí, dos Sinos e Gravataí, respectivamente, para abastecimento da população. Nos seis primeiros meses (agosto/2002 a janeiro/2003), as coletas foram feitas na

margem dos rios, próximo aos pontos de captação da CORSAN, porém devido ao baixo nível da água dos rios à época do verão, nos seis meses seguintes (fevereiro a julho/2003), passou-se a realizar as coletas dentro das ETAs citadas.

#### 4.1.1 Rio Taquari

A bacia hidrográfica do sistema Taquari-Antas situa-se na região nordeste do Estado do Rio Grande do Sul, abrangendo uma área de 26.428 km<sup>2</sup>, equivalente a 9% do território estadual, sendo constituída por 98 municípios, inseridos total ou parcialmente. Limita-se ao norte com a bacia do Rio Pelotas, a oeste e ao sul com a bacia do Rio Jacuí e a leste com as bacias dos Rios Caí e Sinos. Trata-se do principal afluente do Rio Jacuí, maior formador do Guaíba (Leite et al., 2003a).

O Rio Taquari nasce no extremo leste do Planalto dos Campos Gerais, com a denominação de Rio das Antas, até a confluência com o Rio Guaporé, nas imediações da cidade de Muçum. A partir daí passa a denominar-se Taquari, desembocando no Rio Jacuí, junto à cidade de Triunfo. O Rio das Antas percorre 390 km e o Rio Taquari, 140 km, totalizando uma extensão de 530 km. Seus principais afluentes pela margem esquerda são os Rios Camisas, Tainhas e Lajeado Grande e pela margem direita, os Rios Quebra-Dentes, da Prata, Carreiro, Guaporé, Forqueta e Taquari-Mirim (Leite et al., 2003a).

#### 4.1.2 Rio Caí

A bacia hidrográfica do Rio Caí possui uma área de cerca de 5.057,25 km<sup>2</sup>, correspondendo a 1,79 % do Estado, localizada ao norte de Porto Alegre, entre o planalto brasileiro e a depressão central. Seu curso d'água tem uma extensão de 285 km. Ao todo 41 municípios, com toda ou parte de sua área, compõem a bacia. A descarga das águas do Rio Caí no delta do Jacuí corresponde a 2,6 % do total das águas que este sistema recebe (Leite et al., 2003 b).

### 4.1.3 Rio dos Sinos

A bacia hidrográfica do Rio dos Sinos está situada à nordeste do Estado, entre os paralelos 29° e 30° sul e possui uma área de 3.820 km<sup>2</sup>, correspondendo a 4,5% da bacia hidrográfica do Guaíba e 1,5% da área total do Estado do Rio Grande do Sul. Esta bacia é delimitada a leste pela Serra Geral, à oeste pela bacia do Caí e ao norte e ao sul pela bacia do Gravataí (Leite et al., 2003 c).

Suas nascentes estão localizadas na Serra Geral, no município de Caraá, a cerca de 60 metros de altitude, correndo no sentido leste-oeste até a cidade de São Leopoldo. Neste ponto, muda para a direção norte-sul, desembocando no delta do Rio Jacuí entre as ilhas Grande dos Marinheiros e das Garças, a uma altitude de 12 metros. Seus principais formadores são os Rios Rolante e Paranhana, além de diversos arroios. O Rio Paranhana recebe águas transpostas da bacia do Caí, contribuição esta que varia de 5 a 9 m<sup>3</sup>/s das barragens do Salto e Divisa (MAGNA/FEPAM/1996 *apud* Leite et al., 2003 c).

### 4.1.4 Rio Gravataí

A sub-bacia hidrográfica do Rio Gravataí possui uma área de 2.200 km<sup>2</sup>, o que corresponde a 2,6% da área da bacia hidrográfica do Guaíba, incluindo, total ou parcialmente, os municípios de Santo Antônio da Patrulha, Taquara, Glorinha, Gravataí, Alvorada, Viamão, Cachoeirinha, Canoas e Porto Alegre. O sistema de drenagem é formado por três conjuntos de compartimentos hidráulicos distintos: nascentes, Banhado Grande e curso inferior (ou Rio Gravataí, propriamente dito). As nascentes são constituídas por vertentes íngremes no divisor de águas com o Rio dos Sinos, em altitudes de até 400 m, recolhendo as precipitações e despejando no Banhado Grande. O Banhado Grande, que atua como regulador de vazão, originalmente ocupava uma área de 450 km<sup>2</sup>, tendo sido reduzido para apenas 50 km<sup>2</sup>, em função do uso da água para irrigação das culturas de arroz (Leite et al., 2003d).

A seguir encontram-se a tabela 4.1, com as coordenadas UTM de cada ponto de coleta e o mapa com a localização dos rios.

Tabela 4.1 - Coordenadas UTM dos pontos de coleta.

Rio	km (em relação à foz)	N (Lat)	E (Long)
Taquari	Próximo ao km 04	22 0427317	6691984
Caí	Próximo ao km 14	22 0455604	6714800
dos Sinos	Próximo ao km 08	22 0480439	6685992
Gravataí	Próximo ao km 06	22 0482303	6684722



Figura 4.1 - Mapa da localização dos afluentes do Lago Guaíba e pontos de amostragem

## 4.2 Qualidade histórica das águas avaliadas

Nas tabelas 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5, são apresentados os resultados (médias) dos anos 2002 e 2003 de qualidade da água dos rios avaliados avaliados pela FEPAM (à exceção do Rio Caí, cujos dados são de 1999 e 2000), nos pontos mais próximos aos das amostragens. Os dados de todo o período amostral encontram-se anexos.

Para a determinação da qualidade das águas o Departamento de Qualidade da FEPAM utiliza a comparação dos dados com a Resolução nº 20/86 do CONAMA e o IQA – Índice de Qualidade da Água. O IQA adotado é o da NSF (National Sanitation Foundation), adaptado com a retirada do parâmetro temperatura e utilizando o nitrogênio total, em lugar do nitrato. No seu cálculo, são considerados os parâmetros turbidez, sólidos totais, pH, OD, DBO<sub>5</sub>, nitrogênio total, fosfato total e coliformes fecais.

Tabela 4.2 - Valores médios dos parâmetros de qualidade da água do Rio Taquari (Ponto TA 004), obtidos ao longo dos anos 2002 e 2003.

Parâmetros	Unidades	2002	2003
Turbidez	UNT	38,5	38
Sólidos totais	mg/L	78,00	86,25
pH		6,68	nd
OD	mg/L	5,85	8,95
DBO <sub>5</sub>	mg/L	1,00	1,00
NTK	mg/L	0,66	0,74
Fosfato total	mg/L	0,07	0,05
<i>C. fecalis/E.coli</i>	NMP/100mL	285	74

Fonte: FEPAM (2004)

Tabela 4.3 - Valores médios dos parâmetros de qualidade da água do Rio Caí (Ponto CA014), obtidos ao longo dos anos 1999 e 2000.

Parâmetros	Unidades	1999	2000
Turbidez	UNT	38,7	31
Sólidos totais	mg/L	100,5	107,5
pH		6,4	7,0
OD	mg/L	6,6	6,7
DBO <sub>5</sub>	mg/L	2,0	1,5
NTK	mg/L	0,76	0,61
Fosfato total	mg/L	0,08	0,11
<i>C. fecalis/E.coli</i>	NMP/100mL	36,7	194

Fonte: FEPAM (2004)

Tabela 4.4 - Valores médios dos parâmetros de qualidade da água do Rio dos Sinos (Ponto SI 008), obtidos ao longo dos anos 2002 e 2003.

Parâmetros	Unidades	2002	2003
Turbidez	UNT	48,33	43,5
Sólidos totais	mg/L	110,50	117,73
pH		6,61	6,44
OD	mg/L	2,72	3,28
DBO <sub>5</sub>	mg/L	1,83	2,42
NTK	mg/L	1,68	2,65
Fosfato total	mg/L	0,23	0,25
<i>C. fecais/E.coli</i>	NMP/100mL	3303	2405

Fonte: FEPAM (2004)

Tabela 4.5 - Valores médios dos parâmetros de qualidade da água do Rio Gravataí (Ponto GA 006), obtidos ao longo dos anos de 2002 e 2003.

Parâmetros	Unidades	2002	2003
Turbidez	UNT	81,83	63,33
Sólidos totais	mg/L	141,25	138,55
pH		6,59	6,31
OD	mg/L	2,52	1,94
DBO <sub>5</sub>	mg/L	4,82	6,00
NTK	mg/L	4,64	5,85
Fosfato total	mg/L	0,50	0,61
<i>C. fecais/E.coli</i>	NMP/100mL	103109	121271

Fonte: FEPAM (2004)

### 4.2.1 Rio Taquari

O trecho inferior do Rio das Antas, denominado de Rio Taquari, de Encantado até a foz, possui qualidade na faixa “Regular”, exceto a foz que em alguns períodos alcança qualidade “Boa”. Apresenta predominância da Classe 1, com médias anuais de OD em torno de 6,0mg/L e DBO<sub>5</sub> abaixo de 2,0 mg/L. Em alguns trechos de amostragem, como Santa Teresa, Encantado, Roca Sales, Lajeado e Estrela, enquadram-se na Classe 4, pois as cidades citadas estão localizadas às margens do rio. As médias anuais de coliformes fecais nos últimos anos têm se mantido inferiores a 4.000 NMP/100mL. Estas concentrações são bem inferiores às concentrações encontradas nos Rios Gravataí e Sinos, localizados na Região Metropolitana de Porto Alegre. O



Rio das Antas e o Rio Taquari apresentam água de boa qualidade, mas alguns rios afluentes apresentam contaminação (Leite et al., 2003a).

#### 4.2.2 Rio Caí

O trecho superior do Rio Caí, em São Francisco de Paula e Canela, apresenta notas na faixa “Boa” (acima de 70). Os trechos médio e inferior apresentam predominância na faixa “Regular” (entre 50 e 70). É um rio que, em geral, apresenta boas condições de oxigenação, predominando a Classe 1. As concentrações de oxigênio dissolvido decaem no sentido das nascentes para a foz, mas as médias anuais estão em torno de 6,0 mg/L. Este rio, especialmente no trecho superior, tem corredeiras facilitando a oxigenação das águas. Os dados de  $\text{DBO}_5$  estão geralmente na Classe 1, nos locais monitorados, e as concentrações médias anuais atingiram 4,0 mg/L junto aos municípios de Montenegro e São Sebastião do Caí. Nos últimos anos, no entanto, estas concentrações médias retornaram a valores inferiores a 3,0 mg/L. Ao contrário dos Rios Gravataí e Sinos, o Caí não apresenta situação crítica, quanto aos esgotos cloacais.

As grandes cidades da bacia hidrográfica, como Caxias do Sul, Bento Gonçalves e Farroupilha, localizam-se longe de suas margens. Portanto, o reflexo negativo dos esgotos cloacais é menor, sendo o trabalho de depuração realizado nos arroios que drenam parte destes municípios, como Arroio Pinhal (área sul de Caxias do Sul), Arroio Cadeia (curtumes de Ivoti e Lindolfo Collor) e Arroio Forromeco (área sul de Farroupilha). Os esgotos das cidades de médio porte, como Montenegro e São Sebastião do Caí (localizadas às margens) e os esgotos da parte sul de Caxias do Sul, também são drenados pelo Arroio Pinhal. No entanto, as concentrações médias anuais de coliformes fecais estão em torno de 10.000 NMP/100mL, valores bem inferiores aos encontrados nos Rios Gravataí e dos Sinos, na Região Metropolitana de Porto Alegre (Leite et al., 2003b).

### 4.2.3 Rio dos Sinos

O trecho superior, desde as nascentes, em Caraá, até a localidade de Santa Cristina, apresenta predominância na faixa “Regular” (entre 51 e 70), sendo que nas nascentes foram detectadas, em alguns anos, notas na faixa “Boa” (entre 71 e 90). As notas seguem na faixa “Regular” até a captação de Novo Hamburgo (ponte para Lomba Grande), mas os valores decrescem ao longo do percurso do rio. No trecho médio, que compreende a foz do Arroio Luiz Rau, o rio apresenta tendência ao decréscimo de qualidade, pois no início do período monitorado apresentava notas na faixa “Ruim” (entre 26 e 50) e está declinando para a faixa “Muito Ruim” (inferior a 25). O trecho seguinte, de Novo Hamburgo até São Leopoldo, incluindo o canal João Correia, está na faixa “Ruim”, mas não apresenta tendência de queda na qualidade. A foz do Arroio Portão, à exemplo da foz do Arroio Luiz Rau, também apresenta decréscimo de qualidade, com tendência à faixa “Muito Ruim” (inferior a 25). O trecho final está na faixa “Ruim”, mas não apresenta tendência de decréscimo.

O trecho entre as nascentes, em Caraá e Campo Bom, apresenta predominância de Classe 1 (concentrações de OD maiores que 6,0 mg/L e de DBO<sub>5</sub> inferiores a 3,0 mg/L). Ao entrar na Região Metropolitana de Porto Alegre, há um sensível decréscimo da Classe 1, predominando as Classes 2 a 4 e até mesmo concentrações fora da Classe 4. A foz do Arroio Portão e a foz do arroio Luiz Rau apresentam significativas freqüências fora da Classe 4. Nestes dois locais são freqüentes as mortandades de peixes, nos períodos de estiagem. O arroio Portão drena cerca de 40 curtumes localizados nos municípios de Estância velha e Portão. O Arroio Luiz Rau, drena a área central da cidade de Novo Hamburgo, conduzindo esgotos cloacais e efluentes industriais de curtumes e metalúrgicas. Em área urbana, este arroio é conhecido como canal da avenida Nações Unidas (Leite et al., 2003c).

Em relação aos coliformes fecais, apenas uma parte do trecho superior, compreendido entre as nascentes em Caraá até Taquara, não apresenta predominância de Classe 4 (superiores a 4.000 NMP/100mL). A foz do Arroio Luiz Rau apresenta concentrações médias em torno de 200.000 NMP/100mL. Na foz do canal João Correia, as concentrações médias vêm diminuindo nos últimos anos. No local, foi ampliado o sistema de tratamento de esgotos cloacais do município de São Leopoldo. Todo o trecho metropolitano do Rio dos Sinos está na Classe 4,

para coliformes fecais, sendo que as concentrações estão bem acima do limite desta Classe, atingindo concentrações médias anuais de até 200.000 NMP/100mL (Leite et al., 2003c).

#### 4.2.4 Rio Gravataí

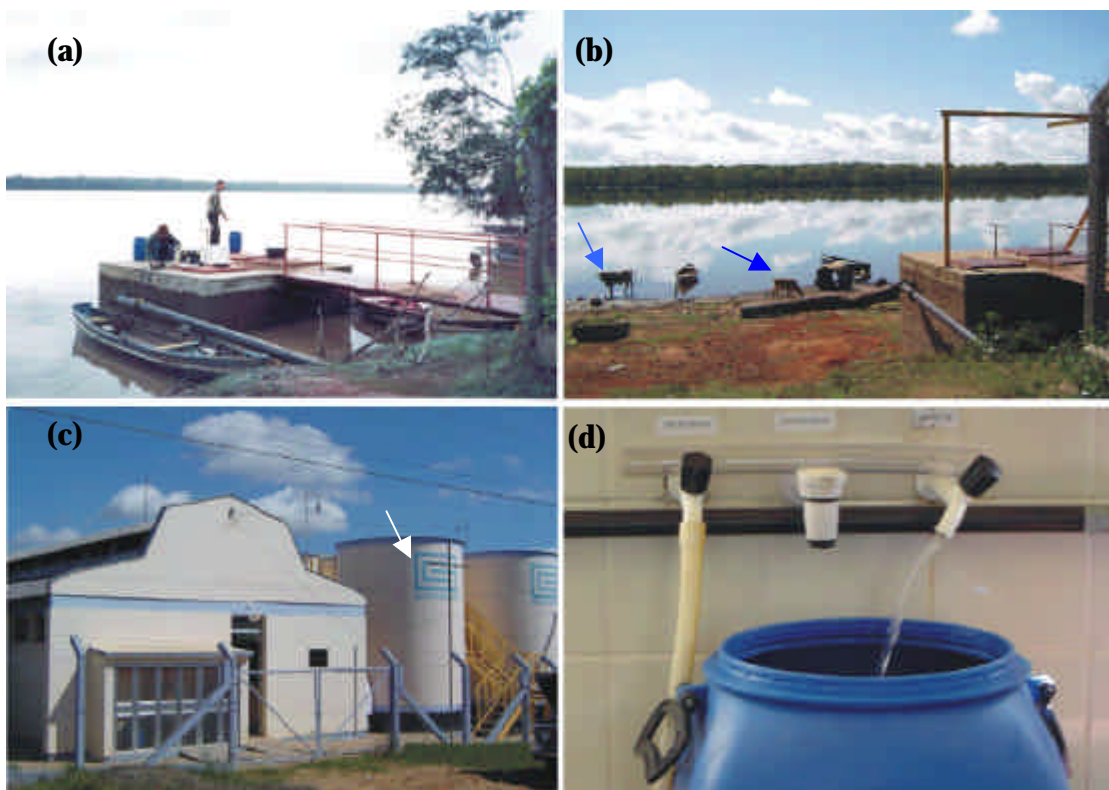
O Arroio Chico Lomã, um dos formadores do Banhado Grande, tem apresentado qualidade na faixa de “Regular”, assim como o ponto de amostragem do Canal (em Glorinha), na saída do Banhado Grande. O local denominado Passo dos Negros, ainda à montante da cidade de Gravataí, vem apresentando queda na qualidade: foi “Boa” em 1994 e 1995, passou a “Regular” de 1996 a 2000 e, finalmente, entrou na faixa “Ruim” em 2001. O local a seguir, Cachoeirinha, esteve predominantemente na faixa “Ruim”, mas em queda, tendendo para “Muito Ruim” (inferior a 25), pois no ano 2001, teve nota 27. Neste trecho, entre o Passo dos Negros e Cachoeirinha, foram construídas duas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs). Através do Pró-Guaíba, mas as ligações prediais na rede coletora ainda não estão concluídas. Finalmente, o local de amostragem junto à foz do Arroio da Areia, que drena a zona norte de Porto Alegre, está na faixa “Muito Ruim”, com notas inferiores a 25, com tendência de queda.

Os dados demonstram que a qualidade das águas, do Rio Gravataí, deterioraram ao longo do rio e dos anos, mostrando claramente a entrada das cargas geradas nos centros urbanos, principalmente de Cachoeirinha, Gravataí e Porto Alegre.

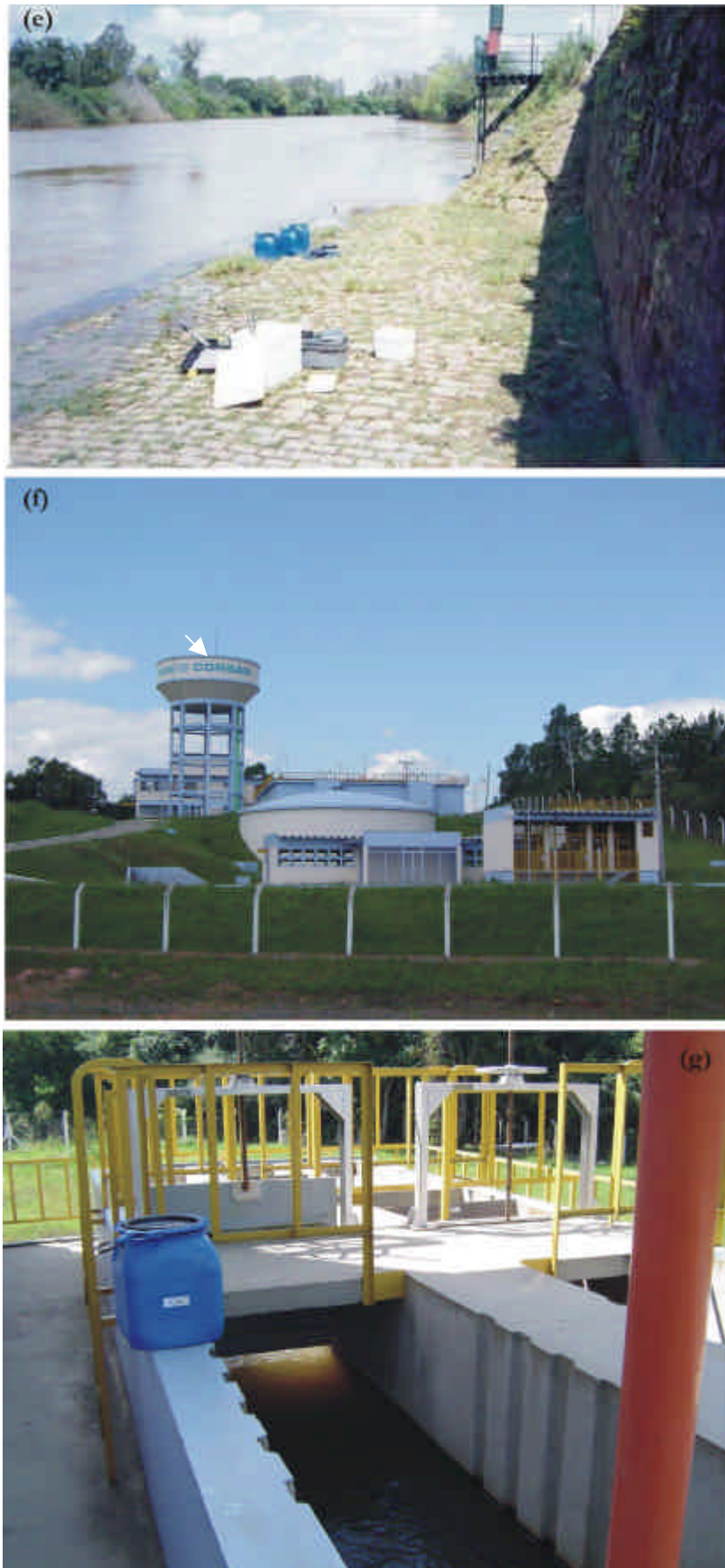
No trecho inicial apresenta predominância de concentrações em Classe 1, sendo que, em alguns anos, a média de OD foi superior a 6,0 mg/L e DBO<sub>5</sub> inferiores a 2,0 mg/L. No trecho final, predomina a Classe 4 (concentrações de OD menores que 2,0 mg/L). As médias anuais de OD apresentam tendências de declínio, ficando em torno de 3 a 2 mg/L e as de DBO<sub>5</sub> em torno de 3 a 10 mg/L (concentrações das Classes 1, 2 e 3). Das nascentes até o Arroio Demétrio apresenta predominância de concentrações nas Classes 1 e 2, com médias anuais de coliformes fecais pouco inferiores a 1.000 NMP/100mL. No trecho final, só níveis de Classe 4 (superiores a 4.000 NMP/100mL). Todavia, nos últimos anos as concentrações médias anuais estão elevadas, atingindo a média anual de até 500.000 NMP/100mL (Leite et al., 2003d).

### 4.3 Pontos de coletas

Inicialmente as coletas eram feitas às margens dos rios, a uma profundidade de 1,20m, em pontos de captação da CORSAN. A partir de fevereiro de 2003, quando o nível dos rios baixou muito, tornando impossível atingir esta profundidade à margem, passou-se a coletar dentro das ETAs, na chegada da água bruta. Os pontos de coletas localizavam-se nas cidades de General Câmara (Taquari, próximo ao km 04), Montenegro (Caí, próximo ao Km 14), Canoas (Sinos, próximo ao km 08) e Canoas (Gravataí, próximo ao km 06). As ETAs localizavam-se nas mesmas cidades dos pontos de coleta, à exceção do Rio Gravataí, cuja ETA fica na cidade de Alvorada. As Figuras 4.2.a a 4.2.d - Rio Taquari; 4.2.e a 4.2.g Rio Caí; 4.2.h a 4.2.j Rio dos Sinos e 4.2.k a 4.2.m Rio Gravataí, exibem os locais de coletas.



Figuras 4.2.a a 4.2.d - Ponto de coleta às margens do Rio Taquari, (a) inverno e (b) verão, (c) ETA General Câmara e (d) ponto de coleta de água bruta na ETA; setas indicando gado pastando às margens do rio.

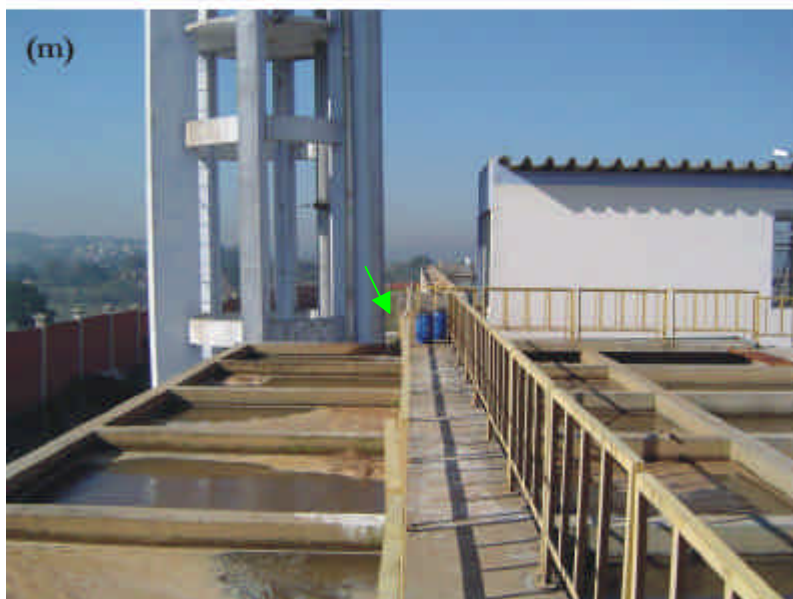


Figuras 4.2.e a 4.2.g - (e) Ponto de coleta às margens do Rio Caí, no inverno; (f) ETA Montenegro; (g) ponto coleta de água bruta na ETA.



Figuras 4.2.h a 4.2.j - (h) Ponto de coleta às margens do Rio dos Sinos no inverno; (i) ETA Niterói; (j) ponto de coleta de água bruta na ETA.





Figuras 4.2.k a 4.2.m - (k) Ponto de coleta às margens do Rio Gravataí no inverno; (l) ETA Alvorada; (m) ponto de coleta de água bruta na ETA (seta indicando torneira de água bruta).

## 4.4 Amostragem

As amostragens foram realizadas mensalmente, durante um período de 14 meses, com início em junho/2002 e término em julho de 2003, visando verificar a existência de variação sazonal na ocorrência dos microrganismos. Os dois primeiros meses de 2002 serviram como coletas piloto.

Em cada ponto eram coletados 100 L de água, acondicionados em galões plásticos e transportados ao IPH/UFRGS, para filtração, eluição, concentração, separação imunomagnética (IMS), coloração e exame. Eram filtrados 50L de cada amostra por vez. A filtração era iniciada logo quando da chegada das amostras ao laboratório e finalizada na mesma semana da coleta. Além da água coletada para filtração, também eram feitas coletas para análises físicas, químicas e biológicas.

## 4.5 Processamento das amostras para detecção de (oo)cistos

O processamento das amostras era feito seguindo a seqüência sugerida pelo método 1623 da USEPA. A etapa inicial era a concentração da amostra através de filtração em membrana, finda a filtração as membranas eram eluídas por agitação, a suspensão resultante deste processo era novamente concentrada com o auxílio de uma centrífuga e o "pellet" formado era purificado através de SIM. Em seguida, a amostra purificada era avaliada através de três métodos de coloração para cistos e três para oocistos.

### 4.5.1 Filtração

O cartucho de filtração recomendado pelo método 1623 da USEPA (Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor ML, Envirochek TM Sampling Capsule, product 12110) é indicado para a filtração de 10 L de água. Em testes preliminares tentou-se utilizar bombas peristálticas acopladas



ao cartucho, porém o filtro colmatava rapidamente aumentando a pressão, desencadeando o desprendimento das mangueiras da entrada do cartucho.

A norma permite a utilização de outros métodos com membrana, desde que os índices de recuperação de (oo)cistos estejam dentro das exigências feitas pela mesma. O Prof. Dr. Sérgio João de Luca projetou um equipamento de microfiltração com este fim, que foi construído no IPH. Feitos os testes no aparelho, verificou-se que os índices de recuperação alcançados eram semelhantes aos exigidos pela norma, optando-se assim, pela sua utilização em substituição ao cartucho. Tal procedimento reduziu os custos e possibilitou a filtração de uma quantidade maior de água. A seguir é feita a descrição do equipamento (figura 4.3) que consiste de:

- a) um recipiente, de aço inoxidável, medindo 53 cm de altura e 40 cm de diâmetro interno, com capacidade para 60L de água;
- b) uma bomba Netzsch (modelo 12)
- c) tubulação, de teflon, medindo 1/2 mm
- d) suporte medindo 47mm de diâmetro interno
- e) dois manômetros
- f) um rotâmetro
- g) um inversor de frequência marca WEG modelo  $\mu$ line



Figura 4.3 - Equipamento de filtração (seta indicando suporte onde é colocada a membrana).

O princípio de funcionamento do aparelho é o seguinte: a água é colocada no recipiente, o qual é conectado à bomba Netzsch, que a impulsiona através da tubulação em direção ao rotâmetro. Este, por sua vez, está ligado ao suporte, onde é colocada a membrana e por onde a amostra é filtrada. A água já filtrada é descartada através da tubulação, que está ligada à saída do suporte.

Porém, em testes iniciais, percebeu-se que havia a tendência ao acúmulo de material particulado dentro da tubulação do rotâmetro, dificultando a continuação da passagem de água. Havia, também, o risco de, junto com este material, ficarem retidos os (oo)cistos, além da possibilidade de contaminação das amostras subsequentes. Como seria inviável desmontar o aparelho a cada filtração, optou-se por utilizar a rota alternativa, a qual não passa por dentro do rotâmetro, conforme pode ser visto na figura 4.3, indo direto para o suporte, evitando-se desta forma a contaminação das amostras.

O processo de filtração dava-se da seguinte forma:

- 1) Um volume de 10 L de amostra era colocado no recipiente, pré-lavado, do equipamento de filtração;
- 1) O equipamento era acionado e cerca de 05 litros da amostra eram passados através das tubulações e suporte, com o objetivo de ambientar o aparato;
- 2) Desligava-se o aparelho e uma membrana de mistura de ésteres medindo 47 mm de diâmetro e 1,2  $\mu$  de porosidade era colocada no suporte sobre uma malha de metal, para evitar o rompimento da membrana;
- 3) 50L da amostra eram colocados no recipiente, agora ambientado;
- 4) A frequência era ajustada em 25 Hz para iniciar a filtração;
- 5) A vazão inicial era em torno de 200 mL/min;
- 6) Conforme ia colmatando a membrana, a pressão no manômetro aumentava, até chegar ao máximo de 18kgf/cm<sup>2</sup>. Aguardava-se até que o ponteiro começasse a agitar vigorosamente indicando não haver mais condições de continuidade de filtração;
- 7) O tempo de troca de membranas variava de acordo com as condições da amostra, quanto maior a quantidade de matéria dissolvida e em suspensão, mais rápida a colmatção da membrana;

- 8) Quando a membrana em uso colmatava, era substituída por uma nova e aquela retirada era colocada imediatamente num frasco de centrifuga cônico com capacidade para 250mL, contendo solução eluente;
- 9) Os frascos contendo as membranas eram mantidos sob refrigeração, até o início da próxima etapa;
- 10) Entre a filtração de uma amostra e outra, o equipamento era limpo com o auxílio de esponja, solução detergente e exposto à solução de hipoclorito (mínimo de 5%), durante 20 min Após este período, era enxaguado abundantemente com água potável e depois com água destilada;
- 11) Antes de iniciar a filtração da próxima amostra, procedia-se a ambientação do aparelho com a própria.

Amostras de água de diluição foram utilizadas como branco, entre o processamento de uma amostra de água bruta e outra. Porém, como a água de diluição não apresentava material em suspensão para formar o "pellet" e a norma da USEPA não indica a utilização de coagulantes, optou-se por filtrar grandes volumes de água potável entre uma amostra e outra, além da limpeza descrita anteriormente.

#### 4.5.2 Eluição

Após a filtração, procedia-se a eluição. Os frascos contendo a solução eluente e as membranas eram postas num agitador (figura 4.4) a 180 rpm durante 8 horas, período suficiente para eluir as membranas.

A solução eluente era composta por 10 mL de Laureth 12 a 10% + 10 mL Tris 1M pH 7,4 + 2mL de EDTA 0,5M pH 8,0 + 150µL de anti-espumante Sigma + água reagente, até completar 1L.



Figura 4.4 - Agitador e tubos cônicos de centrifuga contendo membranas para eluição (este equipamento foi fabricado por técnicos da UFSC).

### 4.5.3 Concentração

A suspensão resultante da etapa de eluição era concentrada através de centrifugação (1050 g durante 15 min, em centrífuga Sorvall com rotor GSA), realizada no Centro de Biotecnologia da UFRGS.

### 4.5.4 Separação Imunomagnética (SIM)

Após a centrifugação, os (oo)cistos presentes nos “pellets” formados pelas amostras eram separados das outras partículas através do processo de separação imunomagnética (SIM).

Este procedimento era feito sobre a bancada com todos os materiais à temperatura ambiente (de 15° a 25°C). O material utilizado nesta etapa é encontrado no kit Dynabeads GC-Combo®, Dynal cat. no. 730.02.

Etapas da SIM:

- 2) Em um tubo de ensaio com o lado achatado (tubos Dynal® L10) era adicionado 1 mL de tampão-A e 1 mL de tampão-B (Dynal A.S.), mais a amostra de água concentrada por centrifugação, 100µL do Dynabeads Crypto-Combo e 100µL do Dynabeads *Giardia*-Combo;
- 3) O tubo de amostra era fixado em um agitador, marca FANEM, modelo 145, por aproximadamente 1 hora a 60 rpm, à temperatura ambiente;
- 4) Após a agitação, o tubo de ensaio era removido, colocado no concentrador magnético de partículas (MPC®-1, Dynal A.S.) com o lado achatado voltado para o campo magnético;
- 5) O tubo era movimentado, suavemente, para cima e para baixo, afim de que as partículas magnéticas se concentrassem na parte achatada. Em seguida, o sobrenadante era descartado;
- 6) O tubo era então, removido do MPC-1, e a amostra concentrada era ressuspensa em 1 mL do tampão-A (diluído 1:10);
- 7) A suspensão resultante era transferida para um tubo de microcentrífuga com capacidade para 1,5 mL, posicionado no concentrador de partícula magnética (MPC®-M, Dynal S.A.) e o ímã colocado no lugar. O ímã com o tubo era girado completamente (180°) por aproximadamente 1 min Ao final deste processo, as partículas magnéticas se fixavam na parte posterior do tubo;
- 8) O sobrenadante era aspirado, mantendo-se o tubo no ímã.;
- 9) Na seqüência o ímã era removido, eram adicionados 180 µL de 0,1 N HCl e o tubo agitado vigorosamente durante 10 a 15 seg.;
- 10) O material estava pronto para proceder à coloração;
- 11) Para cada coloração eram retirados 30 µL de cada amostra, empregando-se micropipeta.

#### 4.5.5 Coloração da amostra

Após a purificação dos (oo)cistos, o procedimento padrão para todas as colorações era o seguinte:

- 1) O tubo de microcentrífuga era colocado no MPC-M sem o ímã no lugar, em posição vertical por, no mínimo, 10 min à temperatura ambiente. Depois, agitado vigorosamente por 5 a 10 s;
- 2) A faixa magnética era recolocada no MPC-M e o tubo de pé, sem provocar nenhum distúrbio, por aproximadamente 10s;
- 3) Sem remover o tubo de microcentrífuga do MPC-M, eram pipetados 10µL para cada poço, fazendo-se três repetições para cada amostra.

Em seguida, procediam-se as colorações da amostra, as quais eram feitas com o corante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) e metodologias propostas por De Carli (2001) e De Carli & Moura (2001).

## Metodologias de coloração

Foram utilizadas três metodologias para a detecção de *Cryptosporidium* e três para detecção de *Giardia*, visando à comparação dos métodos entre si, além da utilização das demais metodologias como controle para possíveis falsos positivos/negativos da Imunofluorescência.

O corante DAPI, que é utilizado na Imunofluorescência, permite visualizar cistos e oocistos concomitantemente. O Kinyoun e a Safranina permitem a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* e o Iodo Lugol e Iodo Tricrômico, cistos de *Giardia*.

Todas as soluções de coloração eram preparadas no Laboratório de Saneamento do IPH, de acordo com metodologias propostas pelos Estados Unidos (1999) para a utilização do DAPI e segundo indicações de De Carli (2001) e De Carli & Moura (2001), para os demais corantes.

A técnica de Imunofluorescência era sempre a primeira a ser realizada, por exigência dos prazos previstos no método 1623 da USEPA. Sendo as outras quatro realizadas no decorrer do mês, sempre que possível, antes da próxima coleta. As descrições das metodologias de coloração encontram-se anexo.

A seguir são apresentadas fotomicrografias de cistos e oocistos detectados com as colorações utilizadas neste trabalho. A figura 4.5. apresenta oocistos de *Cryptosporidium* sp e cistos de *Giardia* sp corados com DAPI e vistos ao microscópio de imunofluorescência com aumento de 400x. As figuras 4.6 e 4.7 apresentam oocistos de *Cryptosporidium* sp corados com Kinyoun e Safranina, respectivamente, vistos ao microscópio óptico com aumento de 1000x e, finalmente, as figuras 4.8 e 4.9 apresentam cistos de *Giardia* sp corados com Iodo Lugol e Iodo Tricrômico, respectivamente, vistos ao microscópio óptico com aumento de 400x.

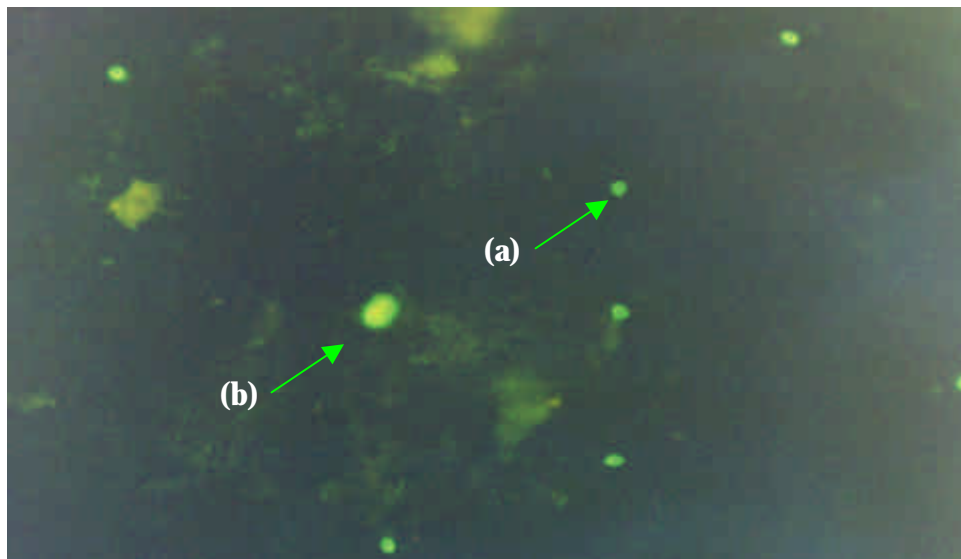


Figura 4.5 – Fotomicrografia de (a) oocistos de *Cryptosporidium* sp e (b) cistos de *Giardia* sp corados com DAPI (400x) (Fonte: Vieira, 2002).

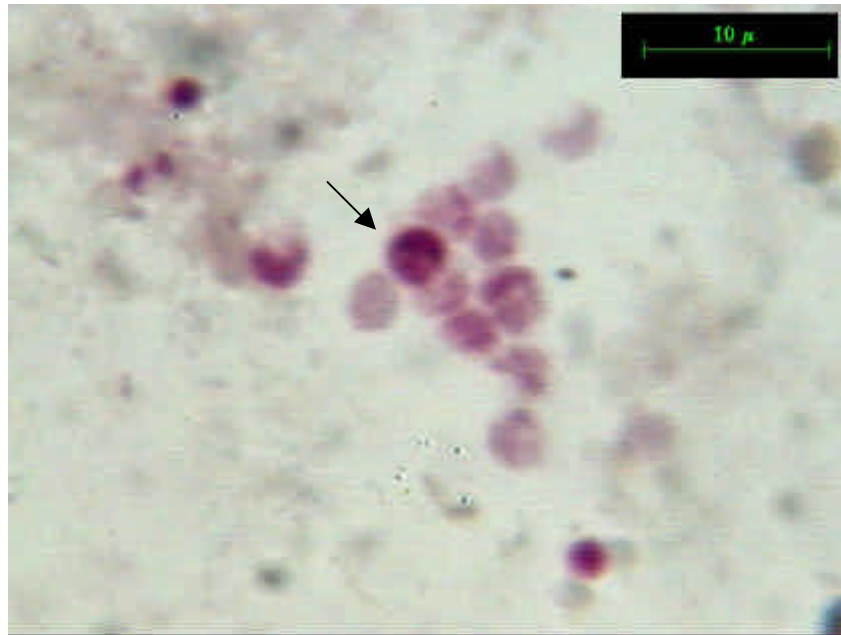


Figura 4.6 - Fotomicrografia de oocistos de *Cryptosporidium* sp em amostra controle de kit Merifluor *Cryptosporidium*/*Giardia* (Meridian Diagnostic, cat. no. 250050), corados com Kinyoun (aumento 1000x).

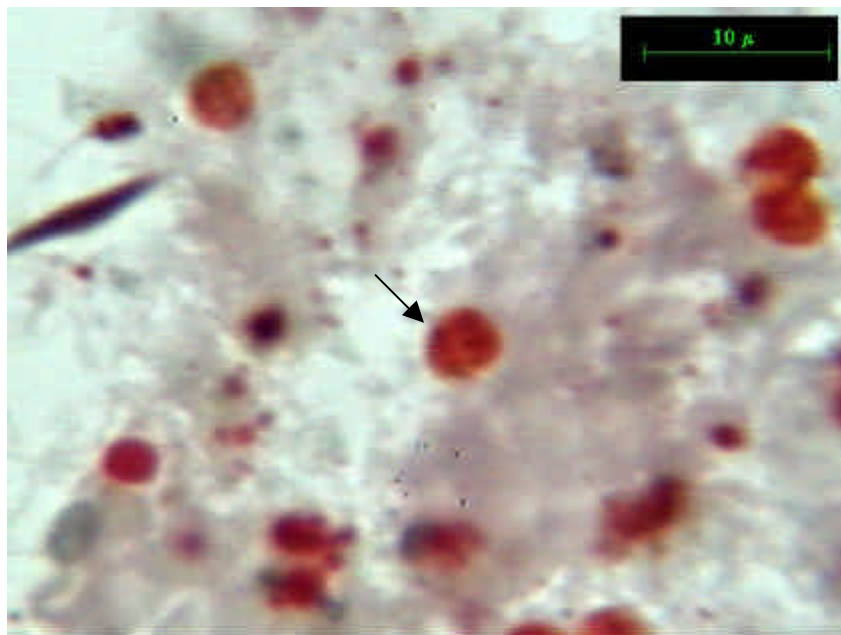


Figura 4.7 - Fotomicrografia de oocistos de *Cryptosporidium* sp em amostra controle de kit Merifluor *Cryptosporidium*/*Giardia* (Meridian Diagnostic, cat. no. 250050), corados com Safranina (aumento 1000x).





Figura 4.8 - Fotomicrografia de cistos de *Giardia* sp em amostra controle de kit Merifluor *Cryptosporidium*/*Giardia* (Meridian Diagnostic, cat. no. 250050), corados com Iodo Lugol (400x).

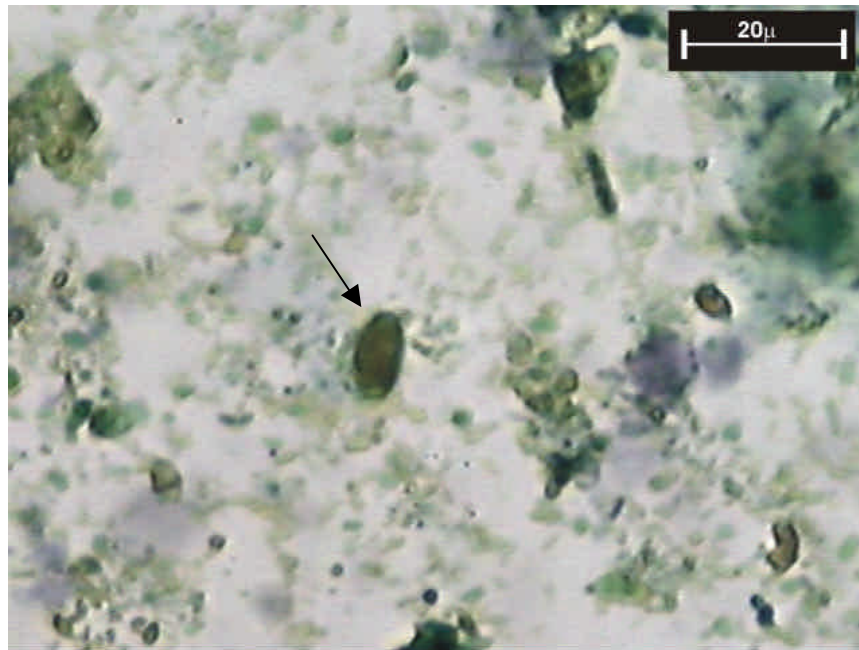


Figura 4.9 – Fotomicrografia de cistos de *Giardia* sp em amostra controle de kit Merifluor *Cryptosporidium*/*Giardia* (Meridian Diagnostic, cat. no. 250050), corados com Iodo Tricrômico (aumento de 400x).

## 4.6 Expressão dos resultados

Para a quantificação dos (oo)cistos encontrados com cada coloração utilizou-se a seguinte fórmula:

$$Ra = (a * b / c) * 2 \text{ (Eq. 01).}$$

Onde:

Ra = Resultado de recuperação da amostra;

a = quantidade de (oo)cistos encontrados nas três lâminas;

b = volume do "pellet" purificado;

c = volume da amostra na lâmina;

\* 2 => porque os resultados de contagens de (oo)cistos de protozoários em amostras de água são expressos como sendo (oo)cistos/100L e o material purificado era resultado da filtração de 50 L.

## 4.7 Controles

A seguir, são descritas as formas de controle do aparelho de filtração e colorações. Foram realizados controles positivos e negativos para ambos.

### 4.7.1 Das colorações

Para verificar o funcionamento das colorações, uma lâmina controle positiva e outra negativa eram preparadas juntamente com o material das amostras e observadas ao microscópio. Estas lâminas eram montadas com os materiais para controle que vêm no kit Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* (Meridian Diagnostic, cat. no. 250050). As lâminas controle de todas as colorações eram montadas com este material.

#### 4.7.2 Do aparelho de filtração

Para verificar a performance do aparelho foram feitas análises de recuperação de (oo)cistos, com uma das matrizes de água bruta.

Considerando os resultados prévios das análises estatísticas (teste de hipóteses), realizadas com os dados das variáveis ambientais das matrizes de águas dos quatro rios, onde o Rio dos Sinos não diferiu significativamente de nenhum dos outros três (Taq-Sinos  $P=0,1$ ; Caí-Sinos  $P=0,2$  e Gravataí-Sinos  $P=0,3$ ), optou-se assim, por usar a água deste afluente como controle para os índices de recuperação.

O método 1623 recomenda que o teste de recuperação seja realizado com amostras de 10L de água inoculadas com 100 a 500 (oo)cistos. Foram feitos testes prévios e observou-se que o aparelho tem capacidade de detectar microrganismos, mesmo em concentrações de 2,0/L. Desta forma, optou-se para fazer o teste com estas concentrações.

A matriz de água foi pré-filtrada no mesmo tipo de membrana regularmente utilizada para filtrar as amostras (mistura de ésteres, 47 mm de diâmetro e 1,2  $\mu\text{m}$  de porosidade), para ter a segurança de que os microrganismos presentes seriam retirados, obtendo-se assim uma matriz sem contaminação com *Cryptosporidium* e *Giardia*. Foram realizadas três repetições em amostras de 50L contendo 100 (oo)cistos.

Os (oo)cistos utilizados nesta etapa foram adquiridos da empresa Biotechfrontiers, Austrália, num kit denominado "Easy-Seed", aonde cada alíquota já vem preparada com 100 unidades.

As amostras inoculadas foram processadas (filtradas, eluídas, centrifugadas, purificadas, coradas e examinadas) e o percentual de recuperação de microrganismos computado, aplicando-se a equação abaixo:

$$I_r = 100 * \frac{N_d}{N_i} \quad (\text{Eq. 02})$$

Onde:

IR é o resultado percentual do índice de recuperação

Nd é o número de oocistos ou cistos detectados na amostra inoculada

Ni é o valor real de cistos e oocistos inoculados

A tabela 4.6 exhibe as percentagens de detecção alcançadas no teste de calibração do aparelho, sendo que os resultados alcançados, para ambos os microrganismos, estão dentro do exigido pelo método 1623 (média entre 13 -111 % para *Cryptosporidium* e 15 a 118% para *Giardia*).

Tabela 4.6 - Percentagens médias de recuperação de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp com as diferentes técnicas de detecção (teste de calibração).

<i>Cryptosporidium</i> sp	Imunofluorescência	18 %
	Kinyoun	17 %
	Safranina	10 %
<i>Giardia</i> sp	Imunofluorescência	22 %
	Iodo Lugol	20 %
	Iodo Tricrômico	20 %

Estes percentuais de recuperação foram utilizados para corrigir os valores de microrganismos encontrados em todas as amostras avaliadas, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$Rf = Ra * \frac{100}{IR} \quad (\text{Eq. 03})$$

Onde:

Rf = Resultado final

Ra = Resultado de recuperação da amostra

Ir= Índice percentual de recuperação do aparelho

## 4.8 Análises das variáveis físico-químicas e biológicas

Com o objetivo de avaliar a existência de possíveis relações causa e efeito entre variáveis ambientais e a ocorrência dos microrganismos em estudo, além das variáveis constantes no IQA aplicado pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental: turbidez, sólidos totais, pH, OD, DBO<sub>5</sub> (5 dias a 20° C), NTK, fósforo total e coliformes fecais, também foram considerados os parâmetros temperatura, DQO, UV 254, condutividade e vazão dos rios.

As variáveis ambientais temperatura, pH e condutividade eram medidas "in loco" com o auxílio da sonda YSI (modelo XL 600) ou Hydrolab (modelo Quanta). As coletas e análises das demais variáveis foram feitas segundo o Standard Methods for the Examination of Water and wastewater - APHA (1998). Todos os procedimentos foram feitos no Laboratório de Saneamento do Instituto de Pesquisas Hidráulicas da UFRGS. A tabela 4.7 apresenta a relação dos métodos analíticos empregados.

Tabela 4.7 - Variáveis ambientais e técnicas analíticas empregadas.

<b>Variáveis ambientais</b>	<b>Unidade</b>	<b>Técnica Analítica</b>	<b>Limite de detecção</b>
Temperatura	°C	Medição direta (sonda)	0,1°C
Turbidez	UNT	Nefelométrica (turbidímetro Micronal B250)	0,02 UNT
Sólidos totais	mg/L	Gravimetria (secos de 103 a 105 °C)	0,002 mg/L
pH		Medição direta (sonda)	0,1 unidade de pH
UV 254	cm <sup>-1</sup>	Espectrofotometria (aparelho marca Varian)	
Condutividade	µS/cm	Medição direta (sonda)	µS/cm
OD	mg/L	Winckler azida sódica modificada	0,1 mg/L
DBO <sub>5</sub>	mg/L	Frascos padrões	0,1 mg/L
DQO	mg/L	Kit Merk	4,0 mg/L
NTK	mgN/L	Macro Kjeldahl	<1 mg/L
Fósforo total	mg PO <sub>4</sub> /L	Ácido ascórbico	0,002 mg/L
C. fecais/ <i>E.coli</i>	NMP/100 mL	Cromogênico	1cf/100mL

## 4.9 Metodologias de análises estatísticas dos dados

Neste item, são citados os métodos estatísticos utilizados para as análises dos dados obtidos, ao longo dos doze meses de pesquisa. Inicialmente, com base nos dados resultantes das análises físico-químicas e biológicas (coliformes fecais/*E.coli*), comparou-se os quatro rios entre si com o objetivo de avaliar as diferenças no que diz respeito à qualidade de água. Em seguida, em cumprimento ao primeiro objetivo da pesquisa, os rios foram avaliados individualmente quanto à quantidade de microrganismos detectados, utilizando-se alguns elementos da estatística não paramétrica como ANOVA para obter a média aritmética e coeficiente de variação.

A comparação dos distintos métodos de detecção, que era o segundo objetivo do trabalho, foi o passo seguinte. Observou-se, ainda, a ocorrência de sazonalidade dos microrganismos *Cryptosporidium* e *Giardia*, em cada um dos rios. Nesta etapa, assim como nas duas anteriores, foram aplicados instrumentos de análise multivariada como testes de hipóteses com aleatorização (Pillar, 2001), nos quais as probabilidades foram geradas em 10.000 iterações de auto-reamostragem, considerando como limiar um  $\alpha = 0,05$  para a sua interpretação, onde  $\alpha$  é o complemento do limite de confiança de 95%. A medida de semelhança utilizada entre as unidades amostrais foi a distância euclidiana, que, segundo Valentin (2000), é uma das mais conhecidas e utilizadas para comparação entre amostras.

Finalmente, o terceiro objetivo visava avaliar a existência de relação entre a ocorrência dos microrganismos e as variáveis ambientais Temperatura, Turbidez, Sólidos Totais, pH, UV 254, Condutividade, OD, DBO<sub>5</sub>, DQO, Nitrogênio Total, Fósforo Total, Vazão e Coliformes fecais/*E.coli*, sendo alcançado utilizando-se como ferramenta o coeficiente de correlação linear  $r$  de Pearson, por ser um dos mais aplicados para quantificar a dependência linear entre duas variáveis heterogêneas (Valentin, 2000).

Foram utilizadas também as análises de regressão simples e múltipla, visando determinar modelos matemáticos que explicassem a ocorrência dos microrganismos em função das variáveis ambientais. Segundo a literatura, as variáveis que podem interferir na ocorrência dos microrganismos são: temperatura, turbidez, sólidos totais, pH, vazão e coliformes fecais/*E.coli*. Os testes para este fim, foram realizados individualmente em cada rio e, depois de comparar os

quatro rios, agrupou-se os três que, segundo as análises, eram semelhantes entre si e, novamente, submeteu-se os dados aos mesmos testes.

Os programas utilizados para a realização das análises foram o MULTIV (2.1) (Pillar, 2001), PAST (Hammer et al., 2003) e o pacote SPSS versão 12.0.

## 5 RESULTADOS

Os resultados estão estruturados de acordo com os objetivos propostos no trabalho. Antes porém, comparou-se os quatro rios entre si, com base nos dados de qualidade da água. A seqüência de apresentação é a seguinte:

- 1) Indicação das concentrações de microrganismos detectadas em cada rio, em forma de tabelas, na seqüência Taquari, Cai, Sinos e Gravataí; as tabelas estão estruturadas exibindo os resultados médios, máximos, mínimos com cada coloração (primeiro as colorações usadas para a detecção de *Cryptosporidium* e depois, aquelas utilizadas para *Giardia*);
- 2) Comparação entre as colorações para cada microrganismo em cada rio;
- 3) Observação da ocorrência de sazonalidade para cada microrganismo em cada rio;
- 4) Avaliação das associações entre a ocorrência dos microrganismos e as variáveis ambientais, estruturadas em tabelas de índices de correlação e apresentação de modelos matemáticos resultantes das análises de regressão simples e múltipla, baseadas em análises de variância.
- 5) Após a apresentação dos resultados individualizados dos afluentes do Guaíba em estudo, foram exibidos os dados obtidos com a junção dos três rios que não apresentaram diferenças significativas entre si: Taquari, Cai e Sinos.
- 6) Os resultados das análises dos parâmetros de qualidade de água obtidos em cada coleta encontram-se anexo.



A tabela 5.1 exibe o resultado do teste de hipóteses com aleatorização, onde foram detectadas diferenças significativas entre os rios ( $P=0,0431$ ). Analizando-a, percebe-se que a comparação dos rios dois a dois, exibe diferença apenas entre os Rios Taquari e Gravataí ( $P=0,0155$ ) e Caí e Gravataí ( $P=0,0495$ ). O Rio dos Sinos assumiu uma posição intermediária entre os quatro cursos d'água, não diferindo significativamente de nenhum deles.

Tabela 5.1 - Teste de hipóteses com aleatorização entre os quatro rios com dados de qualidade de água obtidos durante o período compreendido entre agosto/2002 e julho 2003.

Fonte de variação : <b>Rio</b>	Soma de quadrados(Q)	P( $Q_b^\circ = Q_b$ )
Entre grupos	0,033592	<b>0,0431</b>
Contrastes		
Taquari – Caí	0,00099105	0,7802
Taquari – dos Sinos	0,01254200	0,1008
Taquari -Gravataí	0,02271100	<b>0,0155</b>
Caí – dos Sinos	0,00779490	0,2271
Caí – Gravataí	0,01837000	<b>0,0495</b>
dos Sinos - Gravataí	0,00477510	0,3600

Devido a estes resultados, optou-se também, por agrupar os rios em função das suas similaridades em termos de qualidade, ficando assim o primeiro bloco constituído pelos rios Taquari, Caí e dos Sinos e o segundo pelo Rio Gravataí.

## 5.1 Rio Taquari

O ponto de coleta deste rio localizava-se na cidade de General Câmara, próximo ao km 04 (em relação à foz), sendo o primeiro dos quatro a ser amostrado e onde se conseguiu detectar a maior quantidade de microrganismos.

### 5.1.1 Microrganismos: concentrações detectadas, comparação entre colorações e sazonalidade

Os resultados obtidos ao longo dos doze meses de análises do Rio Taquari estão sumarizados na tabela 5.2, onde se pode observar que os valores mínimos de detecção foram **zero** para todas as técnicas, indicando haver pelo menos um mês em que não houve detecção com cada uma delas. Os valores máximos observados foram de 383, 88 e 150 oocistos/100L com as técnicas de Imunofluorescência, Kinyoun e Safranina, respectivamente; e 314, 600 e 605 cistos/100L com Imunofluorescência, Iodo Lugol e Iodo Tricrômico.

A Imunofluorescência foi a técnica com a qual obteve-se maior média de detecção de oocistos, sendo que os valores médios observados com Kinyoun e Safranina foram muito próximos. Para a coloração de cistos, o Iodo Lugol foi a que apresentou maior média de detecção, seguida do Iodo Tricrômico e da Imunofluorescência. O coeficiente de variação foi de 189% para *Cryptosporidium* e 127% para *Giardia*.

Tabela 5.2 - Detecção de (oo)cistos nas águas brutas do Rio Taquari, utilizando Imunofluorescência, Kinyoun, Safranina, Iodo Lugol e Iodo Tricrômico.

	<i>Cryptosporidium</i> sp /100 L de água			<i>Giardia</i> sp /100 L de água		
	Método de detecção			Método de detecção		
	Imuno	Kinyoun	Safranina	Imuno	Lugol	Tricrômico
Média aritmética	80	20	23	119	176	156
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Máximo	383	88	150	314	600	605

As figuras 5.1 e 5.2 exibem as concentrações de oocistos e cistos detectados em cada mês do período amostral, onde se pode ver que o *Cryptosporidium* foi detectado em nove (75%) e a *Giardia* em onze dos doze meses avaliados (91, 6%).

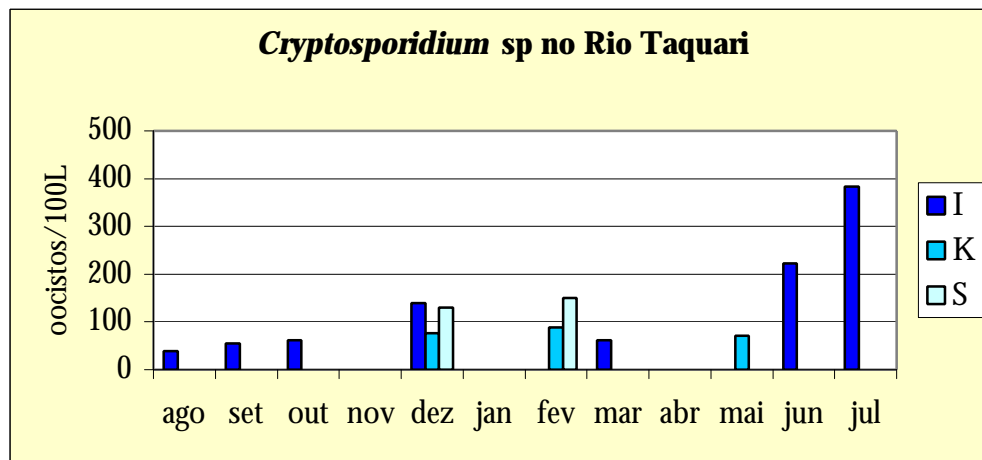


Figura 5.1 - Oocistos de *Cryptosporidium* sp no Rio Taquari detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Kinyoun (K) e Safranina (S) entre agosto/2002 e julho/2003.

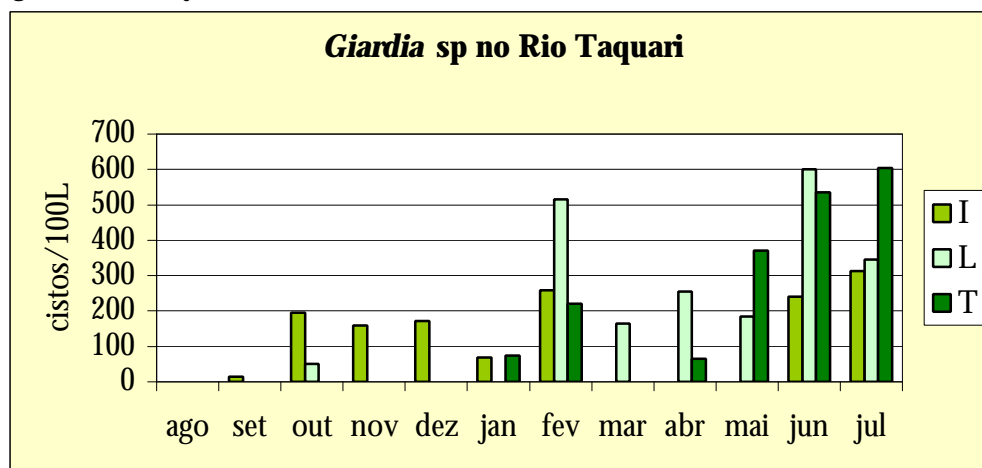


Figura 5.2 - Cistos de *Giardia* sp no Rio Taquari detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Iodo Lugol (L) e Iodo Tricrômico (T) entre agosto/2002 e julho/2003.

O percentual de detecção variou, conforme descrito a seguir:

- Para oocistos:
  - 50 % somente com a técnica de Imunofluorescência
  - 8,3% somente com Kinyoun
  - 8,3% com Kinyoun e Safranina
  - 8,3 % com as três técnicas simultaneamente e
  - 25% sem detecção com nenhuma das técnicas.

- Para cistos:

- 25% somente com Imunofluorescência
- 8,3% somente com Iodo Lugol
- 8,3% com Imunofluorescência e Iodo Lugol
- 8,3% com Imunofluorescência e Iodo Tricrômico
- 16,6 % com Iodo Lugol e Iodo Tricrômico
- 25% com as três técnicas concomitantemente
- 8,3% sem detecção com nenhuma das técnicas.

Verifica-se os meses de dezembro, fevereiro, junho e julho (2003) foram onde ocorreram as maiores detecções de oocistos, e que os meses onde ocorreram as maiores concentrações de cistos foram fevereiro, junho e julho, com as três técnicas ao mesmo tempo.

De uma forma geral, observa-se que houve uma grande variação na detecção dos microrganismos ao longo do período amostral, independente da técnica de coloração utilizada. Aparentemente, para oocistos, a técnica que melhor funcionou foi a Imunofluorescência, exibindo além de maior percentual de detecção, maior número de estruturas biológicas (tabela 5.3). Porém, o teste de hipóteses com aleatorização não indicou diferença significativa entre as colorações ( $P=0,0954$ ), o mesmo ocorrendo com as colorações utilizadas para cistos ( $P= 0,7572$ ).

Não foi detectada sazonalidade na ocorrência de *Cryptosporidium* nas águas do Rio Taquari. As análises estatísticas não detectaram diferença entre os meses durante o período avaliado ( $P=0,4511$ ), mas para a *Giardia* este fenômeno foi observado, a análise de variância com aleatorização indicou diferença significativa entre alguns meses ( $P=0,001$ ), a tabela 5.3 exibe os valores dos contrastes significativos entre os meses.

Tabela 5.3 - Resultado do teste de hipóteses para diferença entre os meses em relação ao microrganismo *Giardia* sp no Rio Taquari (valores de contrastes significativos).

Fonte de variação: <b>Mês</b>	Soma de quadrados (Q)	P (Qb° =Qb)
Entre meses	8,7181e+05	0,001
Contrastes:		
ago-fev	1,6467e+05	0,0275
ago-jun	3,1556e+05	0,0015
ago-jul	2,6628e+05	0,0040
set-fev	1,6007e+05	0,0270
set-jun	3,0917e+05	0,0031
set-jul	2,6042e+05	0,0047
out-jun	2,1319e+05	0,0125
out-jul	1,7306e+05	0,0267
nov-jun	2,4685e+05	0,0068
nov-jul	2,035e+05	0,0160
dez-jun	2,412e+05	0,0075
dez-jul	1,9838e+05	0,0164
jan-fev	1,207e+05	0,0670
jan-jun	2,5338e+05	0,0091
jan-jul	2,0944e+05	0,0129
mar-jun	2,4442e+05	0,0065
mar-jul	2,013e+05	0,0172
abr-jun	1,8586e+05	0,0225
abr-jul	1,4852e+05	0,0420

### 5.1.2 Análises das correlações lineares e regressões múltiplas

Foram feitas análises, já referidas anteriormente, de diversas variáveis ambientais para observação da sua correlação com ocorrência dos microrganismos. A tabela 5.4 exibe os valores de correlações encontrados e em negrito encontram-se os valores significativos de P (probabilidade) e r (correlação).

Tabela 5.4 - Correlação linear entre o número de oocistos de *Cryptosporidium* sp e cistos de *Giardia* sp detectados e as variáveis ambientais analisadas no Rio Taquari.

Parâmetros		Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp			Cistos de <i>Giardia</i> sp		
		Imuno	Kinyoun	Safranina	Imuno	Lugol	Tricrômico
Temp.	r =	-0,408	0,344	0,507	0,004	0,119	-0,274
	P=	0,187	0,274	0,092	0,991	0,713	0,388
Turb.	r =	-0,197	<b>0,614</b>	<b>0,613</b>	0,087	-0,030	-0,249
	P=	0,539	<b>0,034</b>	<b>0,034</b>	0,787	0,926	0,436
Sólidos T	r =	-0,388	0,576	<b>0,704</b>	0,131	-0,022	-0,375
	P=	0,212	0,050	<b>0,011</b>	0,685	0,946	0,229
pH	r =	-0,145	0,293	0,567	-0,076	-0,497	<b>-0,651</b>
	P=	0,654	0,356	0,055	0,815	0,100	<b>0,022</b>
UV254nm	r =	-0,186	0,554	0,448	0,254	0,498	0,360
	P=	0,563	0,062	0,144	0,426	0,099	0,251
Condutiv.	r =	0,233	-0,191	-0,029	-0,022	0,177	0,069
	P=	0,466	0,551	0,928	0,945	0,583	0,831
OD	r =	0,569	-0,522	-0,353	0,296	0,592	0,516
	P=	0,054	0,082	0,261	0,350	0,042	0,086
DBO <sub>5</sub>	r =	0,262	0,085	-0,003	0,218	<b>0,771</b>	<b>0,606</b>
	P=	0,411	0,793	0,994	0,496	<b>0,003</b>	<b>0,037</b>
DQO	r =	0,065	0,181	0,077	-0,072	0,141	0,119
	P=	0,842	0,573	0,812	0,824	0,662	0,713
NTK	r =	-0,356	0,081	0,101	-0,485	-0,032	-0,367
	P=	0,256	0,802	0,754	0,110	0,921	0,241
Fósforo T	r =	-0,367	0,113	0,195	0,195	-0,381	-0,494
	P=	0,241	0,728	0,544	0,543	0,221	0,102
Vazão	r =	0,041	-0,80	-0,02	0,330	-0,370	-0,188
	P =	0,90	0,804	0,940	0,294	0,235	0,557
C.Fecais <i>E.coli</i>	r =	0,271	-0,184	-0,071	0,390	0,210	0,141
	P =	0,394	0,568	0,826	0,210	0,513	0,661

Observa-se que as variáveis que apresentaram correlação significativa (acima de 60%) com a ocorrência dos microrganismos foram: turbidez, sólidos totais, DBO<sub>5</sub> e pH.

O parâmetro turbidez aparece relacionado com *Cryptosporidium* quando detectado com Kinyoun e Safranina. A turbidez apresentou picos significativos nos meses de dezembro/2002 e fevereiro, março e maio/2003. O *Cryptosporidium* apresentou picos de detecção, com ambas as técnicas, nos meses de dezembro, fevereiro e um em maio com a técnica de Kinyoun. Aparece, então, a associação da turbidez com os microrganismos. A detecção com a Imunofluorescência ocorreu em um número maior de vezes, não aparecendo associada a nenhum parâmetro. O

*Cryptosporidium* detectado com Safranina apresentou, como dito anteriormente, dois picos nos meses de dezembro e fevereiro, tendo ocorrido picos de sólidos totais, também, na mesma época.

Nos meses de fevereiro e junho/2003, ocorreram os dois picos de DBO<sub>5</sub> mais expressivos no Rio Taquari, e foi justo nestes meses onde foram detectadas as maiores concentrações de *Giardia* com a técnica de Iodo de Lugol (figura 5.2). Foram também nos meses de fevereiro, maio, junho e julho, onde mais se detectou *Giardia* com Iodo Tricrômico, podendo haver também associação com a DBO<sub>5</sub>, como indica o resultado das correlações. Curiosamente, quando utilizada a técnica de Imunofluorescência para detecção de *Giardia*, não foi detectada nenhuma correlação do parâmetro com os microrganismos. Porém, observa-se que, embora também tenha picos nos meses de fevereiro e junho, o número de vezes em que se recuperou *Giardia* com Imunofluorescência foi bem maior que com as outras duas técnicas.

A *Giardia* também apresentou correlação negativa com o pH. Este parâmetro mostrou ligeira queda entre os meses de março e maio, período em que começou a ocorrer maior aumento de detecção com Iodo Tricrômico.

## Modelos matemáticos

Os modelos matemáticos obtidos com as análises de regressão múltiplas estão descritos a seguir:

$$\begin{aligned} \text{Densidade de oocistos de } & \textit{Cryptosporidium} = - 72,4 - 1,57 \text{ Temperatura} + 1,39 \text{ Turbidez} - 0,20 \\ \text{Sólidos Totais} + 17,97 \text{ pH} - 0,01 \text{ C. Fecais/} & \textit{E.coli} + 0,004 \text{ Vazão} \quad (\text{Eq. 04}) \\ (\text{F}=0,190; \text{P}=0,977; \text{R}= 0,195; \mathbf{R^2} = & \mathbf{0,038}). \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Densidade de cistos de } & \textit{Giardia} = 2334,7 - 2,33 \text{ Temperatura} + 0,869 \text{ Turbidez} + 0,875 \text{ Sólidos} \\ \text{Totais} - 307,8 \text{ pH} - 0,003 \text{ C. Fecais/} & \textit{E.coli} + 0,43 \text{ Vazão} \quad (\text{Eq. 05}) \\ (\text{F} = 2,171; \text{P} = 0,075 ; \text{R} = 0,557; \mathbf{R^2} = & \mathbf{0,310}). \end{aligned}$$

Observa-se que o valor de  $R^2$  para ambos os microrganismos foi muito baixo, indicando que, no Rio Taquari, a ocorrência dos microrganismos não é função dos parâmetros avaliados.

## 5.2 Rio Caí

Este afluente era amostrado na cidade de Montenegro, próximo ao km 14, em relação à foz. Depois do Rio Taquari, foi onde se verificou maior quantidade de *Cryptosporidium* e *Giardia*.

### 5.2.1 Microrganismos: concentrações detectadas, comparação entre colorações e sazonalidade

Para todas as técnicas o valor mínimo observado foi **zero**, indicando não detecção em pelo menos um dos meses, com cada uma das técnicas. Os valores máximos foram de 222 e 400 oocistos/100L com as técnicas de Imunofluorescência e Safranina e 241, 200 e 250 cistos/100L com as técnicas de Imunofluorescência, Iodo Lugol e Iodo Tricrômico, respectivamente.

Observa-se que não ocorreu detecção com a técnica de Kinyoun, mas as médias obtidas com as duas outras técnicas foram próximas, embora tenha ocorrido em apenas um dos meses com a Safranina e sendo este o máximo valor detectado também. Os valores médios obtidos com as técnicas utilizadas para a *Giardia* foram próximos. O coeficiente de variação foi de 299% para *Cryptosporidium* e 132% para *Giardia*. Os valores de detecção obtidos com as técnicas utilizadas para ambos os microrganismos no Rio Caí estão expostos na tabela 5.5.



Tabela 5.5 - Detecção de (oo)cistos nas águas brutas do Rio Cai, utilizando Imunofluorescência, Kinyoun, Safranina, Iodo Lugol e Iodo Tricrômico.

	<i>Cryptosporidium</i> sp /100 L de água			<i>Giardia</i> sp /100 L de água		
	Método de detecção			Método de detecção		
	Imuno	Kinyoun	Safranina	Imuno	Lugol	Tricrômico
Média aritmética	47	0	33	58	66	59
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Máximo	222	0	400	241	250	200

As figuras 5.3 e 5.4 exibem as concentrações de oocistos e cistos detectados em cada mês do período amostral, onde se pode ver que o *Cryptosporidium* foi detectado em 5 (41,6 %) e a *Giardia* em dez (83,3%) dos doze meses avaliados.

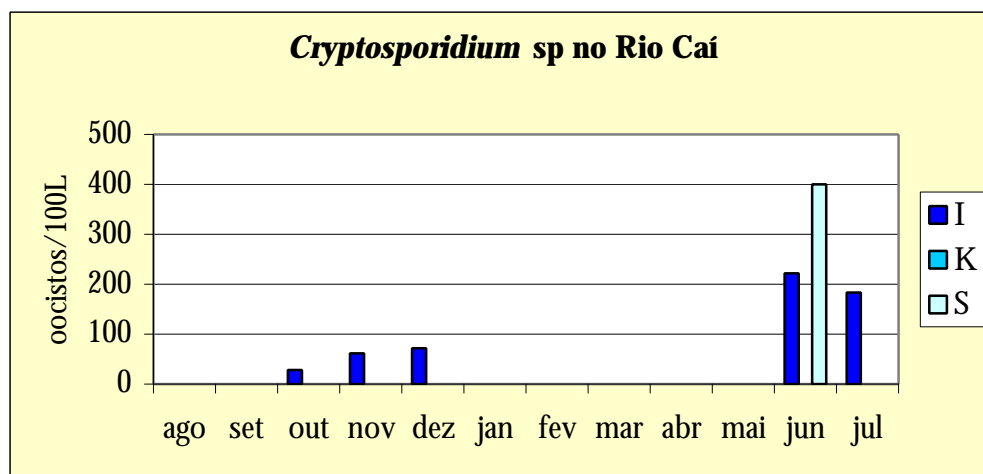


Figura 5.3 - Oocistos de *Cryptosporidium* sp no Rio Cai detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Kinyoun (K) e Safranina (S) entre agosto/2002 e julho/2003.

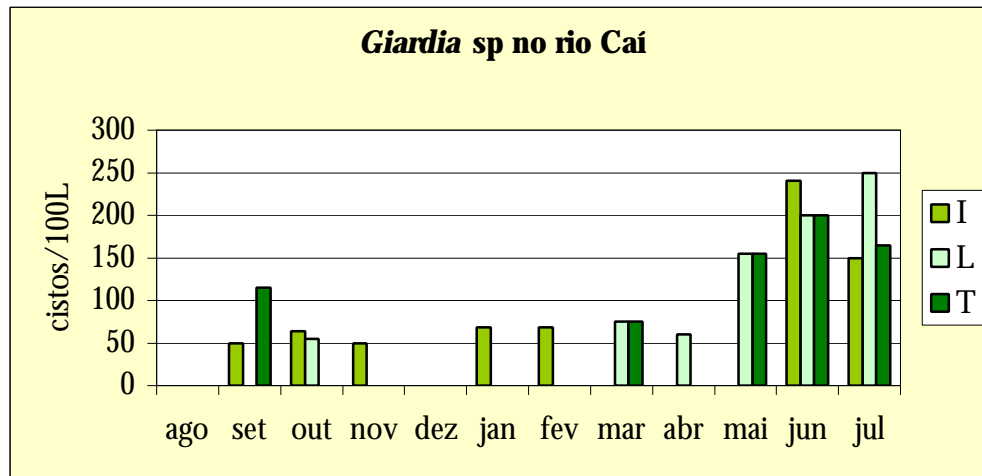


Figura 5.4 - Cistos de *Giardia* sp no Rio Cai detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Iodo Lugol (L) e Iodo Tricrômico (T) entre agosto/2002 e julho/2003.

O percentual de detecção variou conforme descrito a seguir:

- Para oocistos:
  - 33,3% somente com a técnica de Imunofluorescência
  - 8,3% com Safranina e Imunofluorescência, concomitantemente.
  - 58,3% sem detecção com nenhuma das técnicas
  
- Para cistos:
  - 25% somente com Imunofluorescência
  - 8,3% somente com Iodo Lugol
  - 8,3% com Imunofluorescência e Iodo Lugol
  - 8,3% com Imunofluorescência e Iodo Tricrômico
  - 16,6% com Iodo Lugol e Iodo Tricrômico
  - 16,6% com as três técnicas ao mesmo tempo
  - 16,9% sem detecção com nenhuma das técnicas.

Os meses de maior quantidade de detecção de oocistos foram junho e julho e de cistos foram maio, junho e julho.

Neste afluente, como no anterior, aparentemente a técnica de Imunofluorescência foi a que melhor funcionou para a detecção dos microrganismos, porém as análises estatísticas não evidenciaram diferença significativa entre as colorações para *Cryptosporidium* ( $P=0,3741$ ) e tampouco para *Giardia* ( $P=0,9611$ ).

Não foi detectada sazonalidade na ocorrência de *Cryptosporidium* no Rio Caí. As análises estatísticas não evidenciaram diferença significativa entre os meses durante o período avaliado ( $P=0,0642$ ), ficando na verdade no limite de aceitação (onde o  $\alpha$  é = 0,05). Mas, assim como no rio anteriormente comentado, neste, o teste de hipóteses indicou diferença significativa entre os meses em relação à *Giardia* sp ( $P=0,001$ ), indicando ocorrência de sazonalidade para este microrganismo. A tabela 5.6 exhibe os valores dos contrastes significativos.

Tabela 5.6. - Resultado do teste de hipóteses para diferença entre os meses em relação ao microrganismo *Giardia* sp no Rio Caí (valores de contrastes significativos).

Fonte de variação: <b>Mês</b>	Soma de quadrados(Q)	P( $Q_b^{\circ} = Q_b$ )
Entre grupos	$1,6786 \times 10^5$	0,001
Contrastes:		
ago-jun	68480	0,0008
ago-jul	53204	0,0018
set-jun	37763	0,0113
set-jul	26667	0,0366
out-jun	45414	0,0046
out-jul	33153	0,0159
nov-jun	58213	0,0019
nov-jul	44204	0,0062
dez-jun	68480	0,0005
dez-jul	53204	0,0019
jan-jun	54721	0,0026
jan-jul	41168	0,0088
fev-jun	54721	0,0017
fev-jul	41168	0,0088
mar-jun	40180	0,0106
mar-jul	28704	0,0329
abr-jun	56260	0,0026
abr-jul	42504	0,0092

## 5.2.2 Análises das correlações lineares e regressões múltiplas

A tabela 5.7 exhibe os valores de correlação (r) e probabilidade (P) entre as variáveis ambientais analisadas e a ocorrência dos microrganismos no Rio Cai.

Tabela 5.7 - Correlação linear entre o número de (oo)cistos detectados e variáveis ambientais analisadas no Rio Cai.

Parâmetros		Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp			Cistos de <i>Giardia</i> sp		
		Imuno	Kinyoun	Safranina	Imuno	Lugol	Tricrômico
Temp.	r =	-0,427	-	-0,314	-0,285	-0,424	-0,506
	P=	0,167	-	0,320	0,370	0,169	0,093
Turbidez	r =	-0,181	-	-0,223	-0,262	-0,419	-0,527
	P=	0,574	-	0,486	0,410	0,175	0,078
ST	r =	-0,030	-	-0,030	-0,076	-0,228	-0,488
	P=	0,926	-	0,927	0,815	0,477	0,108
pH	r =	-0,334	-	-0,241	-0,257	-0,234	0,137
	P=	0,289	-	0,451	0,421	0,465	0,670
Condutiv.	r =	<b>0,623</b>	-	<b>0,679</b>	<b>0,724</b>	<b>0,638</b>	0,397
	P=	<b>0,030</b>	-	<b>0,015</b>	<b>0,008</b>	<b>0,025</b>	0,202
UV254nm	r =	-0,306	-	-0,107	0,030	-0,503	-0,460
	P=	0,333	-	0,741	0,925	0,096	0,132
OD	r =	0,407	-	0,461	0,275	<b>0,728</b>	<b>0,657</b>
	P=	0,190	-	0,132	0,388	<b>0,007</b>	<b>0,020</b>
DBO <sub>5</sub>	r =	0,574	-	0,468	0,571	<b>0,871</b>	0,928
	P=	0,051	-	0,125	0,053	<b>0,000</b>	1,310
DQO	r =	0,227	-	0,122	0,120	0,452	0,231
	P=	0,479	-	0,706	0,709	0,140	0,470
NTK	r =	-0,465	-	-0,106	-0,325	<b>-0,613</b>	-0,344
	P=	0,128	-	0,742	0,302	<b>0,034</b>	0,274
Fósforo T	r =	-0,169	-	-0,287	-0,176	-0,403	-0,539
	P=	0,601	-	0,366	0,583	0,194	0,071
Vazão	r =	0,094	-	0,018	-0,000	-0,303	-0,361
	P=	0,772	-	0,956	0,999	0,338	0,248
C.Fecais <i>E.coli</i>	r =	-0,115	-	0,017	-0,146	-0,448	-0,303
	P=	0,721	-	0,958	0,650	0,144	0,339

Analisando a tabela 5.7, vê-se que as variáveis que aparecem correlacionadas com os microrganismos são: condutividade, OD, DBO<sub>5</sub> e NTK.

Neste rio, a condutividade aparece relacionada a oocistos detectados com Imunofluorescência e Safranina e cistos com Imunofluorescência e Iodo Lugol. Verificando-se uma oscilação nos valores: aumenta um mês, diminui no próximo e assim sucessivamente. Talvez devido a esta oscilação, a relação seja sensível aos diversos picos de detecção, evidenciando assim, este resultado.

A *Giardia*, quando detectada com Iodo Lugol e Iodo Tricrômico, mostrou correlação com o OD. Esta variável não oscilou muito nos seis primeiros meses, mas aumentou a partir do sétimo mês, quando a coleta começou a ser feita na ETA de Montenegro. O fato de que as amostras eram coletadas na chegada da água bruta, onde havia grande movimentação da água, deve explicar o aumento de OD neste período. Como a detecção de *Giardia* com Iodo Lugol e Iodo Tricrômico também começou a aumentar a partir deste mês, a correlação provavelmente deve-se a isto.

Como no rio anteriormente descrito, aqui aparece relação entre  $DBO_5$  e *Giardia* detectada com Iodo Lugol. A partir do mês de fevereiro, quando houve aumento na detecção de *Giardia*, houve aumento de  $DBO_5$ .

A partir de fevereiro houve uma nítida queda na quantidade de NTK detectada e o oposto ocorreu com *Giardia* detectada com Iodo Lugol, daí então o resultado da correlação negativa.

Na verdade, de uma forma geral, o período que determinou as correlações foram os últimos seis meses da pesquisa, quando o número de microrganismos detectados aumentou sensivelmente. Esta observação serve, sobretudo, para a *Giardia*.

Os dois parâmetros avaliados na maioria dos trabalhos - coliformes e turbidez - não aparecem correlacionados com nenhum dos dois microrganismos, em nenhuma das situações de coloração neste rio.

## Modelos matemáticos

Os modelos matemáticos obtidos com as análises de regressão múltiplas estão descritos a seguir:

Densidade de oocistos de *Cryptosporidium* = 2241,8 - 3,24 Temperatura - 0,851 Turbidez - 0,067 Sólidos Totais - 292,9 pH + 0,006 C. Fecais/*E.coli* - 0,051 Vazão (Eq. 06)  
(F= 1,190; P= 0,339; R = 0,444; **R<sup>2</sup> = 0,198**).

Densidade de cistos de *Giardia* = 864,9 - 10,3 Temperatura - 0,826 Turbidez + 0,254 Sólidos Totais - 74,65 pH + 0,011 C. Fecais/*E.coli* - 0,040 Vazão (Eq. 07)  
(F = 4,402; P = 0,003; R = 0,477; **R<sup>2</sup> = 0,368**).

Pode-se observar que o valor de R<sup>2</sup> para ambos os microrganismos foi muito baixo, indicando que, no Rio Caí, a ocorrência dos microrganismos não é função dos parâmetros avaliados.

## 5.3 Rio dos Sinos

Este rio era amostrado na cidade de Canoas, próximo ao km 08, em relação à foz.

### 5.3.1 Microrganismos: concentrações encontradas, comparação entre colorações e sazonalidade

Neste afluente, a quantidade de oocistos detectados foi bem menor que nos anteriores, obtendo-se uma média de 19 oocistos/100L para os doze meses avaliados e apenas com a técnica da Imunofluorescência. O valor mínimo para todas as técnicas foi **zero** e o valor máximo foi de 94 oocistos/100L. A quantidade de cistos detectada foi bem maior que de oocistos. Os valores máximos foram de 150, 215 e 145/100L com Imunofluorescência, Iodo Lugol e Iodo

Tricrômico, respectivamente. O coeficiente de variação foi de 307% para *Cryptosporidium* e 154% para *Giardia*.

Tabela 5.8 - Detecção de (oo)cistos nas águas brutas Rio dos Sinos, utilizando Imunofluorescência, Kinyoun, Safranina, Iodo Lugol e Iodo Tricrômico.

	<i>Cryptosporidium</i> sp /100 L de água			<i>Giardia</i> sp /100 L de água		
	Método de detecção			Método de detecção		
	Imuno	Kinyoun	Safranina	Imuno	Lugol	Tricrômico
Média aritmética	19	0	0	24	53	40
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Máximo	94	0	0	150	215	145

As figuras 5.5 e 5.6 exibem as concentrações de oocistos e cistos detectados em cada mês do período amostral, onde se pode notar que o *Cryptosporidium* foi detectado em apenas quatro (33,3%) e a *Giardia* em oito (66,6%) do total de meses avaliados.

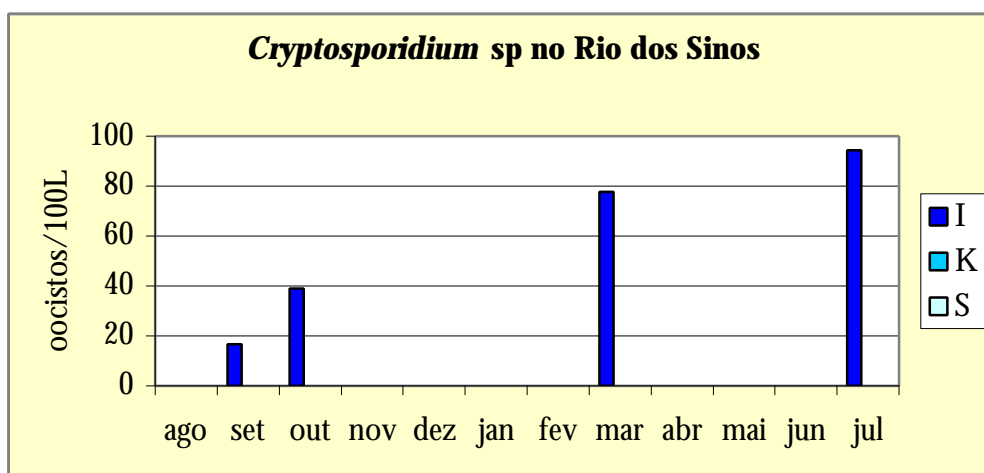


Figura 5.5 - Oocistos de *Cryptosporidium* sp no Rio dos Sinos detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Kinyoun (K) e Safranina (S) entre agosto/2002 e julho/2003.

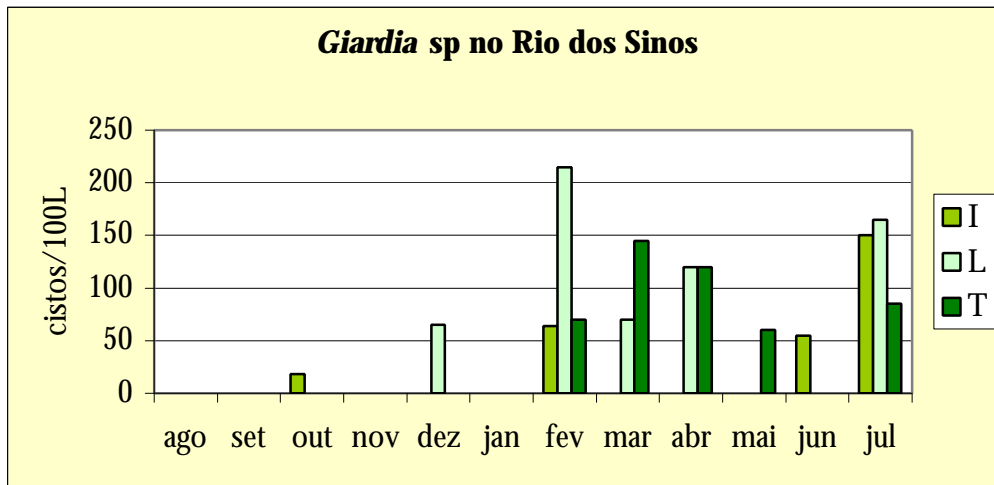


Figura 5.6 - Cistos de *Giardia* sp no Rio dos Sinos detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Iodo Lugol (L) e Iodo Tricrômico (T) entre agosto/ 2002 e julho/2003.

O percentual de detecção variou conforme descrito a seguir:

- Para oocistos:
  - 33,3% somente com Imunofluorescência
  - 66,6 % sem detecção com nenhuma das técnicas
  
- Para cistos:
  - 16,6% só com Imunofluorescência
  - 8,3% só com Iodo Lugol
  - 8,3% só com Iodo Tricrômico
  - 16,6% com Iodo Lugol e Iodo Tricrômico
  - 16,6% com as três técnicas simultaneamente
  - 33,6% sem detecção com nenhuma das técnicas.

Os meses onde ocorreram maiores detecções de oocistos foram março e julho e de cistos foram fevereiro, março, abril e julho.

Observando-se a figura 5.5, percebe-se que a detecção de oocistos foi significativamente inferior neste rio quando comparado aos anteriores, ocorrendo apenas com uma coloração. As análises estatísticas indicaram diferença significativa entre as técnicas de



detecção (tabela 5.9). Para os cistos, como nos rios anteriormente descritos, as análises estatísticas não detectaram diferença significativa entre as colorações utilizadas ( $P=0,5086$ ).

Tabela 5.9 - Resultado do teste de hipóteses para diferença entre as técnicas utilizadas para detecção do microrganismo *Cryptosporidium* sp no Rio dos Sinos.

Fonte de variação <b>Técnica:</b>	Soma de quadrados (Q)	P ( $Qb^{\circ} = Qb$ )
Entre grupos	2888	0,0208
Contrastes:		
Imuno-Kinyoun	2166	0,0139
Imuno-Safranina	2166	0,0132
Kinyoun - Safranina	1	1

Não tendo ocorrido sazonalidade para *Cryptosporidium* no Rio dos Sinos, as análises estatísticas não detectaram diferença entre os meses durante o período avaliado ( $P=1$ ). Mas, assim como nos dois rios, anteriormente comentados, neste, as análises indicaram diferença significativa entre os meses em relação à *Giardia* ( $P=0,0065$ ), apresentando ocorrência de sazonalidade para este microrganismo. A tabela 5.10 exibe os valores de P significativos.

Tabela 5.10 - Resultado do teste de hipóteses para diferença entre os meses em relação ao microrganismo *Giardia* sp no Rio dos Sinos (valores de contrastes significativos).

Fonte de variação: <b>Mês</b>	Soma de quadrados (Q)	P ( $Qb^{\circ} = Qb$ )
Entre grupos	77667	0,0065
Contrastes:		
ago-fev	20300	0,0191
ago-jul	26667	0,0055
set-fev	20300	0,0178
set-jul	26667	0,0059
out-fev	18260	0,0254
out-jul	24321	0,0074
nov-fev	20300	0,0192
nov-jul	26667	0,0043
dez-jul	18704	0,0210
jan-fev	20300	0,0179
jan-jul	26667	0,0044
fev-ago	13920	0,0459
fev-jun	14406	0,0465
ago-jul	19267	0,0207
jun-jul	19838	0,0202

### 5.3.2 Análises das correlações lineares e regressões múltiplas

A tabela 5.11 exibe os valores de correlação (r) e probabilidade (P) entre as variáveis ambientais analisadas e a ocorrência dos microrganismos no Rio dos Sinos, onde se pode verificar que não houve correlações significativas.

Tabela 5.11 - Correlação linear entre o número de oocistos de *Cryptosporidium* sp e cistos de *Giardia* sp detectados e variáveis ambientais analisadas no Rio dos Sinos.

Parâmetros		Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp			Cistos de <i>Giardia</i> sp		
		Imuno	Kinyoun	Safranina	Imuno	Lugol	Tricrômico
Temp.	r =	-0,009	-	-	-0,147	0,497	0,460
	P=	0,978	-	-	0,648	0,100	0,132
Turbidez	r =	-0,098	-	-	-0,359	-0,129	-0,098
	P=	0,763	-	-	0,252	0,690	0,762
ST	r =	-0,026	-	-	0,300	-0,104	-0,467
	P=	0,936	-	-	0,343	0,749	0,126
pH	r =	0,164	-	-	-0,070	-0,467	-0,005
	P=	0,611	-	-	0,829	0,126	0,988
Condutiv.	r =	0,080	-	-	0,437	-0,091	-0,195
	P=	0,805	-	-	0,155	0,780	0,544
UV254nm	r =	-0,102	-	-	0,179	-0,007	-0,214
	P=	0,752	-	-	0,578	0,983	0,505
OD	r =	-0,231	-	-	0,172	-0,247	-0,359
	P=	0,471	-	-	0,593	0,440	0,251
DBO <sub>5</sub>	r =	0,179	-	-	0,468	0,164	0,314
	P=	0,579	-	-	0,125	0,610	0,320
DQO	r =	-0,079	-	-	0,351	0,024	0,017
	P=	0,808	-	-	0,263	0,942	0,958
NTK	r =	-0,028	-	-	0,248	-0,198	-0,176
	P=	0,930	-	-	0,437	0,538	0,584
Fósforo T	r =	-0,204	-	-	0,145	-0,308	-0,335
	P=	0,525	-	-	0,654	0,329	0,287
Vazão	r =	-0,203	-	-	-0,166	-0,447	-0,537
	P=	0,525	-	-	0,605	0,144	0,070
C Fecais/ <i>E.coli</i>	r =	-0,190	-	-	0,190	-0,255	-0,275
	P=	0,555	-	-	0,554	0,423	0,388

Não houve detecção de *Cryptosporidium* com Kinyoun e Safranina, portanto não haveria correlação de qualquer forma. Mesmo havendo recuperação com as outras técnicas, não foi detectada correlação entre coliformes e turbidez para nenhum dos dois microrganismos.

## Modelos matemáticos

Os modelos matemáticos obtidos com as análises de regressão múltiplas estão descritos a seguir:

$$\begin{aligned} \text{Densidade de oocistos de } \textit{Cryptosporidium} = & -27,3 - 0,607 \text{ Temperatura} + 0,000 \text{ Turbidez} - 0,007 \\ \text{Sólidos Totais} + 7,95 \text{ pH} + 0,000 \text{ C. Fecais/} \textit{E.coli} - 0,043 \text{ Vazão} & \quad (\text{Eq.08}) \\ (\text{F} = 0,262; \text{P} = 0,950; \text{R} = 0,227; \mathbf{R^2} = \mathbf{0,051}). & \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Densidade de cistos de } \textit{Giardia} = & 536,0 - 1,69 \text{ Temperatura} - 0,667 \text{ Turbidez} - 0,351 \text{ Sólidos} \\ \text{Totais} - 53,5 \text{ pH} + 0,000 \text{ C. Fecais/} \textit{E.coli} - 0,318 \text{ Vazão} & \quad (\text{Eq.09}) \\ (\text{F} = 1,515; \text{P} = 0,280; \text{R} = 0,488; \mathbf{R^2} = \mathbf{0,239}). & \end{aligned}$$

Pode-se observar que o valor de  $R^2$  para ambos os microrganismos foi muito baixo, indicando que, no Rio dos Sinos, a ocorrência dos microrganismos não é função dos parâmetros avaliados.

## 5.4 Rio Gravataí

Este rio também era amostrado na cidade de Canoas, próximo ao km 06, e foi onde houve detecção de menor concentração de microrganismos.

### 5.4.1 Microrganismos: concentrações encontradas, comparação entre colorações e sazonalidade

Este rio, é o que apresenta maior poluição orgânica dentre os quatro estudados, paradoxalmente, foi onde se detectou as menores concentrações de *Cryptosporidium* e *Giardia*

(tabela 5.12). Os valores mínimos de detecção foram **zero** para todas as colorações. Os valores máximos foram de 83 oocistos/100L para Imunofluorescência, e **zero** para Kinyoun e Safranina e 68, 390 e 80 cistos/100L para Imunofluorescência, Iodo Lugol e Iodo Tricrômico, respectivamente. O valor médio mais alto para cistos foi obtido com a coloração de Iodo Lugol. O coeficiente de variação foi de 345% para *Cryptosporidium* e 195% para *Giardia*.

Tabela 5.12 - Detecção de (oo)cistos nas águas brutas do Rio Gravataí, utilizando Imunofluorescência, Kinyoun, Safranina, Iodo Lugol e Iodo Tricrômico.

	<i>Cryptosporidium</i> sp /100 L de água			<i>Giardia</i> sp /100 L de água		
	Método de detecção			Método de detecção		
	Imuno	Kinyoun	Safranina	Imuno	Lugol	Tricrômico
Média aritmética	16	0	0	11	92	31
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Máximo	83	0	0	68	390	80

As figuras 5.7 e 5.8 representam a detecção dos microrganismos no Rio Gravataí.

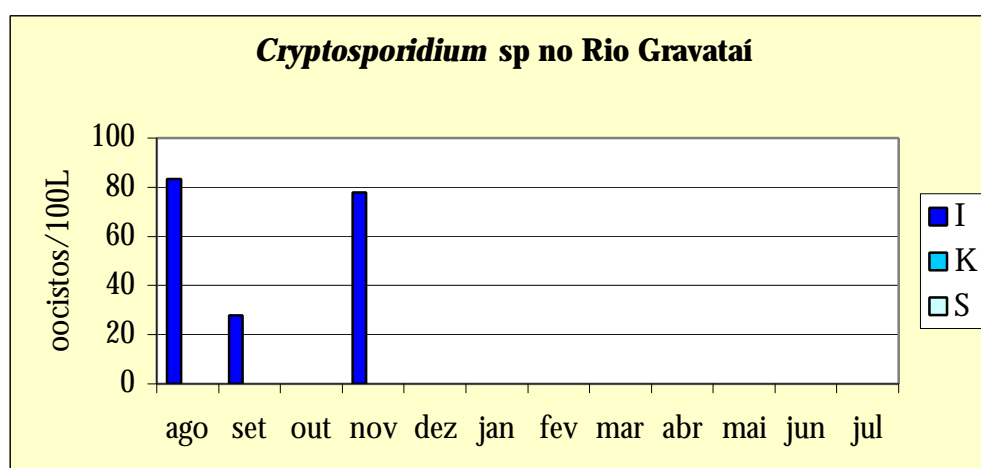


Figura 5.7 - Oocistos de *Cryptosporidium* sp no Rio Gravataí detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Kinyoun (K) e Safranina (S) entre agosto/2002 e julho/2003.

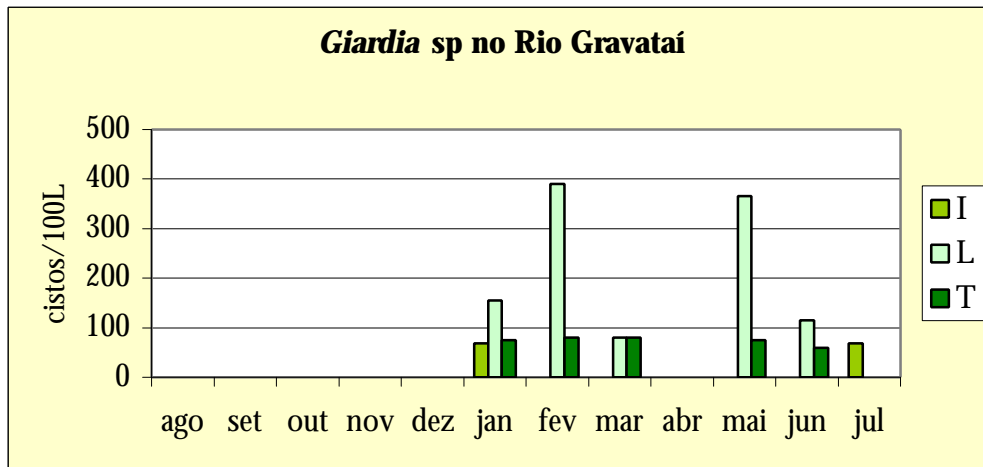


Figura 5.8 - Cistos de *Giardia* sp no Rio Gravataí detectados com as técnicas de Imunofluorescência (I), Iodo Lugol (L) e Iodo Tricrômico (T) entre agosto/2002 e julho/2003.

Observa-se que apenas três (25%) dos meses avaliados foram positivos para o *Cryptosporidium* e seis (50%) para a *Giardia*. O percentual de detecção variou conforme descrito a seguir:

- Para oocistos:
  - 25% somente com Imunofluorescência
  - 75% sem detecção com nenhuma das técnicas
  
- Para cistos:
  - 8,3% com Imunofluorescência
  - 33,3% com Iodo Lugol e Iodo Tricrômico
  - 8,3% com as três técnicas simultaneamente
  - 50% sem detecção com nenhuma das técnicas.

O *Cryptosporidium* foi detectado entre agosto e novembro e a *Giardia* só começou a ser detectada a partir de janeiro.

Não foi detectada nenhuma diferença significativa entre as técnicas utilizadas para *Cryptosporidium* ( $P=0,0911$ ) e nem entre as técnicas utilizadas para *Giardia* ( $P=0,0585$ ). Neste caso

era esperado haver diferença significativa entre as técnicas utilizadas para detecção de oocistos, uma vez que com resultados semelhantes (apenas um mês de detecção a mais) essa diferença foi detectada no Rio dos Sinos. Porém, como as análises são feitas levando em consideração as três técnicas, mesmo havendo duas onde nenhum microrganismo foi detectado, é provável que a porcentagem de detecção obtida no Rio Gravataí não seja suficiente para as análises estatísticas detectarem diferenças entre as técnicas.

Não foi detectada sazonalidade na ocorrência de nenhum dos dois microrganismos no Rio Gravataí. As análises estatísticas não detectaram diferença entre os meses durante o período avaliado, sendo os valores de  $P=1$  e  $P=0,149$  para *Cryptosporidium* e *Giardia*, respectivamente.

#### 5.4.2 Análises das correlações lineares e regressões múltiplas

No que diz respeito às correlações com as variáveis ambientais estudadas, verificou-se que ocorreu correlação entre UV254 nm e *Giardia* detectada Iodo Tricrômico (tabela 5.13). Esta associação pode ser devida ao fato de que entre os meses de dezembro/2002 e abril/2003, além de maio e junho/2003, houve aumento nos valores de UV254 nm e concomitantemente ocorreram picos na detecção de cistos com esta técnica. A vazão também aparece correlacionada com *Cryptosporidium* quando detectado com Imunofluorescência e *Giardia* com Iodo Tricrômico. Nos meses entre agosto e outubro/2003 houve queda na detecção do primeiro microrganismo e também queda nos volumes de vazão, ocorrendo um pico dos dois em novembro, depois estabilizando a vazão e sem detecção de oocistos. Entre fevereiro e março/2003 houve aumento na detecção do segundo microrganismo e ligeira queda na vazão, desta forma ocorreu correlação.

Tabela 5.13 - Correlação linear entre o número de oocistos de *Cryptosporidium* sp e cistos de *Giardia* sp e variáveis ambientais analisadas no Rio Gravataí.

Parâmetros	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp			Cistos de <i>Giardia</i> sp		
		Imuno	Kinyoun Safranina	Imuno	Lugol	Tricrômico
Temp.	r =	-0,367	-	0,130	0,357	0,550
	P =	0,240	-	0,686	0,255	0,064
Turbidez	r =	-0,204	-	-0,241	0,403	0,291
	P =	0,524	-	0,451	0,194	0,359
ST	r =	-0,164	-	-0,143	0,212	0,085
	P =	0,611	-	0,658	0,508	0,793
PH	r =	-0,045	-	0,205	0,276	0,442
	P =	0,890	-	0,523	0,386	0,150
Condutiv.	r =	-0,169	-	0,431	-0,021	0,102
	P =	0,600	-	0,162	0,948	0,753
UV254nm	r =	-0,423	-	0,399	0,503	<b>0,762</b>
	P =	0,171	-	0,199	0,095	<b>0,004</b>
OD	r =	0,120	-	-0,295	-0,179	-0,228
	P =	0,710	-	0,352	0,579	0,476
DBO <sub>5</sub>	r =	-0,286	-	-0,205	0,425	0,406
	P =	0,367	-	0,523	0,169	0,190
DQO	r =	0,097	-	-0,115	-0,070	0,284
	P =	0,765	-	0,722	0,829	0,371
NTK	r =	-0,005	-	0,388	-0,062	0,229
	P =	0,988	-	0,212	0,848	0,473
Fósforo T	r =	0,018	-	0,380	-0,132	-0,021
	P =	0,956	-	0,223	0,683	0,948
Vazão	r =	<b>0,842</b>	-	-0,20	-0,52	<b>-0,63</b>
	P =	<b>0,0005</b>	-	-0,52	0,007	<b>0,02</b>
C. Fecais <i>E.coli</i>	r =	-0,071	-	0,471	-0,124	0,024
	P =	0,826	-	0,123	0,700	0,940

## Modelos matemáticos

Os modelos matemáticos obtidos com as análises de regressão múltiplas estão descritos a seguir:

$$\text{Densidade de oocistos de } \textit{Cryptosporidium} = -23,5 + 0,531 \text{ Temperatura} - 0,229 \text{ Turbidez} + 0,047 \text{ Sólidos Totais} + 0,922 \text{ pH} + 0,000 \text{ C. Fecais/} \textit{E.coli} + 0,411 \text{ Vazão} \quad (\text{Eq. 10})$$

(F = 1,274; P = 0,3000; R = 0,457; **R<sup>2</sup> = 0,209**).

Densidade de cistos de *Giardia* =  $-811,8 - 8,70 \text{ Temperatura} + 6,47 \text{ Turbidez} - 0,656 \text{ Sólidos Totais} + 150,7 \text{ pH} + 0,000 \text{ C. Fecais}/E.coli - 1,54 \text{ Vazão}$  (Eq. 11)  
 (F = 1,940; P = 0,108; R = 0,535; **R<sup>2</sup> = 0,286**).

Pode-se observar que o valor de R<sup>2</sup> para ambos os microrganismos foi muito baixo, indicando que, neste rio, a ocorrência dos microrganismos não é função dos parâmetros avaliados.

## 5.5 Resultados dos três rios agrupados

### 5.5.1 Comparação entre técnicas e observação de sazonalidade

Depois de agrupados os três rios, que de acordo com os resultados do teste de aleatorização mostraram-se semelhantes entre si, fez-se os seguintes testes: comparação entre as colorações, correlação linear, regressões simples e múltiplas. Os resultados estão expostos a seguir:

Quando agrupados os três rios, foram detectadas diferenças significativas entre as colorações Imunofluorescência e Kinyoun (P=0,002) utilizadas para a detecção de *Cryptosporidium* (P=0,02), porém, entre Imunofluorescência e Safranina (P=0,06) e entre Kinyoun e Safranina não houve diferença significativa (P=0,473), embora a diferença entre Imuno e Safranina, tenha ficado no limite (tabela 5.14). Estas diferenças só foram observadas no Rio dos Sinos, sendo consideradas portanto, fortuitas. Assim sendo, é provável que os valores do Rio dos Sinos estejam influenciando no resultado do agrupamento.

Nas colorações utilizadas para a detecção de *Giardia*, não houve alteração em relação aos resultados dos rios individualmente, ou seja, não foi observada diferença significativa entre as colorações (P= 0,615). A tabela 5.14. expõe estes resultados.



Tabela 5.14 - Resultado do teste de hipóteses para diferença entre as técnicas utilizadas para detecção do microrganismo *Cryptosporidium* sp nos três Rios juntos (Taquari, Cai e dos Sinos).

Fonte de variação:	Soma de quadrados (Q)	P ( $Qb^{\circ} = Qb$ )
<b>Técnica</b>		
Entre grupos	33922	<b>0,02</b>
Contrastes:		
Imuno-Kinyoun	32086	<b>0,002</b>
Imuno-Safranina	16047	<b>0,060</b>
Kinyoun - Safranina	2750,3	0,473

Em relação à sazonalidade, o *Cryptosporidium* que anteriormente, quando avaliados os rios um a um, não apresentou sazonalidade, agora se observou este fenômeno. A tabela 5.15 exibe os valores de contrastes significativos entre os meses.

Tabela 5.15 - Resultado do teste de hipóteses para diferença entre os meses em relação ao microrganismo *Cryptosporidium* sp nos três rios agrupados (Taquari, Cai e dos Sinos) (valores de contrastes significativos).

Fonte de variação: <b>Mês</b>	Soma de quadrados(Q)	P( $Qb^{\circ} = Qb$ )
Entre grupos	92852	0,036
Contrastes:		
ago-jun	36001	0,005
ago-jul	21424	0,030
set-jun	33024	0,014
set-jul	19143	0,050
out-jun	28481	0,016
nov-jun	34060	0,007
nov-jul	19933	0,037
jan-jun	39574	0,008
jan-jul	24200	0,027
fev-jun	20402	0,041
mar-jun	27612	0,022
abr-jun	39574	0,008
abr-jul	24200	0,033
maio-jun	33196	0,010
maio-jul	19273	0,049

Para a *Giardia* os resultados mantiveram-se como nos rios individualmente, sendo observada sazonalidade. A tabela 5.16, exibe os valores de contrastes significativos para este microrganismo.

Tabela 5.16 - Resultado do teste de hipóteses para diferença entre os meses em relação ao microrganismo *Giardia* sp nos três rios agrupados (Taquari, Cai e dos Sinos) (valores de contrastes significativos).

	Soma de quadrados(Q)	P(Qb° =Qb)
<b>Fonte de variação: Mês</b>		
Entre grupos	7,0414e+05	0,001
<b>Contrastes:</b>		
ago-fev	1,1061e+05	0,016
ago-jun	2,3851e+05	0,001
ago-jul	2,7602e+05	0,001
set-fev	84324	0,020
set-abr	10805	0,420
set-jun	1,9908e+05	0,001
set-jul	2,3347e+05	0,001
out-jun	1,5867e+05	0,004
out-jul	1,8952e+05	0,001
nov-fev	80267	0,026
nov-jun	1,9282e+05	0,001
nov-jul	2,2669e+05	0,001
dez--fev	76440	0,036
dez-jun	1,8686e+05	0,001
dez-jul	2,2023e+05	0,001
jan-fev	80000	0,031
jan-jun	1,9241e+05	0,002
jan-jul	2,2624e+05	0,001
mar-jun	1,321e+05	0,013
mar-jul	1,6037e+05	0,003
abr-jun	1,1713e+05	0,009
abr-jul	1,4383e+05	0,008
mai-jul	94468	0,021

## 5.5.2 Análises das correlações lineares e regressões múltiplas

Uma vez agrupados os três rios, refez-se as análises de correlações aplicando o teste de Pearson, os resultados encontram-se expostos na tabela 5.17, onde se pode verificar que não houve correlação significativa entre os organismos e nenhuma das variáveis analisadas.

Tabela 5.17 - Correlação linear entre o número de oocistos de *Cryptosporidium* sp e cistos de *Giardia* sp e variáveis ambientais analisadas nos três rios agrupados (Taquari, Cai e dos Sinos).

Parâmetros		Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp			Cistos de <i>Giardia</i> sp		
		Imuno	Kinyoun	Safranina	Imuno	Lugol	Tricrômico
Temp.	r =	-0,317	0,187	-0,068	-0,109	0,062	-0,162
	P=	0,060	0,275	0,695	0,528	0,718	0,346
Turbidez	r =	-0,131	0,225	-0,031	-0,086	-0,140	-0,226
	P=	0,448	0,186	0,858	0,617	0,416	0,186
ST	r =	-0,202	0,200	0,106	-0,012	-0,129	-0,353
	P=	0,238	0,242	0,537	0,944	0,453	0,035
pH	r =	0,088	0,309	0,183	0,166	-0,139	-0,128
	P=	0,609	0,066	0,286	0,334	0,420	0,456
Condutiv.	r =	-0,048	-0,269	0,061	-0,102	-0,153	-0,174
	P=	0,783	0,113	0,726	0,555	0,372	0,310
UV254nm	r =	-0,215	0,329	0,015	0,131	0,147	0,081
	P=	0,209	0,050	0,931	0,445	0,391	0,637
OD	r =	0,430	-0,085	0,304	0,364	0,434	0,392
	P=	0,009	0,624	0,071	0,029	0,008	0,018
DBO <sub>5</sub>	r =	0,161	-0,040	0,102	0,157	0,393	0,347
	P=	0,348	0,816	0,553	0,361	0,018	0,038
DQO	r =	-0,026	0,028	-0,007	-0,093	0,056	0,013
	P=	0,882	0,872	0,970	0,589	0,747	0,939
NTK	r =	-0,188	-0,119	-0,081	-0,158	-0,211	-0,195
	P=	0,271	0,489	0,640	0,357	0,216	0,253
Fósforo T	r =	-0,211	-0,096	-0,132	-0,108	-0,283	-0,288
	P=	0,216	0,578	0,441	0,530	0,094	0,089
Vazão	r =	0,201	0,147	0,059	0,399	-0,084	0,003
	P=	0,240	0,392	0,731	0,016	0,624	0,987
C.Fecais/ <i>E. coli</i>	r =	-0,108	-0,069	-0,044	-0,039	-0,141	-0,121
	P=	0,531	0,688	0,797	0,820	0,411	0,480

## Modelos matemáticos

Empregou-se regressões simples e múltiplas para verificar modelos que explicassem a ocorrência dos microrganismos em função das variáveis consideradas mais influentes no fenômeno.

Densidade de oocistos de *Cryptosporidium* =  $-109,579 - 1,522 \text{ Temperatura} - 0,389 \text{ Turbidez} + 0,157 \text{ Sólidos Totais} + 22,308 \text{ pH} + 0,000 \text{ C. Fecais}/E.coli + 0,007 \text{ Vazão}$  (Eq. 12)  
(F = 0,897; P = 0,500; R = 0,225; **R<sup>2</sup> = 0,051**).

Densidade de cistos de *Giardia* =  $376,505 + 1,420 \text{ Temperatura} - 1,169 \text{ Turbidez} - 0,194 \text{ Sólidos Totais} - 40,4 \text{ pH} + 0,000 \text{ C. Fecais}/E.coli + 0,051 \text{ Vazão}$  (Eq. 13)  
(F = 2,51; P = 0,026; R = 0,360; **R<sup>2</sup> = 0,130**).

Como pode verificar nas equações descritas, os valores de R<sup>2</sup>, não confirmam esta associação com nenhuma das variáveis.

## 6 DISCUSSÃO

A discussão foi feita na mesma seqüência dos objetivos propostos. Inicialmente, a detecção dos microrganismos e índices de recuperação, seguida das comparações entre as colorações e, finalmente, as avaliações de associações entre a ocorrência de microrganismos e as variáveis ambientais.

### 6.1 Concentrações de microrganismos encontrados nos afluentes

Em todos os quatro afluentes foram detectados ambos os microrganismos, sendo a densidade média de *Giardia* maior que a de *Cryptosporidium*. Verificando a literatura, nota-se que ocorre uma variação na ocorrência destes microrganismos em águas superficiais, havendo relatos de detecção de maiores concentrações de *Giardia* que *Cryptosporidium* (Kfir et al., 1995b; Ahmad et al., 1997; Ho & Tam, 1998; Bertolucci et al., 1998; Karanis et al., 1998; Ré, 1999; Dias Junior, 1999; Hachich et al., 2000). O oposto também ocorre, quando o *Cryptosporidium* é detectado em maior quantidade (LeChevalier & Norton, 1995; Crabtree et al., 1996; Zuckerman et al., 1997; Hashimoto et al., 2002). Há ainda, relatos de estudos onde o *Cryptosporidium* foi encontrado em determinadas fontes de água e a *Giardia* não, e vice-versa. Há pesquisadores que afirmam não haver nenhuma relação. De fato, entre os microrganismos, quer dizer, não necessariamente um vai estar presente quando o outro estiver.

Avaliando-se as figuras que exibem os meses em que os rios foram amostrados, percebe-se que, no segundo semestre, quando as coletas começaram a ser feitas nas ETAs, houve aumento na detecção da *Giardia*. Tal fato sugere que os locais de captação da CORSAN ficam próximos a fontes de contaminação com este patógeno; ou que, com o bombeamento para

dentro das estações, ocorra homogeneização da água, possibilitando a coleta de amostras mais representativas do sistema do que aquelas feitas às margens dos rios.

Através de pesquisas de qualidade de água realizadas pela FEPAM e das análises realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho, constatou-se que os Rios Taquari e Caí são rios que apresentam menor carga orgânica que o dos Sinos e Gravataí. Embora, nas análises estatísticas, só os dois primeiros tenham-se mostrado diferentes do Gravataí. Pelo fato de os protozoários aqui estudados serem de origem entérica, poder-se-ia supor que nos corpos d'água que recebam maior quantidade de esgotos, seriam detectadas maiores concentrações destes microrganismos. Não foi o que se observou, havendo, na verdade, um claro decréscimo na percentagem de detecção dos microrganismos no sentido Taquari, Caí, Sinos, Gravataí: (75, 42, 33 e 25% para *Cryptosporidium* e 92, 83, 67 e 50% para *Giardia*).

Em função do exposto no parágrafo anterior, é possível supor que a técnica de purificação utilizada neste trabalho – SIM – funcione melhor em águas ambientais mais limpas, uma vez que em dois rios onde foram detectadas as maiores quantidades dos microrganismos, foram os rios com menores cargas poluentes.

É possível que os oocistos de *Cryptosporidium* detectados no Rio Taquari sejam de origem bovina, os quais sabe-se, infectam também os humanos (Kosek et al., 2001; Dillingham et al., 2002; Monis & Thompson, 2003), pois existem prováveis fontes de contaminação direta às margens do Rio Taquari, onde o gado pasta livremente ao lado do ponto de captação da CORSAN.

Quando (oo)cistos são expostos a estresse ambiental ou estresse pelo processamento da própria metodologia, a conformação dos epítopos dos antígenos é modificada, fazendo-os ficarem mais ou menos reativos aos anticorpos. No caso em que os anticorpos utilizados para a SIM e o corante reagirem abaixo do esperado, os (oo)cistos podem não ser detectados, causando resultados falsos negativos (Simmons III et al., 2001).

Não é possível afirmar que tal fato não tenha ocorrido com as amostras processadas durante esta pesquisa, pois houve casos de não detecção de microrganismos, mesmo em algumas das amostras controle, ocasionando falsos negativos. É provável que com as amostras ambientais

avaliadas tenha ocorrido o mesmo, uma vez que o número de microrganismos detectados, principalmente *Cryptosporidium*, foi, na sua maioria, bastante baixo, sendo que, em muitos casos, nem se quer foram detectados. Seria necessária uma avaliação mais aprofundada do aparelho de filtração utilizado neste trabalho, para conclusões a respeito dos tipos de danos que pode causar aos (oo)cistos durante o processo de filtração.

Apesar de possíveis falsos positivos ou negativos, que podem ocorrer em qualquer pesquisa, as concentrações de *Cryptosporidium* encontradas no Rio Taquari (média de 80 oocistos/100L) foram similares às relatadas em algumas pesquisas: Kfir et al. (1995b) na África (média de 60 oocistos /100L) e Ho & Tam (1998) em Hong Kong (30-300 oocistos/100L).

No Brasil, as concentrações de microrganismos encontradas em águas de rios, normalmente são bem superiores às observadas no presente trabalho: Hachich et al. (2000) em São Paulo, avaliaram o Rio Atibaia (na captação), o Ribeirão dos Cristais e o Rio da Cotia, no canal de captação da ETA, e encontraram densidades máximas de 521 cistos/L, 176 cistos/L e 215 cistos/L de *Giardia*, respectivamente. Franco et al. (2001) em Campinas, também no Estado de São Paulo, encontraram 200 oocistos e 190 cistos/L, indicando claramente contaminação dos corpos d'água com altas cargas de contaminantes.

Pelo fato de terem sido encontrados protozoários nas águas brutas do Estado e não haver relatos significativos de doenças, pressupõe-se que o tratamento dessas águas nas ETAs da CORSAN deva reduzir a quantidade dessas estruturas biológicas na água final, pois a coagulação, sedimentação e filtração podem remover boa parte dos microrganismos. Ainda assim, existe a probabilidade de contaminação, mesmo em concentrações pequenas, pois se sabe que o risco associado a *Cryptosporidium* na água potável é de 10 oocistos/100L (0,1 oocisto/dia para ingestão em 1 L de água) (Mara & Feachem, 1999). De qualquer forma, restam dúvidas sobre a hipótese de que as etapas de tratamento citadas, retirem boa parte dos microrganismos, uma vez que para a remoção dessas estruturas biológicas as plantas de tratamento devem ter operações altamente qualificadas e controladas.

Ainda, deve ser levado em consideração o fato de que as secretarias de saúde não são obrigadas, legalmente, a registrar casos de indivíduos acometidos pelas mazelas causadas por estes microrganismos. De acordo com o Ministério da Saúde, das doenças consideradas de veiculação

hídrica, somente cólera, febre tifóide e hepatite são de notificação obrigatória, sendo assim, desconhecido o número de casos das demais enfermidades, como gastroenterites, verminoses, diarréias infecciosas, entre outras.

Há, ainda, a situação mais provável, a de que pessoas infectadas não procurem atendimento médico, supondo tratar-se de um mal estar passageiro.

## 6.2 Índices de recuperação

Como visto na revisão bibliográfica, as técnicas mais amplamente difundidas para a recuperação de (oo)cistos envolvem a utilização de membranas normalmente aliadas à separação imunomagnética (com anticorpos monoclonais) e microscopia de Imunofluorescência. Porém, observa-se que a maior parte não alcança índices muito expressivos de recuperação além de exibir grande oscilação na reprodutibilidade de recuperação. Neste trabalho, não foi diferente. Nas amostras ambientais ocorreu uma ampla variação nos níveis de detecção, desde não detectados a máximos de 383 oocistos/100L e 605 cistos/100L (valores observados no Rio Taquari). Tal fato também ocorreu quando da calibração do aparelho de filtração utilizado nesta pesquisa.

Segundo Simmons III et al. (2001), resultados de índices de recuperação com amostras ambientais exibem valores consideravelmente baixos, mas com água reagente, ambos os instrumentos - membrana ou cápsula - podem ser utilizados, resultando em recuperações aceitáveis.

A questão principal é como concentrar os microrganismos através de centrifugação sem a utilização de um coagulante, visto que não existe material particulado na água reagente, como nas amostras oriundas dos afluentes. É este material que serve como agente floculante para formar o "pellet" quando na centrifugação. Todos os trabalhos, inclusive o método 1623 (item 9.4.1), citam a utilização de água de torneira ou água destilada (água reagente) como um branco. Higgins et al. (2003) afirmam ser esta uma das causas dos baixos índices de recuperação das metodologias.



Neste trabalho, optou-se por utilizar uma das matrizes, previamente filtrada, para realizar o teste em branco. Os percentuais médios obtidos foram de 18, 17 e 10% para *Cryptosporidium* com Imunofluorescência, Kinyoun e Safranina, respectivamente; e 22, 20 e 20% para *Giardia* com Imunofluorescência, Iodo Lugol e Iodo Tricrômico, respectivamente.

Simmons III et al. (2001) relataram médias de recuperação de 39% com membrana e 47% com cápsula no teste de recuperação, todavia com uma quantidade muito maior de (oo)cistos (100-250/10L) de água sendo utilizada como inóculo e a detecção feita somente com a técnica de Imunofluorescência.

LeChevalier et al. (2003) conseguiram uma média de recuperação de 72% inoculando 500 oocistos em 10L de água, com 29 repetições e aplicando o método 1623. Verificaram uma grande variação, mas obtiveram uma média bem mais expressiva que em nossos experimentos, servindo-se porém, de uma quantidade de microrganismos inoculados e de um número de repetições bem maior que os nossos.

Os índices de recuperação obtidos em nosso trabalho estão mais próximos aos encontrados por McCuin & Clancy (2003), que inocularam 50 L de água bruta com aproximadamente 100 oocistos e obtiveram uma gama de recuperação entre 19,5 a 54,5%.

### 6.3 Colorações

Um dos componentes mais críticos de pesquisas ambientais usando *C. parvum* são as técnicas de enumeração utilizadas (Klonicki et al., 1997), sobretudo no que diz respeito à questão da variabilidade na recuperação, como já foi visto na revisão bibliográfica.

Nesta pesquisa verificou-se diferença na quantidade de oocistos observados com a técnica de Imunofluorescência em relação às outras - Kinyoun e Safranina. Em relação aos cistos, estas diferenças não foram tão marcantes. Vários fatores podem explicar as eventuais

discrepâncias do número de microrganismos detectados na mesma amostra, com as diferentes técnicas:

- Em alguns meses (agosto, setembro, outubro/2002, junho e julho/2003, no Rio Taquari; outubro, novembro e dezembro/2002 no Rio Caí; setembro, outubro/2002, março e julho/2003, no Rio dos Sinos; e agosto, setembro e novembro no Rio Gravataí), foram encontrados oocistos com a Imunofluorescência, o que não se confirmou com as outras colorações. Supõe-se, em função desses resultados, que é grande a probabilidade de que tenha ocorrido maior número de falsos positivos com a Imunofluorescência, quando utilizada na detecção de oocistos, o que pode ter ocorrido devido ao tamanho e formato dos oocistos, facilmente confundidos com outras partículas existentes na amostra. Por outro lado, não se pode descartar a hipótese de que nas análises feitas com as outras técnicas haja falsos negativos, existindo a possibilidade de que o material utilizado para separação imunomagnética interfira de alguma forma nas outras colorações que não a Imunofluorescência, uma vez que uma série de soluções é utilizada e várias lavagens são feitas.
- Na coloração que utiliza Safranina, não se obteve o efeito de contraste descrito por De Carli 2001. Na maioria das vezes, o material apresentou uma cor uniforme, dificultando a identificação dos microrganismos nas amostras, podendo ter induzido a falsos negativos.
- Com as outras colorações, Kinyoun para *Cryptosporidium* e Iodo Lugol e Iodo Tricrômico para *Giardia*, não se detectou este tipo de problema. Nas lâminas controle, todas as colorações funcionaram bem, tendo-se maior segurança do funcionamento das técnicas em relação a falsos positivos e negativos.
- A *Giardia* é mais facilmente visualizada que o *Cryptosporidium*. Quando se utiliza o Iodo Lugol e o Iodo Tricrômico, praticamente não se perde nada da quantidade de amostra que foi posta na lâmina, pois não há necessidade de lavagens sucessivas, que possam ocasionar perda de material da lâmina. Estes fatores, possivelmente ocasionam uma quantidade muito menor de falsos positivos.

- Supõe-se que (oo)cistos não formam uma suspensão homogênea quando agitados, em função das cargas superficiais (potencial zeta) existentes nestas estruturas biológicas, existindo a possibilidade de, quando pipetados os 10 $\mu$ L para cada lâmina, ter-se pipetado uma menor ou maior quantidade de microrganismos ali presentes, interferindo no resultado final quando comparadas as várias colorações.
- Em amostras onde a quantidade de microrganismos é pequena, a fixação do material na lâmina torna-se um fator de grande importância, pois tende a subestimar as concentrações presentes nas amostras, devido a perdas inevitáveis ocorridas durante o processamento das colorações. Nas amostras ambientais avaliadas nesta pesquisa, a quantidade de microrganismos detectadas foram baixas, estando portanto, sujeito a estas perdas.
- É possível que a quantidade elevada de não detecção tenha influenciado no resultado quando feitas as comparações entre as colorações, principalmente para *Cryptosporidium*. Porém, no Rio Taquari, as quantidades de não detectados não foram tão elevadas, e, mesmo neste Rio, não foi evidenciada diferença significativa entre as colorações.

## 6.4 Relações entre parâmetros de qualidade de água e microrganismos

Um dos grandes desafios para os pesquisadores e empresas de abastecimento de água é encontrar um índice substitutivo, para oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*. A busca da correlação com parâmetros ambientais de qualidade de água tem sido uma constante.

Os alvos da maioria das pesquisas são as variáveis turbidez e coliformes fecais, uma vez que oocistos são partículas em suspensão e os coliformes ainda são os indicadores de poluição fecal mais usados. As demais variáveis analisadas: temperatura, sólidos totais, pH, UV 254, condutividade, OD, DBO<sub>5</sub>, DQO, fósforo total e NTK, normalmente não são avaliadas em águas brutas e tratadas, sendo que a maioria dos trabalhos que levam em consideração tais

parâmetros, é realizada com efluentes domésticos. Uma das poucas pesquisas que relatam observações entre a correlação de algumas dessas variáveis e a ocorrência de *Giardia* em águas tratadas é o de Ahmad (1997) onde avaliou temperatura, pH, OD, condutividade, turbidez e coliformes fecais, estatisticamente não tendo observado nenhuma correlação entre a concentração de (oo)cistos e os parâmetros analisados.

A despeito dessas pesquisas, há controvérsias na aplicação da turbidez como indicador. Há pesquisadores que afirmam que uma turbidez de 0,10 UNT ou menos, em água tratada, indica que *Cryptosporidium* e *Giardia* foram removidos (Rader, 1996 *apud* Tarquin et al., 1998). Segundo Bastos (2001), este parâmetro seria um bom indicador da qualidade parasitológica da água filtrada e a eficiência na sua remoção seria um bom indicador de remoção de cistos e oocistos. Hsu et al. (2001c) e Hsu & Yeh (2003), encontraram correlação significativa entre concentrações de oocistos e turbidez, que, de acordo com os autores, poderia ser utilizada como indicador da remoção de *Cryptosporidium* em amostras ambientais.

Brasil (2004) recomenda que, para a filtração rápida, se estabeleça como meta a obtenção de efluente filtrado com valores de turbidez inferiores a 0,5 UNT, em 95% dos dados mensais, e nunca superiores a 5,0 UNT, visando assegurar a adequada eficiência de remoção daqueles organismos. Há, no entanto, aqueles que discordam dessa aplicação. Vieira (2002) afirma que a turbidez, embora adotada em alguns padrões como representante de protozoários e vírus entéricos (Brasil, 2000), também pode não ser uma medida adequada. Não somente devido aos recentes surtos de doenças veiculadas pela água, ocorridos nos EUA, onde aquele parâmetro estava dentro dos limites regulamentados, mas também porque as pesquisas têm mostrado que mesmo em níveis de turbidez menores do que 0,1 UNT, amostras positivas para *Giardia* e *Cryptosporidium* têm sido registradas.

Segundo Swertfeger et al. (1999), os parâmetros sólidos em suspensão e turbidez são mais indicados para serem usados como monitores do tempo real, mostrando quando o tratamento pode estar comprometido ou se ajustes imediatos são necessários, do que para a determinação das capacidades de remoção.

Nesta pesquisa, só se observou correlação de turbidez com *Cryptosporidium* sp quando este microrganismo foi detectado com Kinyoun e Safranina no Rio Taquari. Os valores de r

foram 0,614 e 0,613, respectivamente, com  $P=0,034$  para ambos os casos. Em nenhum outro rio foi detectada esta correlação de forma significativa e tampouco quando agrupados os três rios (Taquari, Cai e dos Sinos).

Quando compostos os modelos matemáticos, depois de feitas as regressões simples e múltiplas, também não foi observada esta associação, fato que sugere que a ocorrência destes microrganismos não é função apenas deste parâmetro.

Em relação aos coliformes fecais, a maioria dos pesquisadores afirma que este não é o indicador ideal para a presença/ausência dos dois protozoários, pois grande parte dos trabalhos realizados não observaram correlação entre a ocorrência dos protozoários e a presença de tais indicadores bacterianos (Ahmad et al., 1997; Fricker & Clancy, 1998; Gordon & Bubnis, 2000; Vieira et al., 2000; Bastos et al., 2001; Bonadonna et al., 2001; Cardoso et al., 2003).

Além da falta de correlação observada na maioria das pesquisas realizadas, há outras razões que impediriam a utilização deste índice como indicativo de *Cryptosporidium* e *Giardia*. Por exemplo, estes dois microrganismos são muito mais resistentes ao cloro do que os coliformes e Craun et al. (1997) verificaram que mesmo durante surtos causados por *Cryptosporidium* e *Giardia* o nível máximo contaminante permitido de coliformes não havia sido extrapolado.

Nesta pesquisa também não foi detectada correlação significativa entre coliformes fecais/*E.coli* e *Cryptosporidium* e *Giardia*, em nenhum dos quatro cursos d' água estudados e nem quando agrupados os três rios.

Quanto às demais variáveis analisadas, é provável que neste trabalho as diferenças entre os quatro afluentes tenham influenciado nos resultados das correlações, pois, de uma forma geral, não ocorreu um padrão. Isso, no entanto, já era esperado, uma vez que se tratam de sistemas bem diferenciados, conforme os resultados das análises físico-químicas mostraram, apesar de as análises estatísticas não terem evidenciado diferenças significativas entre os Rios Taquari, Cai e Sinos. Além disso, a relação entre parâmetros é vulnerável à variação natural devido ao acaso existente na distribuição dos organismos dentro de uma amostra (Tillett et al., 2001).

Houve uma grande variação, como visto os resultados, das correlações entre os microrganismos e as variáveis ambientais avaliadas, ocorrendo como descrito a seguir:

Para *Giardia*:

- com pH quando detectada com Iodo Tricrômico no Rio Taquari;
- com UV 254 quando detectada com Iodo Tricrômico no Gravataí
- com DBO<sub>5</sub> quando detectada com Iodo Lugol e Iodo Tricrômico no Rio Taquari e Iodo Lugol no Rio Caí;
- com OD com ambas as colorações, apenas no Rio Caí,
- com UV quando detectada com Iodo Tricrômico no Rio Gravataí;
- com NTK quando detectada com Iodo Lugol no Rio Caí;
- com vazão quando detectada com Iodo Tricrômico no Gravataí.

Para *Cryptosporidium*:

- com turbidez quando detectado com Kynioun e Safranina no Rio Taquari;
- com sólidos totais quando detectado com Safranina do Rio Taquari;
- com condutividade quando detectado com Imunofluorescência e Safranina no Rio Caí;
- com vazão quando detectado com Imunofluorescência no Rio Gravataí.

O único parâmetro que apresentou correlação com *Giardia* e *Cryptosporidium* com quatro das colorações, à exceção da *Giardia* detectada com Iodo Tricrômico e do *Cryptosporidium* detectado com Kinyoun, foi a condutividade. Mas tal fato ocorreu somente no Rio Caí.

Os demais parâmetros avaliados, temperatura, DQO e fósforo total não apresentaram correlação com os microrganismos *Cryptosporidium* e *Giardia* em nenhum dos quatro rios, sendo que no Rio dos Sinos, não se observou nenhuma correlação com nenhum dos parâmetros avaliados.

Quando agrupados os três rios, as correlações observadas nos rios individualmente, não se repetiram. Resultados novamente influenciados pelos dados do Rio dos Sinos.

As relações entre parasitas e parâmetros de qualidade da água podem ocorrer em determinados meios aquáticos, mas via de regra não ocorre da mesma maneira em todos. Tal fato se deve a diferenças nas fontes dos parasitas, tamanho da amostra, frequência de amostragem, fatores ambientais específicos ou outras causas desconhecidas (Atherholt et al., 1998 *apud* Vieira, 2002).

A associação entre a ocorrência e densidades de (oo)cistos com indicadores da qualidade físico-química e bacteriológica da água ainda é controversa (Rose et al., 1988; Atherholt et al., 1988 *apud* Bastos et al., 2001).

Embora o *Cryptosporidium* e a *Giardia* possam ser encontrados em inúmeras fontes de águas superficiais, em vários países do mundo, e em algumas fontes de águas subterrâneas, as concentrações destes organismos variam enormemente.

Apesar dos processos empregados para detecção não serem totalmente eficientes, não se tem notícia de contaminação de *Cryptosporidium* e *Giardia* na Região Metropolitana de Porto Alegre, devido à ausência de dados.

## 7 CONCLUSÕES

? Os dados obtidos indicam que o *Cryptosporidium* e a *Giardia* estão disseminados nas águas superficiais dos formadores do Lago Guaíba, em níveis semelhantes aos de outras regiões do Brasil e do mundo;

? O Rio Taquari, próximo ao km 04 e na captação da ETA de General Câmara, apresentou níveis de *Cryptosporidium* variando entre 0 e 383 oocistos/100L e *Giardia* entre 0 e 605 cistos/100L;

? No Rio Cai, próximo ao km 14 e na captação da ETA Montenegro, os níveis variaram entre 0 e 400 oocistos/100L e 0 e 250 cistos/100L;

? No Rio dos Sinos, próximo ao km 08 e na captação da ETA Niterói, os números de detecção foram entre 0 e 94 oocistos/100L e 0 e 215 cistos/100L;

? No Rio Gravataí, próximo ao km 06 e na captação da ETA Alvorada, entre 0 e 83 oocistos/100L e 0 e 390 cistos/100L;

? Pelo fato das ETAs, no Brasil, não serem projetadas para a remoção destas estruturas biológicas, tais valores evidenciam o risco destes patógenos passarem através dos sistemas de tratamento de água existentes à rede de distribuição;

? Os índices de recuperação do método por filtração em membrana do nosso trabalho foram os seguintes: para *Cryptosporidium*: 18%, 17% e 10% com Imunofluorescência, Kinyoun e Safranina, respectivamente; e para *Giardia*: 22% com Imunofluorescência, 20% com Iodo Lugol e Iodo Tricrômico, respectivamente. Tais valores se assemelham aos encontrados na literatura.



? De acordo com os resultados das análises estatísticas, não há diferenças significativas entre os tipos de corante utilizados para a detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia*, podendo qualquer uma das colorações ser aplicada para tal fim. No entanto, foi possível constatar um relativo grau de maior eficácia da metodologia de Imunofluorescência, em relação às outras duas técnicas empregadas para detecção de *Cryptosporidium*, quando os dados dos Rios Taquari, Cai e dos Sinos foram avaliados conjuntamente. Todavia, é provável que este resultado tenha sido influenciado pelos dados do Rio dos Sinos, que foi o único onde se observou diferença significativa entre as colorações, quando avaliados os rios individualmente. Não foi observada diferença significativa entre as colorações utilizadas para *Giardia*;

? A vantagem do Kinyoun e Safranina sobre os demais corantes é que ambas são colorações de longa duração, enquanto a Imunofluorescência, o Iodo Lugol e o Iodo Tricrômico duram apenas algumas horas. Além disso, a Imunofluorescência apresenta a desvantagem de aumentar os custos do processo;

? É provável que as correlações observadas entre as concentrações de *Cryptosporidium* e *Giardia* e os parâmetros Temperatura, Turbidez, Sólidos Totais, pH, UV 254, Condutividade, OD, DBO<sub>5</sub>, DQO, Nitrogênio Total, Fósforo Total e Coliformes fecais/*E.coli*, tenham sido fortuitas, uma vez que não se repetiram em todos os rios, assim como não se confirmaram quando agrupados os dados dos Rios Taquari, Cai e dos Sinos;

? Em nenhuma das situações avaliadas (rios individualmente ou agrupados) os coliformes apareceram correlacionados com os microrganismos avaliados, confirmando, portanto, os dados de pesquisas publicadas que dizem não ser este um índice seguro para a indicação da contaminação das águas com os microrganismos *Cryptosporidium* e *Giardia*. É provável que estes microrganismos sejam mais resistentes às condições ambientais do que os coliformes, até mesmo devido à sua capacidade de encistamento;

? Em função dos resultados alcançados com esta pesquisa, onde apenas em duas situações – no Rio Taquari, quando o *Cryptosporidium* foi detectado com as técnicas de Kinyoun e Safranina - conclui-se que é temerário utilizar a remoção de **Turbidez**, como um único indicativo da remoção total de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*, uma vez que, inclusive

matematicamente, provou-se que a associação entre este parâmetro de controle de água tratada e distribuída e a presença destes microrganismos é duvidosa, necessitando ser melhor esclarecida.

## 8 RECOMENDAÇÕES

? Apesar dos resultados alcançados com as pesquisas até aqui desenvolvidas, permanece a necessidade de técnicas mais rápidas e eficientes de detecção e contagem de *Cryptosporidium* e *Giardia*;

? Considerando que ETAs no Brasil não são projetadas para a remoção direta e eficiente destes microrganismos, recomenda-se avaliações a longo prazo para averiguar a ocorrência de *Cryptosporidium* e *Giardia* nas águas potáveis distribuídas;

? Recomenda-se, ainda, utilizar técnicas que permitam verificar a origem e viabilidade dos (oo)cistos, pois estudos moleculares têm mostrado a especificidade destes protozoários, principalmente o *Cryptosporidium*. Além disso, um ou vários (oo)cistos inviáveis não seriam capazes de desencadear surtos. Antes, porém, de visar etapas mais avançadas, recomenda-se aprimorar as tecnologias capazes de detectar, com precisão, concentrações dessas estruturas biológicas, presentes em qualquer tipo de amostra de água, seja bruta, tratada ou distribuída;

? Recomenda-se, também, comparar as técnicas de detecção à base de corantes com técnicas genéticas tais como PCR e outras;

? Recomenda-se a pesquisa de índices mais eficientes para a indicação de remoção destes microrganismos em águas tratadas, que representem uma alternativa ao parâmetro turbidez e coliformes;

? Recomenda-se, ao MS, que crie a obrigatoriedade do registro de casos sobre surtos provocados por estes patógenos;

? E alerta-se ao MS que a utilização da turbidez como único indicativo da remoção destes microrganismos é temerária.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, R.A. et al. 1997. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in raw and treated water from two water treatment plants in Selangor, Malaysia. **Water Research**, New York, v. 31, n. 12, p. 3132-3136.

AKIBA, Michihiro et al. 2001. Algae as surrogate indices for the removal of *Cryptosporidium* oocysts by direct filtration. In: IWA WORLD WATER CONGRESS, 2., 2001, Berlin. **Efficient Water Management**. London: IWA. Theme 5, topic 3.

AKIM, Elmer. 1983. **Infective dose of waterborne pathogens**. Washington: USEPA. p. 24-39.

AKIM, Elmer; JAKUBOSWSKI, Walter. 1986. Drinking water transmission of giardiasis in the United States. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 18, n. 10, p. 219-226.

ALDON, L.E.; CHAGLA, A.H. 1995. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, p. 186-187.

ARORA, Harish; DI GIOVANNI, George; LECHEVALIER, Mark. 2001. Spent filter backwash water contaminants and treatment strategies. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 93, n. 5, p. 100-114.

BARWICK, R. S. et al. 2000. Surveillance for waterborne-disease outbreaks-United States, 1997-1998. **Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ**, v. 49, n. 4, p. 1-21.

BASTOS, Rafael K. X. et al. 2001. Abordagem sanitário-epidemiológica do tratamento e da qualidade parasitológica da água: entre o desejável e o possível. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 21., 2001, João Pessoa. **Anais**. Rio de Janeiro: ABES. I-101.

BERINO, Emília; DE LUCA, Sérgio João. 2003. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em águas brutas de formadores do lago Guaíba. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22., 2003, Joinville. **Anais**. Rio de Janeiro: ABES. I-042.

BERTOLUCCI, G. C. et al. 1998. Influence of raw storage on *Giardia*, *Cryptosporidium* and Nematodes. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 261-267.

BONADONNA, L. et al. 2001. Removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* by wastewater treatment processes. In: IWA WORLD WATER CONGRESS, 2., 2001, Berlim. **Efficient Water Management**. London: IWA. Theme 5, topic 3.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2001. Portaria n. 1469, de 29 de dezembro de 2000. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2004. Portaria n. 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar.

BUKHARI, Z. et al. 1998. Occurrence of *Cryptosporidium* spp oocysts and *Giardia* sp cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 35, n. 11/12, p. 385-390.

CARDOSO, Luciana de Souza; DE CARLI, Geraldo A.; DE LUCA, Sérgio João. 2003. *Cryptosporidium* e *Giardia* em efluentes biologicamente tratados e desinfetados. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 4, p. 285-290, out./dez.

CARDOSO, Luciana de Souza; BERINO, Emília; DEUS, Ana Beatris Souza de; DE LUCA, Sérgio João. 2002. *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas e efluentes: estado da arte. In: CONGRESO INTERAMERICANO DE INGENIERIA SANITARIA Y AMBIENTAL, 28., 2002, Cancún. **Anais**. Cancún: Aidis. 8 f.

CARTWRIGHT, R.Y; COLBOURNE, J.S. 2001. Cryptosporidiosis and hotel swimming pools – a multifacetad challenge. In: IWA WORLD WATER CONGRESS, 2., 2001, Berlin. **Efficient water management**. London: IWA. Theme 5, topic 3.

CHAURET, Christian; SPRINGTHORPE, Susan; SATTAR, Syed. 1999. Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, n. 3, p. 257-262.

CHIEFFI, Pedro Paulo. 2001. Parasitoses emergentes. In: FERREIRA, Water A.; ÁVILA, Sandra L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 26, p. 274-277.

CLANCY, Jennifer L. 2000. Sydney's 1998 water quality crisis. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 92, n. 3, p. 55-69.

COMMUNICABLE DISEASE SURVEILLANCE CENTER, Atlanta. 2000. Disponível em: [http://<www.phls.co.uk/facts/uk data/cryptuk2.htm>](http://www.phls.co.uk/facts/uk_data/cryptuk2.htm). Acesso em: 10/04/2002.

CONNELL, Kevin. 2001. Discussion of “Evaluation of USEPA method 1622 for detections of *Cryptosporidium* oocysts in stream waters”. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 93, n. 3, p. 106-112.

CORNWELL, D.; LEE, L. 1994. Waste stream recycling: its effect on water quality. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 86, n. 11, p. 50.

CRABTREE, Kristina D. et al. 1996. The detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in cistern water in the U.S. Virgin Islands. **Water Research**, New York, v.30, n. 1, p. 208-216.

CRAUN, Gunther F.; BERGER, Paul S.; CALDERON, Rebecca, L. 1997. Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 89, n. 3, p. 96-104.

CRAUN, Gunther F. et al. 1998. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 90, n. 9, p. 81-85.

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

DE CARLI, Geraldo Attilio. 2001. Exames macroscópico e microscópico de amostra fecal fresca e preservada. In: DE CARLI, Geraldo Attilio. **Parasitologia Clínica**. São Paulo: Atheneu. cap. 2, p. 27-81.

DE CARLI, Geraldo Attilio; MOURA, Hércules. 2001. Métodos de coloração para coccídios intestinais. In: DE CARLI, Geraldo Attilio. **Parasitologia Clínica**. São Paulo: Atheneu. cap. 10, p. 223-63.

DIAS JUNIOR, Odival José. 1999. **Ocorrência de cistos de *Giardia* sp e oocistos de *Cryptosporidium* spp em águas superficiais e esgoto no município de Araras – SP.** Disponível em: <http://www.unicamp.br/ib/parasito/cursoextensao/ambiental.html>. Acesso em: 02 jan. 2002.

DILLINGHAM, Rebecca A.; LIMA, Aldo A.; GUERRANT, Richard. 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infection**, Paris, v. 4, p.1059-1066.

EMELKO, Monica B. 2003. Removal of viable and inactivated *Cryptosporidium* by dual- and tri-media filtration. **Water Research**, New York, v. 37, p. 2998-3008.



ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. 1992. **Guidelines for water reuse**. Washington. (EPA/625/R-92/004).

ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. 1998. **Method 1622**: *Cryptosporidium* sp in water by filtration. Washington. (EPA/821/R-98/010).

ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. 1999. **Method 1623**: *Cryptosporidium* sp and *Giardia* sp in water by filtration. Washington. (EPA/821/R-99/006).

FAHEY, Trudi. 2003. Cryptosporidiosis. **Primary Care Update for OB/GYNS**, Orlando v. 10, n. 2, p. 75-80.

FAIRLEY, Christopher, K.; SINCLAIR, Marta.I.; RIZAK, Samantha. 1999. Monitoring not the answer to *Cryptosporidium* in water. **The Lancet**, London, v. 354, n. 9183, p. 967-969.

FALK, Cornelia C. et al. 1998. Bench scale experiments for the evaluation of a membrane filtration method for the recovery efficiency of *Giardia* and *Cryptosporidium* from water. **Water Research**, New York, v. 32, n. 3, p. 565-568.

FELDMAN, Raquel E.; GUARDIS, Mónica del Valle; GARIBOGLIO, Miguel A. 1992. **Deteccion de quistes de "Giardia lamblia" en água**. Buenos Aires: CFI. 19 p.

FERRARI, B.C. et al. 1999. Comparison of *Cryptosporidium*-specific and *Giardia*-specific monoclonal antibodies for monitoring water samples. **Water Research**, New York, v. 33, n. 7, p.1611-1617.

FOGEL, Doug et al. 1993. Removing *Giardia* and *Cryptosporidium* by slow sand filtration. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 85, n. 11, p. 77-84.

FONTAINE, Melanie; GUILLOT, Emmanuelle. 2003. An immunomagnetic separation-real-time PCR for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 54, p. 29-36.

FRANCO, Regina Maura Bueno; ROCHA-EBERHARDT, Rosangela; CANTUSIO, R. 2001. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 109-112.

FRICKER, Colin; CLANCY, Jennifer. 1998. Crypto's protocol prospects. **Water Quality International**, London, May/June, p.11-15.

FURTADO, Ricardo Dourado. 2002. **Técnicas de cultivo de arroz**: relação com a qualidade de água, protozoários e diversidade fitoplanctônica. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Porto Alegre.

GALE, Paul; STANFIELD, Geoff. 2000. *Cryptosporidium* during a simulated outbreak. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 92, n. 9, p.105-118.

GENERA TECHNOLOGIES LTD. 2000. ***Cryptosporidium***: background notes for editors. Disponível em: < <http://www.genera.co.uk/press/about.htm> >. Acesso em: 06/07/2000.

GORDON, Gilbert; BUBNIS, Bernard. 2000. Environmentally friendly methods of water disinfection: the chemistry of alternative disinfectants. **Progress in Nuclear Energy**, Oxford, v. 37, n.1/4, p. 37-40.

GYÜRÉK, L.L.; FINCH, G. R.; BELOSEVIC, M. 1997. Modeling chlorine inactivation requirements of *C. parvum* oocysts closure. **Journal of Environmental Engineering**, New York, v. 123, n. 9, p. 865-875.

HACHICH, Elayse Maria et al. 2000. Importância do controle dos parasitas patogênicos *Giardia* e *Cryptosporidium* em águas captadas para consumo humano (I-042). In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE INGENIERIA SANITARIA Y AMBIENTAL, 27., 2000, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: ABES.

HALL, T. et al. 1995. *Cryptosporidium* removal during water treatment using dissolved air flotation. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 31, n.3/4, p.125-135.

HAMMER Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. 2003. **PAST**: Paleontological Statistics v. 1.12. Aberystwyth: Palaeontological Association. 62 p.

HANCOCK, Carrie M.; ROSE, Joan B.; GALLAHAN, M. 1998. The prevalence of *Cryptosporidium* e *Giardia* in US groundwaters. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 90, n. 3, p. 58-61.

HANCOCK, Carrie M. et al. 2000. *Giardia* and *Cryptosporidium* occurrence in groundwater. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 92, n. 9, p. 117-123.

HARWOOD, Valerie J. 2001. Detection and occurrence of indicator organisms and pathogens. **Water Environment Research**, Alexandria, v. 73, n.5.

HASHIMOTO, Atsushi.; KUNIKANE, Shoichi.; HIRATA, Tsuyoshi. 2002. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the drinking water supply in Japan. **Water Research**, New York, v. 36, p. 519-526.

HASS, Charles N.; ROSE, Joan B. 1995. Developing an action level for *Cryptosporidium*. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 87, n. 9, p. 81-84.

HASS, Charles N. 1996. Acceptable microbial risk. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 88, n. 12, p. 8.

HELLARD, M. E. et al. 2000. An outbreak of cryptosporidiosis in an urban swimming pool: why are such outbreaks difficult to detect? **Australian and New Zealand Journal of Public Health**, Canberra, v. 24, n. 3, p. 272-275.

HIGGINS, James A. et al. 2003. Recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples using continuous flow centrifugation. **Water Research**, New York, v. 37, p. 3551-3560.

HO, Bella S. W.; TAM, T.-Y. 1998. *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage-contaminated river waters. **Water Research**, New York, v. 32, n. 9, p. 2860-2864.

HSU, Bing-Mu et al. 1999. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in the Kau-Ping river and its watershed in southern Taiwan. **Water Research**, New York, v. 33, n. 11, p. 2701-2707.

HSU, Bing-Mu; CHIH PIN, Huang.; PAN, Jill R. 2001a. Filtration behaviors of *Giardia* and *Cryptosporidium* – ionic strength and pH effects. **Water Research**, New York, v. 35, n. 16, p. 3777-3782.

HSU, Bing-Mu et al. 2001b. Evaluation of two concentration methods for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. **Water Research**, New York, v. 35, n. 2, p. 419-424.

HSU, Bing-Mu; CHIH PIN, Huang; YEH, Hsuan-Hsien. 2001c. Evaluation of ICR protozoan method and method 1623 for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in actual water samples. In: IWA WORLD WATER CONGRESS, 2., 2001, Berlin. **Efficient Water Management**. London: IWA. Theme 5, topic 3.

HSU, Bing-Mu; YEH, H.-H. 2003. Removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* from drinking water treatment: a pilot-scale study. **Water Research**, New York, v. 37, n. 5, p.1111-1117.

JACANGELO, Joseph G.; ADHAM, Samer S.; LAÎNÉ, Jean-Michel. 1995. Mechanism of *Cryptosporidium*, *Giardia* and MS2 virus removal by MF and UF. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 87, n. 9, p. 107-121.

JACANGELO, Joseph G.; TRUSSEL, R.R.; WATSON, M. 1997. Role of membrane technology in drinking water treatment in the United States. **Desalination**, Amsterdam, v. 113, p. 119-127.

JAKUBOWSKI, Walter et al. 1996. Environmental methods for *Cryptosporidium*. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 88, n. 9, p. 107-121.

JOHNSON, D.W.; PIENIAZEK, N.J.; ROSE, J.B. 1993. DNA probe hybridization and PCR detection of *Cryptosporidium* compared to immunofluorescence assay. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 27, n. 3/4, p. 77-84.

JOHNSON, D.C. et al. 1995. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 31, n.5/6, p. 439-442.

JOHNSON, D.C. et al. 1997. Survival of *Giardia*, *Cryptosporidium*, poliovirus and *Salmonella* in marine waters. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 35, n. 11/12, p. 261-68.

JURANEK, Dennis D. et al. 1995. Cryptosporidiosis and public health: workshop report. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 87, n. 9, p. 69-80.

KARANIS, Panagiotis.; SCHOENEN, Dirk; SEITZ, H.M. 1998. Distribution and removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies in Germany. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 37, n.2, p. 9-18.

KFIR, A.R. et al. 1995a. Studies evaluating the applicability of utilising the same concentration techniques for the detection of protozoan parasites and viruses in water. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 31, n. 5/6, p. 417-423.

KFIR, R. et al. 1995b. Studies on the prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in South African water. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 31, n.5/6, p. 435-438.

KLONICKI, Patricia et al. 1997. Crypto research: are fundamental data missing? **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 89, n. 9, p. 97-103.

KOSEK, Margaret et al. 2001. Cryptosporidiosis: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, Oxford, v.1, p. 262-269.

KRAMER, Michael H. et al. 1996. Waterborne disease: 1993 and 1994. **Journal of the American Water Works Associatio**, Denver, v. 88, n. 3, p. 66-80.

KRAMER, Michael H. et al. 2001. Waterborne diseases in Europe - 1989-96. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 93, p.48-53.

LANE, Samantha; LLOYD, David. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 28, n. 2, p. 123-147.

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

LECHEVALIER, Mark W.; NORTON, William D. 1995. *Giardia* and *Cryptosporidium* in raw finished water. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 87, n. 9, p. 54-68.

LECHEVALIER M. W. et al. 2003. Comparison of method 1623 and cell culture-PCR for detection of *Cryptosporidium* spp in source waters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 971-979.

LEITE, Enio Henriques; COBALCHINI, Maria Salete; ROESE, Ingrid Adegas. 2003a. Rio Taquari e Rio das Antas – RS: qualidade das águas superficiais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22., 2003, Joinville. **Anais**. Rio de Janeiro: ABES. VI-044.

LEITE, Enio Henriques; COBALCHINI, Maria Salete; ROESE, Ingrid Adegas. 2003b. Rio Caí-RS: qualidade das águas superficiais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22., 2003, Joinville. **Anais**. Rio de Janeiro: ABES. VI-045.

LEITE, Enio Henriques, COBALCHINI, Maria Salete, ROESE, Ingrid Adegas. 2003c. Rio dos Sinos-RS: qualidade das águas superficiais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22., 2003, Joinville. **Anais**. Rio de Janeiro: ABES. VI-046.

LEITE, Enio Henriques; COBALCHINI, Maria Salete; ROESE, Ingrid Adegas. 2003d. Rio Gravataí-RS: qualidade atual x enquadramento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22., 2003, Joinville. **Anais**. Rio de Janeiro: ABES. VI-047.

LEVINE, N. D. 1984. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). **The Journal of Protozoology**, Lawrence, v. 31, n. 1, p. 94-98.

LI, Sylvana Y. et al. 1997. Reliability of surrogates for determining *Cryptosporidium* removal. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 89, n. 5, p. 90-99.

MARA, D. D.; FEACHEM, R. G. A. 1999. Water- and excreta-related diseases: unitary environmental classification. **Journal of Environmental Engineering**, Reston, v. 125, n.4, p. 334-339.

MCCUIN, R.M.; BUKHARI, Z.; CLANCY, J.L. 2000. Recovery and viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia intestinalis* cysts using the membrane dissolution procedure. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, n. 8, p.700-707.

MCCUIN, R.M. et al. 2001. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 45, p. 69-76.

MCCUIN, R.M.; CLANCY, J.L. 2003. Modifications to United States Environmental Protection Agency Methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 267-264.

MCDONALD, Alicia C. et al. 2001. *Cryptosporidium parvum* – specific antibody responses among children residing in Milwaukee during the 1993 waterborne outbreak. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 183, n. 9, p. 1373-1379.

MEDEMA, G.J. et al. 1998. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 11, p. 4460-4466.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. 2003. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam. Artigo em avaliação.

MOURA, Hércules de; OLIVEIRA, Lúcia Maria de. 1985. *Cryptosporidium*: parasito de imunocomprometidos. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 198-202.

NEWMAN, Robert D. et al. 1999. Longitudinal study of *Cryptosporidium* infection in children northeast Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 180, n. 1, p. 167-176.

ODA, Takuya et al. 2000. Size selective continuous flow filtration method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Water Research**, New York, v. 34, n. 18, p. 4477-4481.

OUTBREAK of gastroenteritis associated with an interactive water fountain at a beachside park-Florida, 1999. 2000. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 284, n. 6, p.688-690.

PAYMENT, Pierre; PLANTE, Robert; CEJKA, Patrick. 2001. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 3, p. 188-193.

PILLAR, V. D. 2001. **MULTIV** v. 2.1 - Multivariate Exploratory Analysis, Randomization Testing and Bootstrap Resampling. Porto Alegre: UFRGS. 42 p.

PONTIUS, W. Frederick. 1998. Communicating ICR data on *Cryptosporidium*. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 90, n. 2, p. 21-27.

QUINTERO-BETANCOURT, Walter; PEELE, Emily R.; ROSE, Joan B. 2002. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* : a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 49, p. 209-224.

RÉ, André L. 1999. **Qualidade microbiológica e parasitológica de águas de consumo humano do Município de Araras-SP, com ênfase na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp e cistos de *Giardia lamblia***. Disponível em: < <http://www.unicamp.br/ib/parasito/cursoextensao/ambiental.html>>. Acesso em: 02 jan. 2002.



RIBEIRO, Maria Lúcia; De LUCA, Sérgio João. 1998. Tratamento de águas por filtração por membranas. In: CONGRESO INTERAMERICANO DE INGENIERIA SANITARIA Y AMBIENTAL, 26., 1998, Lima. [Temas]. Lima: AIDIS.

RICHARDSON, A.J.; FRANKENBERG, R.A.; BUCK, A.C. 1991. An outbreak of waterborne Cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire. **Epidemiological Infectious**, v. 107, n. 3, p. 485.

ROBERTSON, L.J. et al. 2000. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. **Water Research**, New York, v. 34, n. 8, p. 2310-2322.

ROSE, Joan B. 1988. Occurrence and significance of *Cryptosporidium* in water. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 80, n. 2, p. 53-58.

ROSE, Joan B. 1990. Emerging issues for the microbiology of drinking water. **Water Engineering and Management**, Des Plaines, v. 137, n. 7, p. 23-29.

ROSE, Joan B.; GERBA, Charles P. 1991. Use of risk assessment for development of microbial standards. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 29-34.

ROSE, Joan B.; HAAS, Charles N.; REGLI, S. 1991. Risk assessment and control of waterborne Giardiasis. **American Journal Public Health**, Boston, v. 81, n. 6, p. 709-713.

ROSE, Joan B. 1997. **Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications**. Disponível em :<<http://publhealth.annualreviews.org/search.dtl>>. Acesso em: 15 mar. 2002.

ROSE, Joan B; HUFFMAN, D.E.; Gennaccaro, A. 2002. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. **Fems Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 26, p.113-123.

ROSER, D. et al. 2001. Proficiency testing of *Cryptosporidium* and *Giardia* analyses – an Australian case study. In: IWA WORLD WATER CONGRESS, 2., 2001, Berlin. **Efficient Water Management**. London: IWA. Theme 5, topic 3.

SCHOR, Gustavo. 2000. **Germe que causa diarreia é detectado em água tratada**. Disponível em: <[http://www.estado.estadao.com.br/edicao/pano/00/03/16/cid\\_964.html](http://www.estado.estadao.com.br/edicao/pano/00/03/16/cid_964.html)>. Acesso em: 11 abr. 2002.

SHAW, Kathy; WALKER, Steve; KOOPMAN, Ben. 2000. Improving filtration of *Cryptosporidium*. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 92, n. 11, p.103-111.

SIMMONS III, Otto D. et al. 2001. Evaluation of USEPA method 1622 for detection of *Cryptosporidium* oocysts in stream waters. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 93, n. 1, p. 78-88.

SLIFKO, Teresa R.; SMITH, Huw V.; ROSE, Joan B. 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, p. 1379-1393.

SMITH, H.V. 1992. *Cryptosporidium* and water: a review. **Environmental Management**, New York, v. 16, n. 4, p. 443-451.

SOGAYAR, Maria Inês Terra Leme; GUIMARÃES, Semíramis. 2000. *Giardia lamblia*. In: NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu. cap. 14, p.107-113.

SOGAYAR, Roberto. 2001. Giardiase. In: FERREIRA, Water A.; ÁVILA, Sandra L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 23, p. 250-254.

STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 1998. 20. ed. Washington: American Public Health Association.

STATES, Stanley et al. 1997. Protozoa in river water: sources, occurrence, and treatment. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 89, n. 9, p.74-83.

STATES, Stanley et al. 2000. Membrane filtration as posttreatment. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 92, n. 8, p. 59-69.

SWALES, Claire.; WRIGHT, Stephen. 2000. Evaluation of a continuous flow centrifuge for recovery of *Cryptosporidium* oocysts from large volume water samples. **Water Research**, New York, v. 34, n. 6, p. 1962-1966.

SWERTFEGER, Jeff et al. 1999. Effect of filter media on cyst and oocyst removal. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 91, n. 9, p.90-100.

SZEWZYK, U. et al. 2000. Microbiological safety of drinking water. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 81-127.

TANRIVERDI, Sultan et al. 2003. Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 130, p. 13-22.

TARQUIN, Anthony J., HAAN Gregg B., RITTMANN, Douglas. 1998. Polymer cost and performance evaluation. **Water Engineering and Management**, Des Plaines, v.145, n. 1, p. 27-31.

TILLET, H.E.; SELLWOOD, J.; LIGHTFOOT, N.F.; BOYD, P.; EATON, S. 2001. Correlations between microbial parameters from water samples: expectations and reality. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 43, n. 12, p. 19-22.

TOZE, Simon. 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. **Water Research**, New York, v. 33, n. 17, p. 3545-3556.

VESEY, Graham; SLADE, John. 1991. Isolation and identification of *Cryptosporidium* from water. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 24, n. 2, p.165-167.

VIEIRA, Maria B.C.M. 2002. **Avaliação da eficiência do processo da filtração lenta na remoção de oocistos de *Cryptosporidium* sp e cistos de *Giardia* spp, em modelos reduzidos.** Tese (Doutorado) - Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VIEIRA, Maria B.C.M. et al. 2000. 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: SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 9., 2000, Porto Seguro. Rio de Janeiro: ABES.

VITOR, Ricardo Wagner de Almeida. 2000. In: NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu. cap. 5, p. 24-26.

WARE, W. Michael et al. 2003. Evaluation of an alternative IMS dissociation procedure for use with Method 1622: detection of *Cryptosporidium* in water. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam. No prelo.

WEBER, David J.; RUTALA, William A. 2001. The emerging nosocomial pathogens *Cryptosporidium*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Helicobacter pylori* e hepatitis C: Epidemiology, environmental survival, efficacy of disinfectin, and control measures. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 22, n. 5, p. 306-322.

WEBSTER, K. A. et al. 1996. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in faeces: comparison of conventional coproscopical methods and the polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 61, p. 5-13.

WESTRELL, Therese; BERGSTEDT, Olof; STENSTRÖM, Thor A. 2001. Risk for infection *Cryptosporidium* estimated from particle size. In: IWA WORLD WATER CONGRESS, 2., 2001, Berlin. **Efficient Water Management**. London: IWA. Theme 5, topic 3.

WHITMORE, T.N.; CARRINGTON, E.G. 1993. Comparison of methods for recovery of *Cryptosporidium* from water. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 27, n. 3/4, p. 69-76.

XIAO, Lihua et al. 2001. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 183, n. 3, p. 492-498.

ZUCKERMAN, U. et al. 1997. The presence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in surface waters and effluents in Israel. **Water Science and Technology**, Oxford, v.35, n. 11/12, p. 381-384.

## Anexos

## Anexo 1 - Metodologias de coloração

### 1.1) Coloração com DAPI

- ? 2,0 mL de reagente de detecção
- ? 1,0 mL de corante de contraste
- ? 50 mL de tampão de lavagem
- ? 0,5 mL de controle positivo
- ? 0,5 mL de controle negativo
- ? 3,0 mL de meio de montagem
- ? 25 lâminas para Imunofluorescência
- ? 50 alças de inoculação ou transferência

As amostras são coradas com anticorpos monoclonais, gênero específico, conjugados à fluoresceína-isothiocianato (FITC-mAb) que conferem fluorescência típica aos (oo)cistos. O material para esta etapa da coloração encontra-se no kit Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* (Meridian Diagnostic, cat. no. 250050).

- 1) Em cada poço da lâmina eram colocados 5  $\mu$ L de NaOH (0,1M) para neutralizar o ácido
- 2) Sobre o NaOH (0,1M) postos 10 $\mu$ L do material concentrado e purificado, num total de 30  $\mu$ L
- 3) Deixava-se a lâmina secar à temperatura ambiente.
- 4) Colocava-se uma gota do reagente de detecção e uma gota de corante de contraste em cada poço.
- 5) Espalhava-se sobre toda a superfície com uma alça de transferência, se necessário.
- 6) Colocava-se a lâmina numa câmara úmida no escuro e incubava-se à temperatura ambiente, por aproximadamente 30 min
- 7) Após os 30 min, era colocado uma gota de tampão de lavagem (1:10) em cada poço. A lâmina era inclinada sobre uma folha limpa de papel. O excesso de reagentes era aspirado.
- 8) Aplicava-se 50  $\mu$ L de solução corante de DAPI (1/5000 em PBS) em cada poço. Deixava-se a lâmina em repouso à temperatura ambiente, por aproximadamente 1 min.
- 9) Era colocada novamente uma gota de tampão de lavagem (1:20) em cada poço. A lâmina era inclinada sobre uma folha limpa de papel. O excesso de reagentes era aspirado.

10) Era adicionada uma gota de meio de montagem em cada poço, e colocava-se a lamínula.

11) O exame das lâminas era feito em microscópio ZEISS™ – Germany Axiophot (UV- com filtro II- 340–395/ FT 460 LP 470) no Depto. de Genética da UFRGS. Utilizando um aumento de 200x, os objetos eram identificados como potenciais cistos se apresentavam formas ovais com aproximadamente 8 -14  $\mu\text{m}$  e oocistos se apresentavam formas esféricas com aproximadamente 4-6  $\mu\text{m}$ , além de aparência maçã-brilhante fluorescente, para ambos. A confirmação era feita utilizando aumento de 400x.

## 1.2) Método modificado de Kinyoun (a frio)

### Soluções:

- corante de Kinyoun
- álcool-ácido
- aquosa de verde de malaquita

### Coloração da amostra:

- 1) Eram colocados 10 $\mu\text{L}$  do material, concentrado e purificado, em cada lâmina, num total de  
30  $\mu\text{L}$
- 2) O material era fixado com álcool metílico por 30 seg.
- 3) Corado com corante de Kinyoun por 1 min
- 4) Diferenciado com solução álcool-ácido por 2 min
- 5) O fundo da preparação era corado com solução de verde malaquita a 3% por 2 min
- 6) A lâmina era então lavada com água destilada e posta para secar
- 7) Depois de seca a lâmina era montada com Entellan
- 8) As lâminas eram examinadas em microscópio (marca Jenaval, binocular) com objetiva de imersão
- 9) Os objetos eram identificados como potenciais oocistos se apresentavam formas esféricas com aproximadamente 4-6  $\mu\text{m}$ , com uma coloração normalmente púrpura intenso.



### 1.3) Método modificado da Safranina (a quente)

#### Soluções:

- aquosa de Safranina
- aquosa de verde de malaquita
- ácido-álcool

#### Coloração da amostra

- 1) Eram colocados 10 $\mu$ L do material concentrado e purificado em cada lâmina, num total de 30  $\mu$ L
- 2) O material era seco pelo aquecimento
- 3) Fixado com álcool-ácido por 3 a 5 min
- 4) Lavado rapidamente com água destilada
- 5) Corado com a Safranina a 1% por 1 min aquecendo a lâmina, em chapa elétrica, até a emissão de vapores
- 6) A lâmina era lavada rapidamente com água destilada e drenada
- 7) O fundo da preparação era corado com solução verde-malaquita a 3% por 2 min
- 8) A lâmina era então lavada com água destilada e posta para secar
- 9) Depois de seca era montada com Entellan
- 10) As lâminas eram examinadas em microscópio (marca Jenaval binocular) com objetiva de imersão
- 11) Os objetos eram identificados como potenciais oocistos se apresentavam formas esféricas com aproximadamente 4-6  $\mu$ m, com uma coloração normalmente púrpura intenso.

### 1.4) Método Iodo de Lugol

#### Solução

- Iodo de Iodo Lugol

## Coloração da amostra

- 1) Eram colocados 10 $\mu$ L do material concentrado e purificado em cada lâmina, num total de 30 $\mu$ L
- 2) O material era seco por aquecimento
- 3) Era colocada uma gota da solução corante sobre cada poço
- 4) Sobre o material era colocada uma lamínula
- 5) As lâminas eram examinadas em microscópio (marca Jenaval binocular) com aumento de 400x
- 6) Os objetos eram identificados como potenciais cistos se apresentavam formas ovais com aproximadamente 8 -14  $\mu$ m, com uma coloração que variava do amarelo ao marrom.

## 1.5) Método Corante Iodo Tricrômico

### Soluções

- Iodo de Lugol
- Corante Iodo Tricrômico

### Coloração da amostra

- 1) Eram colocados 10 $\mu$ L do material concentrado e purificado em cada lâmina, num total de 30 $\mu$ L
- 2) O material era seco pelo aquecimento
- 3) Era colocada uma gota da solução corante iodo e, sobre esta, uma gota do corante Iodo Tricrômico em cada poço
- 4) Sobre o material era colocada uma lamínula
- 5) As lâminas eram examinadas em microscópio (marca Jenaval binocular) com aumento de 400x
- 6) Os objetos eram identificados como potenciais cistos se apresentavam formas ovais com aproximadamente 8 -14  $\mu$ m, com uma coloração verde escuro.

## Anexo 2 - Resultados das análises físico-químicas e biológicas dos Rios Taquari, Cai, dos Sinos e Gravataí

Anexo 2.1 - Resultados de análises físico-químicas e biológicas do Rio Taquari, ponto TA 004, nos anos de 2002 e 2003.

FEPAM - FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL						
Divisão de Planejamento e Diagnóstico						
Monitoramento da Qualidade da Água						
<b>R I O T A Q U A R I</b>						
Ponto de Coleta : TA 004						
Local:Rio Taquari, 4 km da confluência com o rio Jacuí						
Município:Triunfo						
Coordenadas :Latitude Sul:S 29° 55' 45,2"/Longitude Oeste:W 51° 43' 50,4"						
<b>Ano 2002</b>						
Parâmetros	Unidade	17/03/02	17/06/02	18/09/02	18/12/02	Média
Turbidez	UNT	44,00	39,00	41,00	30,00	38,50
ST	mg/l	103,00	65,00	77,00	67,00	78,00
pH		6,80	7,20	6,70	6,00	6,68
OD	mg/l	2,30	6,90	8,60	5,60	5,85
DBO <sub>5</sub>	mg/l	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
NTK	mg/l	0,7700	0,6500	0,5400	0,6700	0,66
Fosfato total	mg/l	0,0644	0,0846	0,0649	0,0643	0,07
Col.fecais/ <i>E.coli</i>	NMP/100ml	70	500			285,00
DQO	mg/l	17,00	11,00	10,00	11,00	12,25
Temp. água	°C	30,70	16,00	17,60	26,80	22,78
Condutividade	µhos/cm	12,80	36,40	42,80	44,60	34,15
<b>Ano 2003</b>						
Parâmetros	Unidade	03/04/03	16/06/03	25/09/03	11/12/03	Média
Turbidez	UNT	22,00	70,00	16,00	44,00	38,00
ST	mg/l	67,00	109,00	75,00	94,00	86,25
pH						0,00
OD	mg/l	7,60	12,00	9,20	7,00	8,95
DBO <sub>5</sub>	mg/l	1,00	1,00	1,00		1,00
NTK	mg/l	0,8300	0,6400	0,6200	0,8500	0,74
Fosfato total	mg/l	0,0275	0,0600	0,0460	0,0840	0,05
Col.fecais/ <i>E.coli</i>	NMP/100ml	6		6	210	74,00
DQO	mg/l	5,00	15,00	10,00	9,00	9,75
Temp. água	°C	23,00	17,00	18,60	23,00	20,40
Condutividade	µhos/cm	57,60	43,50	62,60	12,30	44,00

Fonte: FEPAM

Anexo 2.2 - Resultados de análises físico-químicas e biológicas do Rio Cai, ponto CA 014, nos anos de 1999 e 2000.

FEPAM - FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL					
Divisão de Planejamento e Diagnóstico					
Monitoramento da Qualidade da Água					
<b>R I O C A Í</b>					
Ponto de Coleta : CA 014					
Local: Em frente a captação da CORSAN e Regional Pólo/Fepam (antigo CA 13.3)					
Município: Triunfo					
Coordenadas: Latitude Sul : S 29° 52' 19"/Longitude Oeste :W 51° 21' 47"					
Parâmetros	Unidade	02/03/99	09/06/99	02/09/99	Média
Turbidez	UNT	25,00	25,00	66,00	38,7
ST	mg/l		100,00	101,00	100,5
pH		6,60	6,30	6,20	6,4
OD	mg/l	7,60	6,00	6,30	6,6
DBO <sub>5</sub>	mg/l	4,00	1,00	1,00	2,0
NTK	mg/l	0,9800	0,6000	0,6900	0,76
Fosfato total	mg/l	0,0946	0,0446	0,1080	0,08
Col.fecais/ <i>E.coli</i>	NMP/100ml	50	40	20	36,7
DQO	mg/l	19,00	11,00	18,00	16,0
Temp. água	°C	30,50	13,80	17,80	20,7
Condutividade	µhos/cm	140,70	77,50	71,10	96,4
<b>Ano 2000</b>					
Parâmetros	Unidade	03/04/00	27/06/00	-	Média
Turbidez	UNT	26,00	36,00	-	31,0
ST	mg/l	119,00	96,00	-	107,5
pH		7,00	6,90	-	7,0
DBO <sub>5</sub>	mg/l	2,00	1,00	-	1,5
OD	mg/l	4,60	8,80	-	6,7
NTK	mg/l	0,6400	0,5700	-	0,61
Fosfato total	mg/l	0,1360	0,0932	-	0,11
Col.fecais/ <i>E.coli</i>	NMP/100ml	148	240	-	194,0
DQO	mg/l	11,00	9,00	-	10,0
Temp. água	°C	23,60	13,80	-	18,7
Condutividade	µhos/cm	108,60	87,00	-	97,8

Fonte: FEPAM

Anexo 2.3 - Resultados de análises físico-químicas e biológicas do Rio dos Sinos, ponto SI 008, no ano de 2002.

FEPAM - FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL Divisão de Planejamento e Diagnóstico Monitoramento da Qualidade da Água <b>PRO GUAÍBA</b> <b>R I O d o s S I N O S</b>													
Ponto :SI 008 Município:Canoas Local :Ponte da rodovia BR-386 Tabai-Canoas Entidade :FEPAM Coordenadas:Latitude Sul :S 29° 52' 36"/Longitude Oeste :W 51° 14' 34"													
Parâmetros	Unidade	09/01/02	06/03/02	03/04/02	07/05/02	04/06/02	02/07/02	07/08/02	03/09/02	02/10/02	05/11/02	05/12/02	Média
Turbidez	UNT	27,00	51,00	39,00	47,00	57,00	42,00	59,00	29,00	63,00	44,00	81,00	48,33
ST	mg/l	106,00	121,00	108,00	104,00	129,00	130,00	100,00	80,00	141,00	75,00	129,00	110,50
pH		6,80	6,40	6,60	6,50	6,90	6,60	6,50	6,30	6,70	6,80	6,50	6,61
OD	mg/l	4,20	1,20	1,40	3,10	3,00	2,10	6,40	3,20	1,70	2,00	2,80	2,72
DBO <sub>5</sub>	mg/l	5,00	1,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00	1,83
NTK	mg/l	3,34	1,95	2,08	1,47	1,84	2,33	0,74	1,11	1,30	0,76	1,36	1,68
Fosfato total	mg/l	0,1940	0,3540	0,2530	0,2530	0,2090	0,2060	0,1730	0,1440	0,1660	0,3210	0,2260	0,23
C.fecais/ <i>E.coli</i>	NMP/100ml	1.000	4.700	1.000	170	7.000	3.000	1.800	1.100	860		10.000	3302,73
DQO	mg/l	25,00	19,00	15,00	21,00	26,00	18,00	10,00	15,00	22,00	12,00	19,00	18,08
Temp.água	°C	29,00	26,50	25,60	18,50	19,40	15,00	14,30	15,00	20,00	20,00	24,30	21,24
Condutividade	µhos/cm	152,30	188,90	24,60	101,10	107,00	122,50	68,00	90,70	86,20	65,30	81,40	100,38

Fonte: FEPAM

Anexo 2.4 - Resultados de análises físico-químicas e biológicas do Rio dos Sinos, ponto SI 008, no ano de 2003.

FEPAM - FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL Divisão de Planejamento e Diagnóstico Monitoramento da Qualidade da Água <b>PRO GUAÍBA</b> <b>R I O d o s S I N O S</b>													
Ponto :SI 008 Município:Canoas Local :Ponte da rodovia BR-386 Tabai-Canoas Entidade :FEPAM Coordenadas:Latitude Sul :S 29° 52' 36"/Longitude Oeste :W 51° 14' 34"													
Parâmetros	Unidade	08/01/03	06/02/03	13/03/03	08,04/03	06/05/03	03/06/03	03/07/03	13/08/03	10/09/03	09/10/03	04/12/03	Média
Turbidez	UNT	37,00	65,00	66,00	18,00	37,00	41,00	20,00	22,00	46,00	101,00	38,00	43,50
ST	mg/l	129,00	111,00		91,00	114,00	161,00	92,00	85,00	140,00	170,00	111,00	117,73
pH		7,00	6,00	6,00	6,00	6,70	6,00	6,90			6,80	6,60	6,44
OD	mg/l	2,20	0,60	4,60	4,10	4,80	2,70	3,40	3,50	3,90	3,30	2,10	3,28
DBO <sub>5</sub>	mg/l	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00	10,00	1,00	2,00	3,00	1,00	2,00	2,42
NTK	mg/l	2,47	2,34	2,26	1,98	2,11	5,63	1,93	3,02	3,81	2,31	2,47	2,65
Fosfato total	mg/l	0,1710	0,9260	0,1870	0,1490	0,1090	0,4770	0,1200	0,1530	0,2290	0,2250	0,1870	0,25
C.fecais/ <i>E.coli</i>	NMP/100ml	1.200	1.700	10.000		760		170	110	3.000	2.300		2405,00
DQO	mg/l	16,00	20,00	21,00	13,00	16,00	24,00	13,00	19,00	17,00	18,00	17,00	17,25
Temp.água	°C	29,30	28,00	26,30	23,50	19,00	15,00	18,50	17,50	17,00	21,00	25,90	22,19
Condutividade	µhos/cm	128,00	102,30	117,20	119,50	24,40	194,60	111,10	149,50	155,20	110,10	125,40	113,31

Fonte: FEPAM

Anexo 2.5 - Resultados de análises físico-químicas e biológicas do Rio Gravataí, ponto GR006, no ano de 2002.

FEPAM - FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL													
Divisão de Planejamento e Diagnóstico													
Monitoramento da Qualidade da Água													
<b>R I O G R A V A T A Í</b>													
Ponto : GR 006													
Município: Porto Alegre													
Local : Foz do arroio da Areia (dique de montante)													
Entidade: FEPAM													
Coordenadas: Latitude Sul :S 29° 57' 37"/Longitude Oeste :W 51° 08' 34"													
Parâmetros	Unidade	10/01/02	21/02/02	04/04/02	08/05/02	05/06/02	04/07/02	06/08/02	04/09/02	03/10/02	06/11/02	04/12/02	Média
Turbidez	UNT	64,00	46,00	47,00	69,00	49,00	46,00	54,00	56,00	329,00	65,00	90,00	81,83
ST	mg/l	175,00	113,00	144,00	132,00	111,00	86,00	87,00	107,00	347,00	108,00	125,00	141,25
pH		7,00	6,30	6,80	6,60	6,70	6,30	6,80	6,60	6,60	6,10	6,40	6,59
OD	mg/l	0,00	0,70	0,50	1,30	2,00	2,90	3,40	5,30	10,90	1,10	2,10	2,52
DBO <sub>5</sub>	mg/l		5,00	8,00	5,00	5,00	3,00	1,00	3,00	10,00	3,00	4,00	4,82
NTK	mg/l	11,5000	3,3700	10,2000	3,9900	2,4000	2,2700	0,9700	2,4000	3,3700	1,9800	2,4800	4,64
Fosfato total	mg/l	1,4000	0,5980	0,7090	0,4420	0,3110	0,3340	0,1110	0,2900	0,2970	0,3050	0,3730	0,50
C.fecais/ <i>E.coli</i>	NMP/100ml	410.000	20.000	24.000	1.600	29.000	93.000	3.600	45.000	170.000		98.000	103109
DQO	mg/l	64,00	53,00	36,00	40,00	45,00	33,00	33,00	37,00	41,00	29,00	35,00	40,25
Temp.água	°C	29,00	29,00	24,50	20,00	19,00	17,00	14,00	14,70	20,00	20,00	23,00	21,63
Condutividade	µhos/cm	56,00	178,90	35,00	224,00	148,00	91,70	49,30	82,20	107,90	86,40	101,80	113,12

Fonte: FEPAM

Anexo 2.6 - Resultados de análises físico-químicas e biológicas do Rio Gravataí, ponto GR006, no ano de 2003.

FEPAM - FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL													
Divisão de Planejamento e Diagnóstico													
Monitoramento da Qualidade da Água													
<b>R I O G R A V A T A Í</b>													
Ponto : GR 006													
Município: Porto Alegre													
Local : Foz do arroio da Areia (dique de montante)													
Entidade: FEPAM													
Coordenadas: Latitude Sul :S 29° 57' 37"/Longitude Oeste :W 51° 08' 34"													
Parâmetros	Unidade	07/01/03	05/02/03	12/03/03	07/04/03	05/05/03	02/06/03	02/07/03	12/08/03	09/09/03	08/10/03	11/11/03	Média
Turbidez	UNT	65,00	38,00	118,00	47,00	45,00	40,00	45,00	50,00	53,00	93,00	69,00	63,33
ST	mg/l	140,00	163,00	-	116,00	134,00	156,00	99,00	144,00	137,00	167,00	132,00	138,55
pH		5,50	6,00	6,00	6,50	6,00	-	8,00	-	6,00	6,70	-	6,31
OD	mg/l	0,00	4,70	0,00	2,10	2,70	0,10	5,30	-	1,40	1,10	2,50	1,94
DBO <sub>5</sub>	mg/l	5,00	8,00	7,00	5,00	7,00	12,00	3,00	-	8,00	5,00	4,00	6,00
NTK	mg/l	7,0900	8,4000	4,3700	6,4400	4,9800	10,9000	2,1000	7,6400	5,3300	4,7200	3,7700	5,85
Fosfato total	mg/l	0,6910	1,0600	0,7600	0,7060	0,4510	-	0,2450	0,7840	0,5990	0,5130	0,3930	0,61
C.fecais/ <i>E.coli</i>	NMP/100ml	220.000	460.000	96.000	-	38.000	-	32.000	1.300	1.600	-	-	121271,43
DQO	mg/l	41,00	54,00	38,00	42,00	35,00	44,00	35,00	42,00	32,00	41,00	39,00	39,92
Temp.água	°C	28,90	32,00	27,90	22,00	20,00	17,50	16,10	15,00	19,60	21,60	25,00	22,72
Condutividade	µhos/cm	162,40	228,00	146,50	132,00	29,80	248,00	83,50	180,90	208,00	148,90	23,10	134,98

Fonte: FEPAM



Anexo 2.7 - Dados de vazão (m<sup>3</sup>/s) dos Rios Taquari, Cai, dos Sinos e Gravataí.

	Taquari	Cai	dos Sinos	Gravataí
ago/02	693	493	252	93
set/02	506	273	88	38
out/02	1161	926	121	43
nov/02	2186	1231	310	53
dez/02	1071	540	132	39
jan/03	249	264	22	14
fev/03	320	146	23	11
mar/03	231	195	32	17
abr/03	136	99	22	15
mai/03	516	188	91	16
jun/03	552	391	97	15
jul/03	755	182	94	29

Fonte CPRM

### Anexo 3 - Resultados das análises físico-químicas e biológicas

Anexo 3.1 - Resultados das análises realizadas no rio Taquari entre agosto/2002 e julho 2003 (Local da tomada d'água agosto/2002 a) janeiro/2003, próximo, ao km 04, de fevereiro a julho/(2003 dentro da ETA General Câmara).

Parâmetro	Unidade	ago/02	set/02	out/02	nov/02	dez/02	jan/03	fev/03	mar/03	abr/03	mai/03	jun/03	jul/03	Média
Temperatura	°C	16,2	17,1	19,3	21	23	27,6	29,4	26,9	23,5	18,7	17,8	17,6	21,5
Turbidez	UNT	32	15	35	26,5	45	22	47	48	12,5	34	19,5	20	29,7
Sólidos Totais	mg/L	98	123	135	94	130	106	193,5	129	63	97,5	73,5	66,5	109
pH		7,5	7,6	7,5	7,1	8,1	7,2	7,4	7,3	7,2	6,9	6,9	7	7,3
Condutividade	µS/cm	0,05	0,08	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,06	0,06	0,05
UV 254	cm <sup>-1</sup>	0,15	0,16	0,15	0,14	0,18	0,39	0,50	0,16	0,13	0,33	0,32	0,16	0,23
OD	mg/L	4,5	4,2	4,7	4,2	4	4,4	4,2	4,7	6	3,8	6,2	5,8	4,7
DBO <sub>5</sub>	mg/L	1,1	4,3	0,9	0,5	1,7	1,3	5,9	3,7	3,4	6,1	16,7	2,1	4,0
DQO	mg/L	14	24,2	11	6,7	14,3	4,6	12	8,5	5,2	16	22	5,5	12,0
NTK	mg/L	0,82	0,76	0,47	0,59	0,65	0,59	0,80	1,27	0,53	0,67	0,67	0,33	0,68
Fósforo Total	mg/L	0,08	0,10	0,23	0,15	0,11	0,08	0,12	0,06	0,05	0,08	0,05	0,04	0,09
Col. Fecais/ <i>E.coli</i>	NMP/100mL	1120	108	2910	816	1414	112	35	72	2	35	3790	22	870
C/Imuno	oocistos/100L	39	56	61	0	139	0	0	61	0	0	222	383	80
C/Kinyoun	oocistos/100L	0	0	0	0	76	0	88	0	0	71	0	0	20
C/Safranina	oocistos/100L	0	0	0	0	130	0	150	0	0	0	0	0	23
G/Imuno	cistos/100L	0	14	195	159	173	68	259	0	0	0	241	314	119
G/Iodo Lugol	cistos/100L	0	0	50	0	0	0	515	165	255	185	600	345	176
G/ Iodo Tricrômico	cistos/100L	0	0	0	0	0	75	220	0	65	370	535	605	156

C- *Cryptosporidium* G- *Giardia*

Anexo 3.2 - Resultados das análises realizadas no rio Cai entre agosto/2002 e julho/2003 (Local da tomada d'água: agosto/2002 a). janeiro/2003, próximo ao km 14, de fevereiro a julho/(2003 dentro da ETA Montenegro).

Parâmetro	Unidade	ago/02	set/02	out/02	nov/02	dez/02	jan/03	fev/03	mar/03	abr/03	mai/03	jun/03	jul/03	Média
Temperatura	°C	15	16,2	18,7	20	22	27,3	27,2	26,2	21,2	17,6	15,8	16,5	20,3
Turbidez	UNT	23	8	58	38	77,5	15,5	77	41	14	21	15,5	11	33,3
Sólidos Totais	mg/L	115	13	210	100	203,5	97,5	202	82,5	93,5	103,5	111,5	73	117,1
pH		7,4	7,5	7,0	7,1	7,2	7,4	7,1	7,2	7,1	7,3	7,1	7,2	7,2
Condutividade	µS/cm	0,06	0,05	0,08	0,06	0,07	0,09	0,07	0,06	0,08	0,08	0,11	0,09	0,07
UV 254	cm <sup>-1</sup>	0,15	0,15	0,16	0,13	0,19	0,47	0,46	0,14	0,10	0,07	0,14	0,07	0,19
OD	mg/L	4,8	4,7	4	4,2	3,7	3,4	3,4	5,3	6,8	6	6,7	5,9	4,9
DBO <sub>5</sub>	mg/L	1,8	4,7	1,5	0,9	1,9	2,0	4,9	5,4	2,4	8,5	9,2	9,8	4,4
DQO	mg/L	12	8,2	19	8	12,8	4,4	14	10,8	10,8	16,1	13,5	14,2	12,0
NTK	mg/L	1,88	1,65	1,29	0,71	1,18	0,88	1,40	1,47	0,73	0,60	0,93	0,33	1,09
Fósforo Total	mg/L	0,07	0,11	0,45	0,28	0,26	0,10	0,20	0,08	0,08	0,09	0,04	0,06	0,15
Col. Fecais/ <i>E.coli</i>	NMP/100mL	10460	5470	6490	3650	6130	3450	1300	1250	285	1670	3879	546	3715
C/Imuno	oocistos/100L	0	0	28	61	72	0	0	0	0	0	222	183	47
C/Kinyoun	oocistos/100L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C/Safranina	oocistos/100L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400	0	33
G/Imuno	cistos/100L	0	50	64	50	0	68	68	0	0	0	241	150	58
G/Iodo Lugol	cistos/100L	0	0	55	0	0	0	0	75	60	155	200	250	66
G/Iodo Tricrômico	cistos/100L	0	115	0	0	0	0	0	75	0	155	200	165	59

C- *Cryptosporidium* G- *Giardia*

Anexo 3.3 - Resultados das análises realizadas no rio dos Sinos entre agosto/2002 e julho/2003 (Local da tomada d'água: agosto/2002 a janeiro/2003, próximo ao km 08, de fevereiro a julho/2003 dentro da ETA Niterói).

Parâmetro	Unidade	ago/02	set/02	out/02	nov/02	dez/02	jan/03	fev/03	mar/03	abr/03	mai/03	jun/03	jul/03	Média
Temperatura	°C	16,3	18,2	20,1	21	24	27,5	30,5	28,5	24,1	20,1	17,3	18,3	22,2
Turbidez	UNT	32	17	31,5	21	49	22	25	35	20	30	25,5	17	27,1
Sólidos Tot.	mg/L	128	136	141	78	155	114	124,5	93	85	135	151	135,5	123,0
pH		7	7,1	6,4	6,6	6,6	7,0	6,1	7,1	6,8	6,8	7,3	6,9	6,8
Condutividade	µS/cm	0,08	0,09	0,11	0,08	0,10	0,09	0,10	0,10	0,07	0,09	0,22	0,12	0,10
UV 254	cm <sup>-1</sup>	0,21	0,19	0,21	0,18	0,22	0,45	0,32	0,24	0,13	0,23	0,32	0,24	0,25
OD	mg/LO <sub>2</sub>	4	3,6	3,5	3,5	2,9	3,2	2,6	1,9	4,0	3,5	3,7	3,9	3,4
DBO <sub>5</sub>	mg/LO <sub>2</sub>	5,9	3,9	2,5	1,0	2,8	2,4	6,8	9,9	9,5	8,8	22,1	11,8	7,3
DQO	mg/LO <sub>2</sub>	14,6	12,7	16,4	15,6	14,1	8,8	19	15	14,1	21,6	28	16,7	16,4
NTK	mg/LN <sub>2</sub>	1,41	1,41	1,65	0,18	1,76	2,47	1,07	2,47	1,07	0,93	9,60	2,00	2,2
Fósforo Total	mg/L	0,16	0,21	0,21	0,13	0,22	0,22	0,12	0,15	0,10	0,14	1,12	0,11	0,24
Col. Fecais/ <i>E.coli</i>	NMP/100mL	4610	19860	2419	1300	1986	4610	345	370	35	46	206000	117	20142
C/Imuno	oocistos/100L	0	17	39	0	0	0	0	78	0	0	0	94	19
C/Kinyoun	oocistos/100L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C/Safranina	oocistos/100L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G/Imuno	cistos/100L	0	0	18	0	0	0	64	0	0	0	55	150	24
G/Iodo Lugol	cistos/100L	0	0	0	0	65	0	215	70	120	0	0	165	53
G/ Iodo Tricrômico	cistos/100L	0	0	0	0	0	0	70	145	120	60	0	85	40

C- *Cryptosporidium*; G - *Giardia*

Anexo 3.4 - Resultados das análises realizadas no rio Gravataí entre agosto/2002 e julho/2003 (Local da tomada d'água: agosto/2002 a). janeiro/2003, próximo ao km 06, de fevereiro a julho/2003 dentro da ETA Alvorada).

Parâmetro	Unidade	ago/02	set/02	out/02	nov/02	dez/02	jan/03	fev/03	mar/03	abr/03	mai/03	jun/03	jul/03	Média
Temperatura	°C	16,8	18,6	20,3	21	23,4	28,4	28,6	29,8	23	19,7	15,9	18,2	22,0
Turbidez	UNT	22	14	22	27	50	27,5	49	29	24	25	21	15	27,1
Sólidos Tot.	mg/L	97	151	128	114	190	158,5	152	93	100	121,5	99,5	65	122,5
pH		6,8	7	6,5	6,2	5,9	7,0	6,7	6,9	6,6	6,7	6,5	6,5	6,6
Condutividade	µS/cm	0,07	0,10	0,10	0,07	0,13	0,18	0,07	0,06	0,05	0,07	0,07	0,06	0,09
UV 254	cm <sup>-1</sup>	0,45	0,48	0,48	0,35	0,38	0,85	0,73	0,64	0,48	0,45	0,59	0,46	0,53
OD	mg/LO <sub>2</sub>	3,9	3	0,9	3	2,8	0,3	1,9	3,6	5,6	4	3,9	4	3,1
DBO <sub>5</sub>	mg/LO <sub>2</sub>	6,9	5,9	2,0	1,0	4,3	2,2	9,8	5,8	7,1	10,5	18,0	7,2	6,7
DQO	mg/LO <sub>2</sub>	26	20,5	14,5	26,8	23,1	26,3	21,7	31,5	31,5	21,8	31,1	20,3	24,6
NTK	mg/LN <sub>2</sub>	3,18	2,70	2,18	1,47	3,41	6,47	1,73	3,13	1,27	1,20	1,33	0,93	2,42
Fósforo Total	mg/L	0,22	0,46	0,29	0,18	0,35	0,73	0,13	0,10	0,11	0,10	0,06	0,06	0,23
Col. Fecais/ <i>E.coli</i>	NMP/100mL	24190	68700	41100	8160	64900	155300	46	76	307	249	148	133	30276
C/Imuno	oocistos/100L	83	28	0	78	0	0	0	0	0	0	0	0	16
C/Kinyoun	oocistos/100L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C/Safranina	oocistos/100L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G/Imuno	cistos/100L	0	0	0	0	0	68	0	0	0	0	0	68	11
G/Iodo Lugol	cistos/100L	0	0	0	0	0	155	390	80	0	365	115	0	92
G/Iodo Tricrômico	cistos/100L	0	0	0	0	0	75	80	80	0	75	60	0	31

C- *Cryptosporidium*; G - *Giardia*