



I-194 – OCORRÊNCIA DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. E CISTOS DE *GIARDIA* SPP. EM SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ÁGUA DA GRANDE VITÓRIA, ES

Marcus Andrade Covre⁽¹⁾

Biólogo pela Faculdade de Meio Ambiente e Saúde de Vitória. Especialista em Biotecnologia pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Mestre em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Edumar Ramos Cabral Coelho

Engenheira Civil pela Universidade Federal do Espírito Santo. Doutora em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP). Professora Adjunto do Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo.

Regina de Pinho Keller

Bióloga pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Pós-Doutora em Microbiologia Ambiental pela University of Ottawa. Professora Adjunto do Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo.

Fabíola do Nascimento Rosa

Bióloga pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Endereço⁽¹⁾: Rua Maria Eleonora Pereira, 150/101 – Jardim da Penha - Vitória - ES - CEP: 29060-180 - Brasil - Tel: (27) 3227 0356 - e-mail: marcuscovre@uol.com.br

RESUMO

A emergência, nas últimas décadas, dos protozoários *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* como principais causadores de doenças gastrointestinais relacionadas ao consumo de água em países desenvolvidos, tem chamado a atenção das organizações internacionais de saúde para uma intervenção nos padrões de qualidade da água para abastecimento público. A pesquisa foi realizada no período de abril de 2008 a março de 2009, em dois sistemas de tratamento de água do Estado do Espírito Santo. O sistema A, utiliza o tratamento do tipo filtração direta, que em situações de turbidez elevada na água bruta (> 30 uT) tem a opção de operar por flotação. O sistema B possui duas linhas independentes de tratamento, uma por filtração direta e outra por tratamento convencional. A concentração dos cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* foi realizado por floculação com carbonato de cálcio, e a identificação por imunofluorescência direta e contraste de fase. Nos testes de sensibilidade da técnica de concentração, a água bruta foi a matriz com maior recuperação para ambos os protozoários (Crypto = 43,00%; Giardia = 72,71%). Segundo o teste de Duncan, a água filtrada e destilada não apresentou diferenças significativas na recuperação dos protozoários. Os cistos de *Giardia* apresentaram ser mais bem recuperados do que os oocistos de *Cryptosporidium*. Foi identificada a presença dos protozoários nos mananciais abastecedores, na água filtrada dos tratamentos por filtração direta e flotação. Não foi detectada a presença de cistos e oocistos no efluente filtrado do tratamento convencional e na água tratada dos reservatórios. A flotação, em alguns momentos, superou 2,0 log de remoção, mas a maioria dos casos as taxas de remoção foram inferiores a este limite, apresentando a pior taxa de remoção de *Cryptosporidium* (0,52 log). Apesar da remoção de *Giardia* ser de 100% em dois períodos em que foi identificada na água bruta (2/3), no mês em que foi detectada apresentou remoção de apenas 1,36 log. A ETA de filtração direta do sistema B não atingiu o mínimo recomendado de 2,0 log de remoção de cistos de *Giardia*. A remoção de oocistos de *Cryptosporidium* foi superior a 2,0 log em dois momentos (maio de 2008=2,20 log; julho de 2008=2,08 log), mas inferior ao limite mínimo, em três outros meses. A detecção dos protozoários pode ter sido subestimada ou superestimada, devido à turbidez elevada e presença de algas autofluorescentes nas amostras analisadas. O presente trabalho foi importante para mostrar a real situação dos sistemas de tratamento de água no Estado do Espírito Santo quanto à remoção de protozoários patogênicos, evidenciando a importância do monitoramento de *Giardia* e *Cryptosporidium* em águas destinadas ao abastecimento público.

PALAVRAS-CHAVE: *Cryptosporidium*, *Giardia*, água, remoção.



INTRODUÇÃO

O abastecimento público de água é uma preocupação constante da sociedade, uma vez que a escassez do recurso água, acompanhada do aumento da demanda e deterioração dos corpos hídricos, encontra-se em níveis alarmantes. O desenvolvimento industrial, crescimento demográfico, urbanização e a ocupação do solo de forma desordenada e intensa têm provocado o comprometimento da qualidade da água destinada ao consumo humano e à recreação, levando ao aumento dos riscos de doenças de veiculação hídrica (MISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; FIGUEIREDO, 1994).

Segundo a OMS (2003), cerca de quatro milhões de pessoas morrem anualmente, devido às doenças associadas ao consumo da água contaminada e ao esgotamento sanitário inadequado. Os principais problemas de contaminação da água estão relacionados aos agentes biológicos patogênicos introduzidos ocasionalmente, representados principalmente pelas bactérias, vírus e parasitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A emergência, nas últimas décadas, dos protozoários *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* como principais causadores de doenças gastrointestinais relacionadas ao consumo de água em países desenvolvidos, tem chamado a atenção das organizações internacionais de saúde para uma intervenção nos padrões de qualidade da água para abastecimento público. A criptosporidiose e a giardíase acometem, principalmente, crianças, idosos e pessoas imunodeficientes, apresentando sintomas diversos (diarréias severas, dores abdominais, náuseas, febre e dores de cabeça), e em alguns casos, podendo levar ao óbito (ANDRADE NETO & ASSEF, 1996).

No Brasil, a operação deficiente de muitas estações de tratamento de água decorrentes de problemas operacionais, sobrecarga, ou incompatibilidade do sistema de tratamento deixa dúvidas quanto à eficiência dos sistemas na remoção de patógenos mais resistentes. Segundo Rose (1990), a veiculação hídrica de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* é facilitada pelo longo período que permanecem viáveis no ambiente, baixa dose infecciosa, resistência à cloração, e no caso dos oocistos, pelo tamanho reduzido que facilita sua passagem pelo leito filtrante.

Alguns países desenvolvidos já estabeleceram limites de aceitação para cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em água para abastecimento. A “United States Environmental Protection Agency” (USEPA, 1999) estabeleceu que o padrão de remoção com inativação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* deva ser de 3,0 e 2 log, respectivamente, com limite máximo permitido de zero. Já na Inglaterra, o limite máximo adotado é de um oocisto em 10L, que considera as limitações das estações de tratamento de água.

O Ministério da Saúde, através da Portaria N° 518/2004, apenas recomenda a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* com o objetivo de atingir um padrão de ausência. A não exigência do monitoramento destes protozoários patogênicos em água para abastecimento público no Brasil pode colocar em risco a saúde da população, uma vez que a associação com os principais indicadores de qualidade da água não é bem entendida.

A utilização de técnicas mais sensíveis e específicas para a identificação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* tem sido um grande desafio para as pesquisas relacionadas a estes protozoários em água. O custo elevado e o número de etapas são considerados fatores limitantes para a implantação das metodologias de detecção de *Giardia* e *Cryptosporidium* em laboratórios de controle de qualidade da água. No entanto, uso de técnicas alternativas de maior simplicidade e de baixo custo, mas com rigoroso controle de qualidade, é uma saída para os laboratórios que são desprovidos de altos investimentos.

A maioria dos dados de eficiência de remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* pelos processos de tratamento de água têm sido obtidos em testes piloto, alguns poucos estudos foram feitos em escala real. Considerando a escassez de trabalhos associados à presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em estações de tratamento de água no Estado do Espírito Santo, a presente pesquisa teve como objetivo investigar a ocorrência dos protozoários em águas destinadas ao abastecimento público no estado. O trabalho foi realizado por um período de 12 meses, através de amostragens mensais da água bruta, filtrada e tratada de dois sistemas de tratamento de água.



MATERIAIS E MÉTODOS

Local de desenvolvimento da pesquisa

A pesquisa foi realizada no período de abril de 2008 a março de 2009, em dois sistemas de tratamento de água do Estado do Espírito Santo. O sistema A, utiliza o tratamento do tipo filtração direta, que em situações de turbidez elevada na água bruta ($> 30 \text{ uT}$) tem a opção de operar por flotação. O sistema B possui duas linhas independentes de tratamento, uma por filtração direta e outra por tratamento convencional.

Água de estudo

Amostras unitárias de água bruta, filtrada e do reservatório de água tratada, foram coletadas mensalmente e analisadas quanto à presença de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*. Análises físico-químicas e bacteriológicas serviram para complementar o estudo. O sistema A, opera alternadamente com dois tipos de tratamento (filtração direta e flotação) devido à variação da turbidez da água captada. A flotação no sistema A foi concebida a partir de adaptação da flotação sobre os filtros utilizados na filtração direta. Portanto, foi possível a coleta de apenas seis amostras para cada linha de tratamento. Já no sistema B foram coletadas 12 amostras para as duas ETA, devido à independência das estações. A água tratada dos reservatórios foi amostrada por 10 meses.

Pontos de amostragem

As amostras de água bruta foram coletadas na chegada aos sistemas de tratamento, sem tratamento prévio. Para as amostras de água filtrada foram realizadas coletas compostas na saída dos filtros, nos pontos em que os operadores utilizam para controle operacional e sanitário. A água tratada foi coletada na saída dos reservatórios. As duas ETAs do sistema B abastecem um reservatório comum, portanto a coleta de água tratada deste sistema foi realizada em somente um ponto (Figura 1).

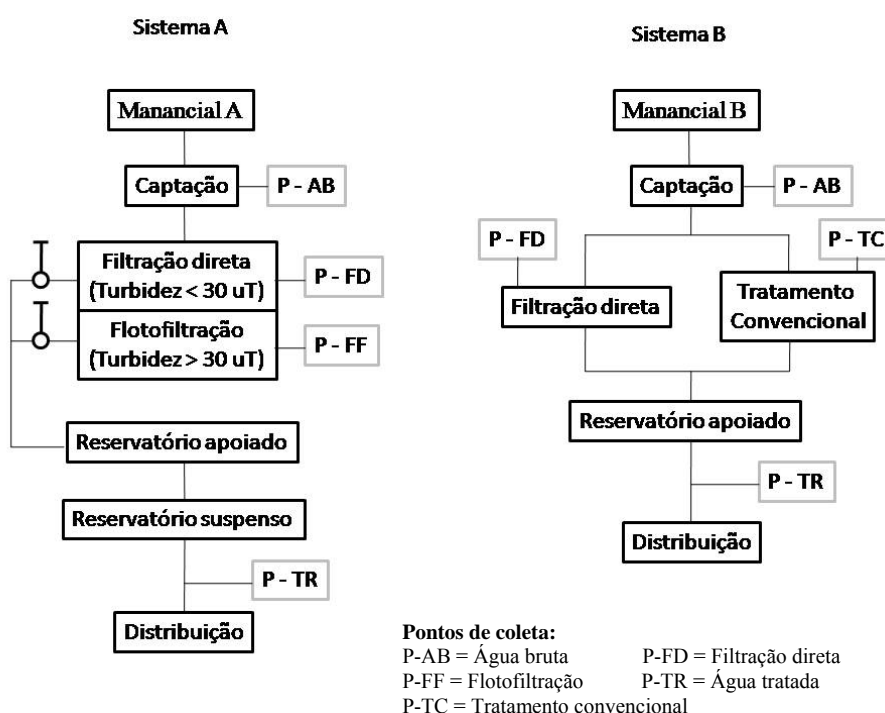


Figura 1. Fluxograma dos processos de tratamento de água nos sistemas A e B.

Os horários de coleta das amostras foram estabelecidos conforme o tempo de detenção em cada etapa do tratamento das ETAs estudadas, tendo como objetivo a amostragem da mesma água nos diferentes processos de tratamento. As amostras água bruta dos sistemas pesquisados foram coletadas sempre às 8h da manhã.



A frequência das amostragens foi definida em função dos recursos financeiros e do tempo necessário para a realização das análises das amostras considerando a capacidade do laboratório em termos de equipamentos, vidrarias, armazenamento de amostras e das pessoas envolvidas no projeto.

Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*

Os procedimentos para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em água envolveram três etapas: concentração, identificação e quantificação. O processo de concentração foi realizado por floculação com carbonato de cálcio (VESEY *et al.*, 1993); a identificação por imunofluorescência direta (IFD) e contraste de fase; e quantificação segundo Palmateer *et al.* (1996). A técnica de imunofluorescência direta foi realizada com o kit MeriFluor® para detecção de *Cryptosporidium*/*Giardia* (Meridian Diagnostics, Cincinnati, Ohio, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. As lâminas foram examinadas em microscópio de epifluorescência (ZEISS™ Axioplan HBO 50, com filtros de 450-490nm de excitação e 510 de supressão) com um aumento de 200, 400 e 630X. Para cada rodada de análises foi feita uma lâmina com controle positivo e negativo do kit.

Para a identificação de oocistos e cistos foram considerados os seguintes critérios de positividade:

- Imunofluorescência Direta
 - Grau de fluorescência definida pela intensidade verde-maçã brilhante (comparável àquela exibida por mais de 50% dos oocistos e cistos presentes nas suspensões controles positivos).
 - Tamanho e formato compatíveis: 4–6 µm de diâmetro para oocistos e forma esférica; para cistos, 8–12 µm e forma ovalada.
- Contraste de Fase
 - Estruturas internas como a presença de sutura para oocistos; para cistos, a presença de axonema e visualização dos núcleos (1 a 4).

As coletas das amostras foram realizadas em frascos de polipropileno descartáveis de 5 litros, desinfetados com solução de hipoclorito de sódio a 10%, e lavados com solução Tween 80 1%. As amostras foram conservadas a 8 °C até a chegada ao laboratório. Os procedimentos de coleta, transporte e acondicionamento das amostras seguiram as recomendações do “Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by Filtration/IMS/FA” (USEPA, 2001).

Indicadores físico-químicos e bacteriológicos

As análises físico-químicas (turbidez, alcalinidade, pH, cor verdadeira, cor aparente, cloro residual, temperatura) e bacteriológicas (coliformes totais e *E. coli*) das amostras foram realizadas conforme “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (APHA, 2005). Os procedimentos de coleta, transporte e acondicionamento das amostras seguiram as recomendações da CETESB (1987) e APHA (2005).

Sensibilidade da técnica de concentração

Os testes de sensibilidade da técnica de floculação por CaCO₃ foram realizados através da inoculação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* purificados em três matrizes diferentes: água bruta e filtrada, de um dos sistemas de tratamento de água em estudo, e em água destilada. A inoculação nas matrizes foi feita em triplicata, nas concentrações de 10³/L e 10²/L. Os procedimentos foram os mesmos adotados para concentração, identificação e quantificação dos protozoários nas águas de estudo.

Análises estatísticas

Os testes de sensibilidade foram analisados através da estatística descritiva, análise de variância (ANOVA) com nível de significância de cinco e 1%, e teste de Duncan (nível de significância de 5%). A avaliação da diferença de concentração de cistos e oocistos nos dois mananciais estudados foi realizada pelo teste *t* de amostras independentes. As análises estatísticas foram realizadas nos softwares Microsoft Excel 2007 e SPSS 11.5.0.



RESULTADOS

Testes de sensibilidade da técnica de concentração

A figura 1 retrata o perfil de recuperação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* nas matrizes e concentrações testadas. A análise de variância da recuperação dos protozoários está descrita na tabela 1. As características físico-químicas das matrizes utilizadas estão apresentadas na tabela 2.

Segundo o teste F da ANOVA, as taxas de recuperação dos dois protozoários foram diferentemente significativas nas três matrizes, apresentando valores de $p \leq 0,05$. Mas ao realizar o teste de Duncan ao nível de significância de 5%, a água destilada e filtrada não tiveram diferenças significativas na recuperação de cistos (AD = 36,29 %; AF = 35,92%) e oocistos (AD = 18,49%; AF = 23,24%), enquadrando-se no subgrupo de menor média de recuperação. Já a água bruta foi classificada no subgrupo de maior média de recuperação de protozoários (Crypto = 43,00%; Giardia = 72,71%).

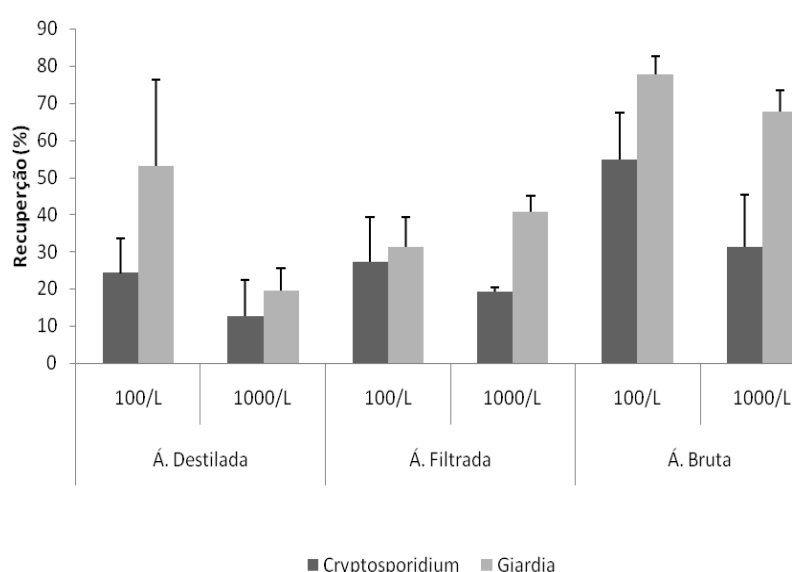


Figura 1. Média e desvio padrão da recuperação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* nas matrizes e concentrações iniciais.

As concentrações inoculadas ($10^2/L$ e $10^3/L$) tiveram recuperações diferentes somente para o protozoário *Cryptosporidium* ($p \leq 0,05$). Para a *Giardia*, as concentrações testadas não diferiram entre si ($p \geq 0,05$). Os cistos de *Giardia* foram mais bem recuperados do que os oocistos de *Cryptosporidium* em todas as matrizes e concentrações avaliadas (Figura 1).

Tabela 1. Diferença entre as médias de recuperação dos protozoários nas matrizes e concentrações testadas.

Fonte de variação	Variável dependente	F	p valor
Água	Crypto	9,04	0,00
	Giardia	13,23	0,00
Concentração inoculada	Crypto	8,26	0,01
	Giardia	2,88	0,11

Nível de significância de 5%.

Tabela 2. Características físico-químicas das águas utilizadas nos testes de sensibilidade das técnicas de concentração.

Água	Inóculo (org./L)	Parâmetro				
		Turbidez (uT)	pH	Conduct. (µS/cm)	Cor verdadeira (U PtCo)	Cor aparente (U PtCo)
Destilada	10 ⁻²	0,12	6,84	0,96	0,00	0,00
	10 ⁻³	0,09	6,86	0,85	0,00	0,00
Filtrada	10 ⁻²	0,19	6,23	48,70	0,00	0,44
	10 ⁻³	0,39	6,12	50,43	0,53	4,63
Bruta	10 ⁻²	95,60	7,55	41,26	140,1	364,16
	10 ⁻³	36,10	6,68	40,26	74,23	146,51

Ocorrência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*

Os resultados obtidos da pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* nas águas estudadas estão apresentados na figura 2 e tabela 3. As águas que não foram detectadas a presença de protozoários, não foram mencionadas na figura e tabela.

A *Giardia* foi o protozoário encontrado com maior frequência na água captada pelo sistema A (75,00% - 9/12) e sistema B (100,00% - 12/12), seguido pelo *Cryptosporidium*, identificado em 66,67 (8/12) e 83,33% (10/12) das amostras, respectivamente (Figura 2). Os oocistos foram encontrados, em média, com maior concentração que os cistos (Tabela 3). Porém, o teste *t* revelou não haver diferença significativa entre a concentração dos protozoários ($p \geq 0,05$).

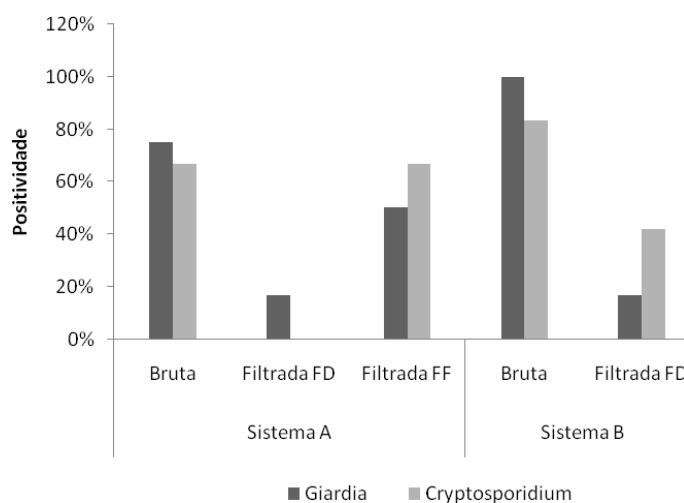


Figura 2. Positividade de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* nas amostras analisadas (FD – Filtração direta; FF – Flotofiltração).

A água bruta captada do sistema A apresentou, em média, menor concentração de protozoários que a água captada pelo sistema B. Mas, o teste *t* demonstrou que os mananciais estudados encontram-se no mesmo nível de contaminação, não apresentando diferenças quanto à concentração dos protozoários ($p \geq 0,05$).

No sistema A, o efluente filtrado do tratamento por flotofiltração apresentou maior frequência de protozoários (*Giardia* = 50,00% - 6/12; *Cryptosporidium* = 66,67% - 8/12), com concentrações médias de 0,06 cistos/L e 0,23 oocistos/L. No efluente filtrado da filtração direta do mesmo sistema foi encontrado apenas *Giardia* em 16,67% (2/12) das amostras, com concentração média de 0,02 cistos/L. No sistema B, apenas o efluente filtrado da filtração direta apresentou positividade para os protozoários, 16,67% (2/12) de *Giardia* e 41,67% (5/12) de *Cryptosporidium*, com concentrações médias de 0,11 cistos/L e 0,12 oocistos/L. Não foi constatada diferença na concentração média dos protozoários entre a água filtrada dos processos de tratamento em que foram identificados cistos e oocistos ($p \geq 0,05$). No efluente filtrado do tratamento convencional e nas águas tratadas dos reservatórios dos dois sistemas de tratamento não foram detectada a presença dos protozoários.



Tabela 3. Análise descritiva dos resultados da pesquisa de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* nos sistemas de tratamento de água.

Sistema	N	Cisto de <i>Giardia</i> / L				Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> / L			
		Max	Min	Média	D. padrão	Max	Min	Média	D. Padrão
A									
Bruta	12	16,00	0,00	5,96	6,55	67,50	0,00	8,42	19,43
Filtrada FD	6	0,15	0,00	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
Filtrada FF	6	0,17	0,00	0,06	0,08	0,75	0,00	0,23	0,28
B									
Bruta	12	33,33	1,00	8,94	9,28	36,70	0,00	9,31	11,21
Filtrada FD	12	1,00	0,00	0,11	0,30	0,67	0,00	0,12	0,21

FD – Filtração direta.

FF – Flotofiltração.

Remoção de cistos de *Giardia* e oocistos *Cryptosporidium* pelos sistemas de tratamento de água

A tabela 5 apresenta as taxas de remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* nas estações de tratamento de água estudadas.

Tabela 5. Remoção dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* pelos processos de tratamento de água.

Mês	<i>Giardia</i> (log)				<i>Cryptosporidium</i> (log)			
	FF-A	FD-A	FD-B	TC-B	FF-A	FD-A	FD-B	TC-B
Abril/08	2,50	-	1,95	nd	2,07	-	1,74	nd
Mai/08	-	nd	nd	nd	-	nd	2,20	nd
Junho/08	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd
Julho/08	-	1,36	nd	nd	-	aa	2,08	nd
Agosto/08	-	aa	nd	nd	-	aa	nd	nd
Setembro/08	-	aa	nd	nd	-	aa	nd	nd
Outubro/08	-	aa	nd	nd	-	nd	nd	nd
Novembro/08	1,94	-	nd	nd	2,59	-	0,94	nd
Dezembro/08	nd	-	nd	nd	0,52	-	nd	nd
Janeiro/09	1,92	-	nd	nd	1,22	-	nd	nd
Fevereiro/09	nd	-	0,70	nd	nd	-	1,78	nd
Março/09	nd	-	nd	nd	aa	-	nd	nd

aa – Ausência no afluente.

nd – Não detectado no efluente.

FF-A – Flotofiltração do sistema A.

FD-A – Filtração direta do sistema A.

FD-B – Filtração direta do sistema B.

TC-B – Tratamento convencional B.

O tratamento convencional do sistema B foi capaz remover 100% dos cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* encontrados na água bruta. A filtração direta do mesmo sistema não foi capaz remover completamente os cistos *Giardia*, sendo identificados em 16,67% (2/12) das amostras. Apesar da baixa frequência detectada, no mês de fevereiro foi registrada baixa taxa de remoção (0,70 log) para este protozoário. Já os oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados com maior frequência no efluente filtrado (41,67% - 5/12), com máxima de remoção de 2,20 log (maio/08) e mínima de 0,94 log (novembro/08).

No efluente do tratamento por flotofiltração do sistema A, foi identificada as maiores taxas de remoção para ambos os protozoários. No mês de abril de 2008, a *Giardia* foi removida com taxa de 2,50 log, e o *Cryptosporidium* com taxa de remoção de 2,59 log (novembro/08). No entanto, a flotofiltração foi o processo de tratamento que apresentou menor taxa de remoção para *Cryptosporidium*, 0,52 log no mês de dezembro de 2008.

A filtração direta do sistema A foi capaz de remover 100% de oocistos de *Cryptosporidium* nos meses em que foram encontrados na água bruta (3/6). A *Giardia* foi encontrada no efluente da filtração direta apenas no mês



de julho, com remoção de 1,36 log. Nos meses de agosto, setembro e outubro de 2008 não foram encontrados cistos no afluente. Apesar dos protozoários serem encontrados nos efluentes filtrados dos tratamentos por filtração direta e flotofiltração, não foram detectados na água tratada dos reservatórios.

Identificação por imunofluorescência direta (IFD) e contraste de fase

Os oocistos de *Cryptosporidium* detectados morfologicamente por IFD apresentaram-se de forma arredondada e, em alguns casos, levemente ovalada ou dobrados. A coloração verde, característica da fluoresceína, definiu o brilho periférico mais intenso e parede bem definida. O interior é mais claro com uma “linha de sutura” no centro. Em contraste de fase foi possível identificar a parede e ocasionalmente estruturas internas. A confirmação na água bruta com turbidez elevada foi prejudicada pelo excesso de material suspenso depositado na lâmina, que dificultou a visualização dos oocistos, barrando a passagem da luz transmitida e encobrindo os organismos. Em água filtrada os oocistos apresentavam parede levemente identificável.

Os cistos de *Giardia* identificados por IFD apresentaram forma ovalada ou elipsóide de coloração verde fluorescente, com parede bem definida e interior claro. Em contraste de fase foi possível a visualização de estruturas internas e parede dos cistos somente em águas com baixa turbidez. O excesso de sólidos em suspensão também prejudicou a identificação de cistos de *Giardia*.

DISCUSSÃO

Técnica de concentração

A concentração de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* por floculação com carbonato de cálcio demonstrou ser uma técnica simples, de custo reduzido com utilização de equipamentos básicos de laboratório, e de boa eficiência quando comparada com outras técnicas. Vesey *et al.* (1993) e, Shepherd e Wyn-Jones (1996) relataram eficientes taxa de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* em matrizes de baixa e alta turbidez. O presente estudo revelou que a floculação com carbonato de cálcio, quando aplicada em matrizes com turbidez elevada (água bruta), apresenta melhor desempenho que em matrizes de baixa turbidez (água destilada e filtrada). Por se tratar de uma técnica que exige a presença de sólidos em suspensão para formação de flocos com peso suficiente para a sedimentação, a qualidade das matrizes testadas, em termos de turbidez, possivelmente influenciou na recuperação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*.

A eficiência de recuperação de cistos de *Giardia* foi maior que para os oocistos de *Cryptosporidium*, provavelmente por os cistos serem de maior tamanho e densidade, facilitando a sedimentação no processo de concentração. Resultados semelhantes foram encontrados por Shepherd e Wyn-Jones (1996). Por outro lado, o excesso de turbidez pode dificultar a identificação dos protozoários, impedindo a visualização dos cistos e oocistos.

Ocorrência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*

Considerando a positividade das amostras e os valores médios de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* encontrados nos dois mananciais de abastecimento estudados, pode-se dizer que os resultados obtidos são compatíveis com os resultados apresentados por pesquisas realizadas no Brasil (HELLER *et al.*, 2004; HACHICH *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2002). Entretanto, os valores máximos encontrados são bem inferiores aos registrados na literatura, que relatam concentrações na ordem de $10^2/L$. Não foi registrada diferença significativa na concentração dos protozoários nos dois mananciais analisados, sugerindo que a ocupação das bacias dos dois mananciais é semelhante, recebendo contaminação de fontes comuns, conforme informações do IEMA (s/d).

As maiores frequências detectadas de protozoários nos efluentes das ETAs por flotofiltração do sistema A e filtração direta do sistema B, podem ser explicadas pela turbidez maior que 0,5 uT encontradas em 58,33% das amostras de ambas as águas analisadas. O Ministério da Saúde, através da Portaria nº 518/2004, recomenda que a turbidez de efluentes filtrados de filtração direta seja inferior a 0,5uT, em 95% das amostras, para se atingir o padrão de ausência de *Giardia* e *Cryptosporidium*. Isto demonstra que estes tipos de tratamento estão sujeitos ao transpasse de protozoários quando há picos de turbidez.



Mas, a presença de protozoários em águas com turbidez inferior a 0,5 uT, como registrado nas duas ETAs de filtração direta, indica que o padrão de ausência de protozoários, medido pelo limite de turbidez de 0,5 uT, não garante a ausência de riscos à população. Hsu *et al.* (2001) e Hashimoto *et al.* (2002) também relataram a presença de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em águas filtradas de baixa turbidez, indicando que o limite de aceitação para a turbidez deveria ser ainda menor. A presente pesquisa, demonstrou que deveria ser assumido o limite de turbidez de 0,3 uT para garantir a ausência de protozoários, assim como recomendado pela USEPA (1999).

A não detecção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* no efluente filtrado do tratamento convencional indica que este processo de tratamento é capaz remover protozoários, possivelmente por apresentar um maior número de etapas de tratamento fazendo com os filtros receba água já clarificada (EMELKO, 2003; JAKUBOWSKI e CRAUN, 2002). O presente estudo não avaliou a remoção na água decantada, mas segundo a USEPA a etapa de sedimentação é responsável por 0,5 log de remoção no tratamento convencional. As altas taxas de remoção constatadas no tratamento convencional corroboram com os resultados apresentados por Nieminski (1997).

A identificação de protozoários nos efluentes filtrados dos tratamentos por filtração direta e flotação demonstra que estes tipos de tratamento são vulneráveis à passagem de cistos e oocistos ao longo dos processos, e que tornasse necessário a otimização e rigoroso controle dos processos unitários de tratamento. A USEPA (1999) tolera taxa mínima de remoção de protozoários de 2,0 log para filtração direta, mas estabelece como meta a ausência de protozoários na água distribuída à população. A flotação, em alguns momentos, superou 2,0 log de remoção, mas a maioria dos casos as taxas de remoção foram inferiores a este limite, apresentando a pior taxa de remoção de *Cryptosporidium* (0,52 log). O tratamento de água por flotação é pouco utilizado no Brasil, no entanto é carente em estudos de avaliação de remoção de protozoários. A pesquisa de Edzwald e Tobiason (2002), em escala piloto, demonstrou que a clarificação por flotação com ar dissolvido (FAD) remove 1,6 a 2,2 log de *Cryptosporidium*, e a associação de FAD com filtração foi capaz de remover mais de 4 log. French *et al.*, (2000) também obteve taxas de remoção de *Cryptosporidium* superiores a 4 log em testes piloto.

A eficiência da filtração direta do Sistema A em remover os cistos de *Giardia* e, principalmente, os oocistos de *Cryptosporidium* se deve à ausência e/ou à baixa concentração dos protozoários na água bruta. A filtração direta do sistema A esteve em operação no período em que foram registrados os menores valores de turbidez e menores concentrações de protozoários na água bruta, portanto a eficiência deste processo de tratamento foi influenciada pela qualidade da água bruta. Apesar da remoção de *Giardia* ser de 100% em dois períodos em que foi identificada na água bruta (2/3), no mês em que foi detectada apresentou remoção de apenas 1,36 log. Já a ETA de filtração direta do sistema B, foi operada durante os 12 meses de pesquisa, recebendo cargas constantes de protozoários. A água bruta deste sistema apresentou maior frequência de protozoários no período estudado, portanto o processo de tratamento empregado esteve sujeito ao transpasse de cistos e oocistos. A remoção de cistos de *Giardia* não atingiu o mínimo recomendado de 2,0 log. Já a remoção de oocistos de *Cryptosporidium* foi superior a 2,0 log em dois momentos (maio de 2008=2,20 log; julho de 2008=2,08 log), mas inferior ao limite mínimo, em três outros meses.

A não detecção dos protozoários na água tratada dos reservatórios mostra que a água distribuída à população se enquadra nos requisitos estabelecidos pelas normas nacionais e internacionais. Mas, vale ressaltar que a técnica utilizada para a concentração de cistos e oocistos não apresenta 100% de recuperação, podendo os resultados de ausência estar subestimados considerando o limite de detecção da técnica, assim como relatado por Vernille *et al.* (2008). Dados de literatura que demonstram a alta resistência dos cistos de *Giardia* e, principalmente, oocistos de *Cryptosporidium* aos processos convencionais de desinfecção, reforçam a ideia de subestimação dos resultados na água tratada. Moore *et al.* (1998) adiciona outra problemática à detecção de protozoários em água tratada. Comenta que pode haver remoção dos epítomos específicos da parede dos cistos e oocistos pelo cloro sem inativação, impedindo que os anticorpos marcados com o reagente de detecção se aderem à superfície dos microrganismos.

A presença de turbidez na água pode ter melhorado a recuperação, devido à formação de flocos maiores e mais densos, facilitando a sedimentação e concentração dos protozoários. Por outro lado, a turbidez elevada prejudicou a visualização dos cistos e oocistos, encobrindo-os e impedindo a identificação (BRIANCESCO *et al.*, 1999). A presença de algas autofluorescentes pode ter efeito de superestimação nos resultados, levando a resultados falso-positivos, já que não foram adotadas técnicas de purificação.



CONCLUSÕES

Apesar da concentração dos protozoários não ser elevada quanto os relatos de outros trabalhos, os resultados indicam que os cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* estão amplamente disseminados no ambiente aquático dos mananciais estudados.

A não detecção de protozoários no efluente filtrado do tratamento convencional sugere que este processo de tratamento pode ser indicado para a remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. A presença de cistos e oocistos nos efluentes filtrados da filtração direta e flotação e o fato da remoção, em alguns meses, não atingir os padrões recomendados, indica que estes processos de tratamento são vulneráveis e devem ser otimizados para se evitar os riscos à saúde da população, considerando que a cloração é apontada como ineficaz na inativação dos protozoários.

Visto que a recuperação dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* não foi de 100% nos testes de sensibilidade da técnica de concentração, e que o cloro dificulta a identificação dos cistos e oocistos em águas cloradas, supõe-se que os resultados da pesquisa possam estar subestimados, principalmente em amostras de baixa turbidez (filtrada e tratada). A ocorrência de resultados falso-positivos não é descartada, já que a presença de algas pode influenciar na identificação dos protozoários.

O presente trabalho foi importante para mostrar a real situação dos sistemas de tratamento de água no Estado do Espírito Santo quanto à remoção de protozoários patogênicos, evidenciando a importância do monitoramento de *Giardia* e *Cryptosporidium* em águas destinadas ao abastecimento público.

RECOMENDAÇÕES

Monitoramento com tempo mínimo de dois anos para se definir o tratamento adequado ou otimização dos processos já existentes na remoção de *Giardia* e *Cryptosporidium*.

Pesquisa de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* na água de lavagem de filtros, para se determinar o grau de contaminação destes protozoários e o risco do reuso.

Utilização de técnicas mais sensíveis e específicas para a detecção de *Giardia* e *Cryptosporidium*, buscando eliminar os interferentes analíticos que possam gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao FACITEC e CNPq pelo financiamento da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHMAD, R.A.; LEE, E.; TAN, I.T.L.; MOHAMAD-KAMEL, A.G. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in raw and treated water from two water treatment plants in Selangor, Malaysia. Wat. Res., 31 (12): 3132-3136, 1997.
2. BASTOS, R.K.X.; VIEIRA, M.B.M.; BRITO, L.A.; BEVILACQUA, P.D.; NASCIMENTO, L.E.; HELLER, L. *Giardia* sp cysts and *Cryptosporidium* spp. Oocysts dynamics in Southeast Brazil: occurrence in surface water and removal in water treatment processes. International Symposium on Waterborne Pathogens, AWWA, 2002.
3. BRIANCESCO, R.; DELLA LIBERA, S.; SEMPRONI, M.; BONADONNA, L. Relationship between *Cryptosporidium* and microbiological water quality parameters in raw water. Journal of Preventive Medicine and Hygiene, 40: 39-42, 1999.
4. CARMENA, D.; AGUINAGALDE, X.; ZIGORRAGA, C.; CRESPO, J.; OCIO, J. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. Journal of Applied Microbiology, 102 (3): 882-882, 2007.
5. EDZWALD J. K; TOBIASON J. E. Fate and removal of *Cryptosporidium* in a dissolved air flotation water plant with and without recycle of waste filter backwash water. Water science and technology, 2 (2): 85-90, 2002.



6. EMELKO, M. B. Removal of viable and inactivated *Cryptosporidium* by dual- and tri-media filtration. *Water Res.* 37: 2998-3008, 2003.
7. FRENCH, K.; GUEST, R. K.; FINCH, G. R.; HAAS, C. N. Correlating *Cryptosporidium* removal using dissolved air flotation in water treatment. *Wat. Res.*, 34(16): 4116-4119, 2000.
8. HACHICH, E. M.; SATO, M. I.; GALVANI, A. T.; MENEGON, J. R.; MUCCI, J. L. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of São Paulo State, Brazil. *Water Science and Technology*, 50 (1): 239-245, 2004.
9. HASHIMOTO, A.; KUNEKANE, S.; HIRATA, T. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the drinking water supply in Japan. *Water Research*, 36: 519-526, 2002.
10. HELLER, L.; BASTOS, R.K.X.; VIEIRA, M.B.C.M.; BEVILACQUA, P.D.; BRITO, L.L.A.; MOTA, S.M.M.; OLIVEIRA, A.A.; MACHADO, P.M.; SALVADOR, D.P.; CARDOSO, A.B. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 13:2, 79-92, 2004.
11. HU, T.L. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts detection in the intake and rapid filter system in a water purification plant. *Biotechnology letters*, 24: 1683-1686, 2002.
12. HSU, B.M.; HUANG, C.; HSU, C.L.; HSU, Y.F.; HSU, C.L. Examination of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water samples and fecal specimens in Taiwan. *Water Sci. Technol.*, 41: 87-92, 2000.
13. HSU, B.M.; HUANG, C.; HSU, C.L.L. Analysis for *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water samples from small water systems in Taiwan. *Parasitol. Res.*, 87: 163-168, 2001.
14. IEMA - INSTITUTO ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS. SUBGERÊNCIA DE PLANOS DE BACIA HIDROGRÁFICA E APOIO A COMITÊS. As Águas da Bacia do Rio Jucú e Santa Maria da Vitória. Disponível em: <http://www.iema.es.gov.br/default.asp>. Acesso em: 01 de novembro de 2008.
15. JAKUBOWSKI, W.; CRAUN, G. F. Update on the control of *Giardia* in water supplies. In: OLSON, B. E.; OLSON, M. E.; WALLIS, P. M. (Eds), *Giardia* the cosmopolitan Parasite. CABI Publishing, Wallingford, UK, 217-238.
16. MOORE, A.G.; VESEY, G.; CHAMPION, A.; SCANDIZZO, P.; DEERE, D.; VEAL, D.; WILLIAMS, K.L. Viable *Cryptosporidium parvum* oocysts exposed to chlorine or other oxidising conditions may lack identifying epitopes. *International Journal for Parasitology*, 28 (8): 1205-1212, 1998.
17. NIEMINSKI, E. C. Removal of *Cryptosporidium* and *Giardia* through conventional water treatment and direct filtration. USEPA, Project Summary, Cincinnati, 1997.
18. THURMAN, R.; FAULKNER, B.; VEAL, D.; CRAMER, G.; MEIKLEJOHN. Water quality in rural Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 627-632, 1998.
19. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. Alternative disinfectants and oxidants – guidance manual. EPA 815-R-99-014, 1999.
20. VERNILE, A.; NABI, A.Q.; BONADONNA, L.; BRIANCESCO, R.; MASSA, S. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Italian water supplies. *Environ. Monit. Assess*, 152 (2): 203-207, 2008.