

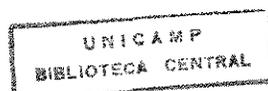
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL**

**ANÁLISE DO LODO DE ESGOTO:SELEÇÃO DE  
MÉTODOS DE RECUPERAÇÃO DE (OO)CISTOS DE  
PROTOZOÁRIOS PATOGÊNICOS**

---

**MARTA SIVIERO GUILHERME**

**Campinas, SP  
1998**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL**

**ANÁLISE DO LODO DE ESGOTO: SELEÇÃO DE  
MÉTODOS DE RECUPERAÇÃO DE (OO)CISTOS DE  
PROTOZOÁRIOS PATOGÊNICOS**

**MARTA SIVIERO GUILHERME**

**ORIENTADOR: BRUNO CORAUCCI FILHO**

**Dissertação de Mestrado apresentada à  
Faculdade de Engenharia Civil da  
UNICAMP, para obtenção do título de  
Mestre em Engenharia Civil, Área de  
Concentração em Saneamento**

**Campinas, SP  
1998**

Atesto que esta é a versão definitiva da dissertação/tese	
Prof. Dr.	12/02/99
Matrícula:	037371

N.º CHAMADA:	UNICAMP
	G944a
	EX
UNDO BC/	38983
NOC	229/99
	0 <input checked="" type="checkbox"/>
VAL	R\$ 11,00
TEL	09110199
CPD	

CM-00126430-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

G944a      Guilherme, Marta Siviero  
Análise do lodo de esgoto: seleção de métodos de  
recuperação de (oo) cistos de protozoários patogênicos.  
/ Marta Siviero Guilherme.--Campinas, SP: [s.n.], 1998.

Orientador: Bruno Coraucci Filho  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Civil.

1. Lodo. 2. Protozoário. 3. Metodologia. 4. Águas  
residuais. I. Coraucci Filho, Bruno. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Civil.  
III. Título.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL**

**ANÁLISE DO LODO DE ESGOTO: SELEÇÃO DE  
MÉTODOS DE RECUPERAÇÃO DE (OO)CISTOS DE  
PROTOZOÁRIOS PATOGÊNICOS**

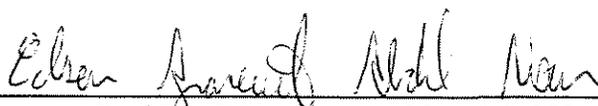
**MARTA SIVIERO GUILHERME**

**Dissertação de Mestrado aprovada pela Banca Examinadora, constituída por:**



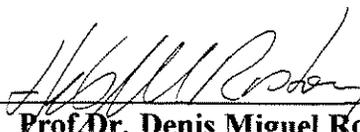
---

**Prof.Dr. Bruno Coraucci Filho**  
**Presidente e Orientador/Faculdade de Engenharia Civil- UNICAMP**



---

**Prof.Dr. Edson Aparecido Abdul Nour**  
**Faculdade de Engenharia Civil- UNICAMP**



---

**Prof.Dr. Denis Miguel Roston**  
**Faculdade de Engenharia Agrícola- UNICAMP**

**Campinas, 15 de dezembro de 1998**

## DEDICATÓRIA

---

Dedico este trabalho aos meus pais  
Oswaldo (*in memoriam*) e Therezinha

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Bruno Coraucci Filho pela orientação e sugestões durante a realização do trabalho.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Civil- UNICAMP e do Laboratório de Saneamento pela colaboração e sugestões recebidas.

Ao CNPq pela ajuda financeira.

Aos funcionários do Laboratório de Parasitologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP e do Laboratório de Parasitologia da Prefeitura Municipal de Campinas pelo fornecimento de material utilizado na realização da parte experimental.

À minha família pelo apoio e carinho durante toda esta etapa.

Ao Marco pela compreensão e carinho.

Aos amigos e demais pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 - OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 - Objetivos Gerais.....	3
2.2 - Objetivo Específico.....	3
<b>3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
3.1 - Disposição do Lodo de Esgoto.....	5
3.2 - Disposição do Lodo no Solo.....	8
3.3 - Patógenos do Lodo.....	13
3.3.1 - Protozoários do Lodo.....	15
3.3.2 – Protozoários Patogênicos.....	20
3.4 - Métodos de Recuperação dos Protozoários.....	26
3.4.1 – Recuperação por Suspensão dos (oo)Cistos.....	27
3.4.1.1 – Recuperação com Solução de Sulfato de Zinco $ZnSO_4$ (33%).....	28
3.4.1.2 – Recuperação com Sacarose.....	29
3.4.2 – Recuperação pela Sedimentação dos (oo)Cistos.....	30
3.4.2.1 – Recuperação com Formol/Éter.....	30
3.4.2.2 – Concentração por Simples Decantação.....	31
3.5 – Recuperação dos (oo)Cistos.....	31

<b>4 - METODOLOGIA.....</b>	<b>35</b>
4.1 - Seleção de Métodos para Recuperação dos (oo)Cistos de Protozoários.....	36
4.1.1 – Método de Hoffman (sedimentação simples).....	38
4.1.2 – Método de Faust (suspensão).....	38
4.1.3 - Método da Sacarose (suspensão).....	39
4.1.4 - Método do Formol/Éter (sedimentação).....	39
4.2 - Montagem dos Reatores.....	40
4.2.1 - Lodo de Esgoto.....	40
4.2.2 – Materiais.....	42
4.2.3 - Análise do Lodo de Esgoto.....	45
4.2.4 - Análise da Mistura Solo/lodo.....	46
4.2.5 - Análise do Líquido Percolado após Aplicação do Lodo no Solo.....	46
4.3 - Identificação dos Protozoários.....	47
4.4 - Modificações no Método de Sulfato de Zinco.....	47
<b>5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
5.1 - Seleção de Métodos de Recuperação dos (oo)Cistos de Protozoários.....	50
5.2 - Resultado das Aplicações do Lodo de Esgoto nos Reatores.....	54
5.3 – Modificações na Metodologia do Sulfato de Zinco.....	56
<b>6 - CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>
<b>7 - SUGESTÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>75</b>

## LISTA DE FIGURAS

3.1 – Geração, tratamento, uso e disposição do lodo de esgoto.....	4
3.2 – Esquema geral de um protozoário (ameba).....	16
3.3 – Colônia de <i>Vorticella</i> spp no lodo de esgoto.....	17
3.4 – Esquema de contaminação pela da água.....	18
3.5 – Cistos de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	20
3.6 – <i>Giardia lamblia</i> : forma vegetativa (A) e cisto (B).....	21
4.1 – Esquema geral da metodologia.....	37
4.2 – Localização da ETE Riacho Grande – SBC-SP.....	41
4.3 - Reator montado para o experimento.....	43
4.4 - Esquema de observação da lâmina.....	47
4.5 - Garrafas (PET) montadas para ensaios em laboratório.....	48
5.1 - Porcentagem de recuperação dos (oo)cistos de protozoários em diferentes metodologias.....	52
5.2 – Comparação da porcentagem média de recuperação dos (oo)cistos de protozoários com sulfato de zinco 33% em diferentes tempos de repouso.nas três amostras.....	58
5.3 – Comparação da porcentagem média de recuperação dos (oo)cistos de protozoários com sulfato de zinco 50% em diferentes tempos de repouso.....	60
5.4 – Comparação da porcentagem média de recuperação dos (oo)cistos de protozoários com sulfato de zinco 75% com tempo de repouso de 24 horas.....	61

5.6 – Comparação da porcentagem de recuperação dos (oo)cistos nas 3 concentrações no tempo de repouso de 24 horas..... 63

---

## LISTA DE TABELAS

3.1 – Tempo de sobrevivência de patógenos no solo.....	11
3.2 – Principais patógenos do lodo de esgoto e doenças relacionadas.....	13
3.3 – Algumas propostas para controlar patógenos e vetores no lodo de esgoto.....	24
4.1 – Taxas de aplicação de lodo.....	44
4.2 - Caracterização do solo utilizado no experimento.....	45
5.1 – Recuperação dos (oo)cistos de protozoários em diferentes métodos.....	51
5.2 – Taxa de recuperação para o método de sulfato de zinco 33% com tempo de repouso de 2 horas.....	57
5.3 – Taxa de recuperação para o método de sulfato de zinco 33% com tempo de repouso de 24 horas.....	58
5.4 – Taxa de recuperação para o método de sulfato de zinco 50% com tempo de repouso de 2 horas.....	59
5.5 – Taxa de recuperação para o método de sulfato de zinco 50% com tempo de repouso de 24 horas.....	59
5.6 – Taxa de recuperação para o método de sulfato de zinco 75% com tempo de repouso de 24 horas.....	61
5.7 – Comparação das porcentagens de recuperação dos (oo)cistos de protozoários para as 3 concentrações de sulfato de zinco com tempo de repouso de 24 horas.....	62

## RESUMO

Guilherme, Marta Siviero. Análise do Lodo de Esgoto: Seleção de Métodos de Recuperação de (oo)Cistos de Protozoários Patogênicos. Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, 1998. 76p. Dissertação (Mestrado)

O lodo de esgoto doméstico é um resíduo gerado pelas ETE's (Estação de Tratamento de Esgoto) em grande quantidade e que necessita de disposição adequada. Existem algumas formas de disposição conhecidas, como por exemplo a incineração ou aterro sanitário. Porém, a forma de disposição que combina de modo mais eficiente reciclagem de matéria orgânica e qualidade ambiental é a sua utilização como condicionante em solos agrícolas ou parques e jardins. O lodo de esgoto possui elementos nutritivos importantes para as plantas, como P e N, no entanto, este resíduo pode conter patógenos que podem colocar em risco a saúde do homem e outros animais. Um grupo de patógenos que pode estar presente no lodo é o dos protozoários, como por exemplo cistos de *Giardia* e amebas, responsáveis por doenças entéricas de fácil disseminação. Uma forma de evitar que estes patógenos causem problemas é através do seu efetivo monitoramento, no lodo de esgoto e no solo. O objetivo deste trabalho foi selecionar métodos que permitissem recuperar estes patógenos que estivessem presentes no lodo. Os métodos são baseados na recuperação dos protozoários através de sua sedimentação ou suspensão. Neste trabalho foram testadas 4 metodologias para verificar qual obtinha maior recuperação dos protozoários. As metodologias testadas usavam sulfato de zinco (33%), sacarose (1M), formol/éter, ou simples decantação (Hoffman). O método que apresentou melhor resultado foi o do sulfato de zinco. Após a seleção do método, foram feitas modificações na concentração da solução de sulfato e no tempo de análise, com o objetivo de procurar aumentar esta recuperação. Isto foi possível com a utilização de sulfato de zinco 50% e com a amostra deixada em repouso numa suspensão com água destilada por 24 horas antes da análise. Desta forma, a porcentagem de recuperação passou de 19,01% para 35,31%, o que significa um aumento da eficiência da taxa de recuperação, com a concentração do sulfato de zinco 50%. Este aumento de recuperação é importante na definição de uma metodologia simples e de baixo custo, para a recuperação de protozoários.

Palavras Chave: lodo de esgoto, protozoários patogênicos, métodos de recuperação.

## ABSTRACT

Guilherme, Marta Siviero. Análise do Lodo de Esgoto: Seleção de Métodos de Recuperação de (oo)Cistos de Protozoários Patogênicos. Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, 1998. 76p. Dissertação (Mestrado)

The sewage sludge, a residue generated in significant amounts by waste water treatment plants, requires suitable disposal. There are some well known ways for disposal of sludge, for instance incineration or landfills, however the disposal procedure that more efficiently combines recycling of the organic matter and environmental suitability is the use of the sludge as conditioning in agriculture and gardens. The sewage sludge contains important plant nourishing elements like P and N, however it can also contain human pathogens. Protozoan like *Giardia* cysts and amoebas that can cause enteric diseases easily disseminable, are among the pathogens that can be found in the sewage sludge. Monitoring these pathogens in the sludge and in the soil is an effective way to prevent the pathogens of causing problems. The aim of this work was to select a method for the recovery of these pathogens in the sewage sludge. The procedures are based in the recovery of the protozoan through sedimentation or flotation. Four different methodologies- zinc sulfate 33%, sucrose 1M, formaldehyde/ether and sedimentation (Hoffman)- were compared to assess the one that allows the higher protozoan recovery index. The best results were obtained with zinc sulfate. After have selected the methodology, different concentrations of zinc sulfate and times were tested in order to try to increase the recovery index. The highest recovery index was found by using a 50% zinc sulfate solution and after the sample have been left in a distilled water suspension for 24 hours before the analysis. These conditions increased the recovery index from 19,01 to 35,31%, an efficient improvement of in the index. This result is important in establishing a simple and low cost methodology to recover the protozoan.

Key Words: Sewage sludge, pathogenic protozoan, recovery methods

## 1 - INTRODUÇÃO

A geração de resíduos é um dos principais problemas ambientais provocados pelo modo de vida da sociedade e que vem se agravando ao longo do tempo. É preciso encontrar uma maneira de minimizar este problema através da diminuição da geração ou de programas que visem reciclagem destes resíduos.

Como exemplo de resíduo que pode ser reciclado, pode-se citar os lodos de esgoto, que são gerados no final do tratamento de esgoto doméstico ou industrial. Este resíduo é gerado em grande quantidade, dependendo do tipo de tratamento utilizado pela ETE (Estação de Tratamento de Esgoto) e precisa ser descartado de maneira segura, sem afetar a qualidade ambiental.

Dentre as formas conhecidas para disposição do lodo de esgoto, a disposição do resíduo no solo como condicionante é a que combina de maneira mais eficiente reciclagem e qualidade ambiental. Esta forma de disposição permite o aproveitamento de elementos nutritivos do resíduo, como P e N, evitando assim, seu acúmulo e descarte em corpos d'água, o que provocaria eutrofização, aumentando os índices de poluição das águas.

O lodo de esgoto é gerado a partir de substâncias orgânicas e minerais separadas durante o tratamento. É um produto que possui nitrogênio, fósforo e matéria orgânica, além de substância tóxicas, como por exemplo os metais pesados. O lodo pode ainda conter patógenos que são responsáveis por doenças entéricas facilmente transmissíveis para o homem.

Os principais patógenos que podem ser encontrados no lodo de esgoto, principalmente no caso deste ser de origem doméstica são bactérias (*Salmonella*), vírus (hepatite A), protozoários (*Giardia*, *Cryptosporidium* e amebas) e vermes (*Ascaris* e outros).

Estes organismos podem ser transmitidos através do contato direto com o lodo, com a água, no caso do lodo ser descariado em corpos d'água, ou ainda, pelo contato com o solo se o lodo for disposto neste meio sem tratamento prévio antes desta disposição.

Uma grande dificuldade que existe em relação a estes patógenos é a detecção no lodo de esgoto. Os métodos usados para recuperá-los são ineficientes, geralmente não são específicos para lodo de esgoto, nem para (oo) cistos de protozoários e podem acabar subestimando a quantidade destes organismos no lodo, colocando em risco a saúde do ambiente. Além disso, é necessário padronizar a quantidade máxima destes patógenos que o lodo podem conter, sem que isto cause prejuízos para a saúde, pois estes são organismos responsáveis pela alta incidência de doenças entéricas e gastroenterites em todo o mundo. Deste modo, pode-se perceber a importância da verificação da presença destes patógenos e da necessidade de estabelecer critérios para utilização do lodo sem trazer qualquer risco para a saúde.

Conhecendo-se a microbiologia do lodo de esgoto e caracterizando-o quanto à presença de patógenos pode-se pensar na utilização segura deste resíduo, sem deixar de lado seu potencial fertilizante e ao mesmo tempo garantir o equilíbrio do ambiente, sem aumentar os níveis de poluição e a disseminação de doenças.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 - Objetivos Gerais**

- \* caracterização do lodo de esgoto da ETE Riacho Grande- São Bernardo do Campo- SP quanto a presença de cistos de protozoários patogênicos; e,
- \* verificação da presença dos cistos de protozoários na mistura solo/lodo após a aplicação do lodo no solo, e na água drenada.

### **2.2 - Objetivo Específico**

- \* definir metodologia que apresente maior índice de recuperação dos (oo)cistos de protozoários patogênicos presentes no lodo de esgoto.

### 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O esgoto gerado, doméstico ou industrial, deve ser conduzido através da rede de esgotos para a ETE (Estação de Tratamento de Esgoto), onde são realizados os processos físicos, químicos e biológicos, comuns ao tratamento, e necessários para efetuar a estabilização da matéria orgânica e a diminuição de substâncias nocivas (Figura 3.1). Como resultado final do tratamento de esgoto, há a produção de um resíduo -lodo de esgoto, que precisa ser disposto-, e um efluente final que poderá ser lançado nos corpos d'água, sem causar grandes impactos ao ambiente.

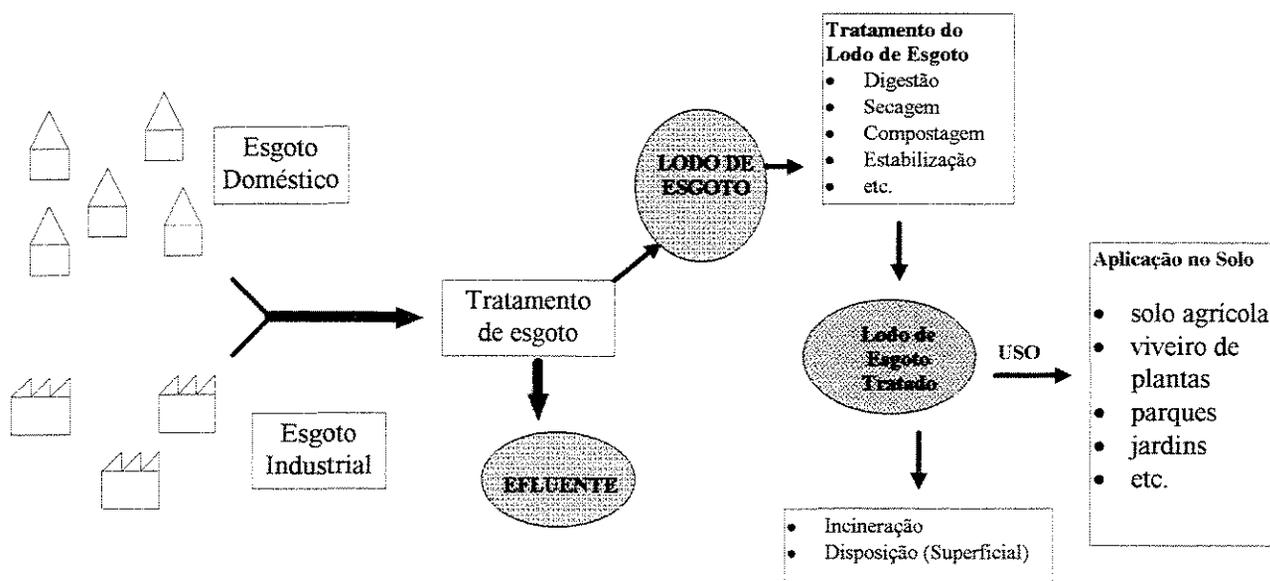


FIGURA 3.1- Geração, tratamento, uso e disposição do lodo de esgoto

FONTE- Adaptado EPA-1992.

A ETE convencional é composta por unidades de gradeamento, caixas de areia, medidor de vazão, decantadores primário e secundário, unidade de tratamento biológico, desinfecção, além de unidades para tratamento do lodo e em alguns casos unidade de tratamento terciário.

O lodo de esgoto é gerado nos decantadores, dependendo do tipo de ETE (por exemplo, lodos ativados, valo de oxidação), a partir da sedimentação de substâncias minerais e orgânicas. É produzido em grandes quantidades pelas ETE's, e precisa ser adequadamente disposto sem causar danos ao ambiente. Por ser um resíduo que possui altas concentrações de matéria orgânica e outros nutrientes importantes para o desenvolvimento das plantas, como fósforo e nitrogênio, pode-se pensar na sua utilização como condicionante, promovendo assim sua reciclagem, seja em parques e jardins, ou em solos agrícolas.

Pode ser encontrado na forma líquida (digerida ou não digerida) e na forma de torta de lodo. O lodo líquido não digerido possui seu conteúdo de sólido seco em torno de 2 a 7% e é resultante da sedimentação do esgoto. O lodo digerido é produto do tratamento do lodo em digestores e seu conteúdo sólido fica entre 2 a 5%. A torta de lodo é produzida pela retirada de líquido através de filtro prensa ou centrifugação do lodo líquido após um pré-tratamento, e seu conteúdo de sólidos secos fica entre 20 a 35%, podendo chegar até 50%, se for utilizado ar seco ou empilhamento (ANGLIAN WATER, 1991).

### **3.1 - Disposição do Lodo de Esgoto**

O tratamento de esgoto doméstico gera o lodo de esgoto, que possui um alto teor de matéria orgânica e vários elementos importantes para o desenvolvimento das plantas. A quantidade de lodo que é gerada pela ETE depende do tipo de tratamento que esta adota, e de modo geral são produzidas grandes quantidades deste resíduo diariamente, causando problemas em relação à sua disposição. É preciso encontrar uma maneira de dispor o lodo de esgoto, sem no entanto aumentar os índices de poluição e prejudicar o ambiente.

A questão da geração de lodo e a necessidade de encontrar uma forma de disposição segura para este resíduo, vem aumentando, pois os processos de tratamento de esgotos e águas são cada vez mais necessários, para garantir a qualidade ambiental.

Segundo LIU (1982), todas as grandes cidades tem problemas com a disposição do lodo residual e é preciso encontrar soluções eficientes. Segundo este autor, a tendência é a de que este problema se agrave com o desenvolvimento e crescimento destas cidades, o que leva à necessidade, cada vez mais, de realizar os processos de tratamento de água e esgoto, e conseqüentemente há um aumento da geração de lodo.

Apesar do avanço da tecnologia do tratamento de esgoto, ainda não foi encontrada solução para a questão da geração e disposição do lodo. DAVIS (1996) estima que a produção de lodo na Europa terá um aumento de cerca de 60% TDS/ha/ano (Tonelada de Sólido Seco/hectare/ano) até o ano 2000 e que portanto é preciso encontrar soluções que evitem acúmulo ainda maior deste resíduo. Caso contrário, haverá um aumento dos índices de poluição, que poderá ser agravado, principalmente no caso de uma forma de disposição incorreta, como por exemplo seu lançamento em corpos d'água.

Para encontrar a melhor maneira de dispor este resíduo é preciso primeiro caracterizá-lo e a partir daí buscar soluções que melhor se adaptem, compatibilizando as características do lodo e forma de disposição. Segundo STOLL&PARAMESWARAN (1996) a forma de disposição deve ser baseada nas características do lodo, nas quantidades geradas no presente e futuro, e numa avaliação dos custos financeiros, que serão gerados pela forma de disposição selecionada.

São conhecidas algumas alternativas de disposição do lodo de esgoto, como por exemplo, incineração, disposição em oceanos, disposição em aterros, ou ainda utilização em solos agrícolas como condicionante, sendo esta última a forma mais adequada do ponto de vista ecológico e econômico (LIU, 1982).

Das formas citadas anteriormente, a disposição do lodo em oceanos não é uma prática recomendada, pois o lodo pode conter metais pesados e grande quantidades de compostos orgânicos, que seriam incorporados pela fauna aquática, gerando mudanças nesta (LIU, 1982). Esta forma de disposição já vem sendo questionada há muito tempo em toda a Europa.

Em 1972, a partir da Convenção de Oslo, foram firmados acordos para diminuir os níveis de poluição marinha, causada pela disposição do lodo no Mar do Norte e Atlântico Nordeste. Neste acordo, ficou também estabelecido que a dispersão do lodo em oceanos só deve ser feita em áreas pré-determinadas e que para tanto, são necessárias licenças, as quais devem ser renovadas anualmente de acordo com a quantidade e qualidade do lodo a ser disposto. Também é necessário levar em consideração as características da área em que será realizado o despejo, para que possam ser avaliadas as modificações que ocorrerão nesta (MATTHEWS, 1992).

---

Ainda em relação a disposição do lodo nos oceanos, existem outros acordos estabelecendo diretrizes, para que esta cesse por completo até dezembro de 1998 e que até esta data, o volume de lodo disposto desta forma não seja aumentado. Além disto, é preciso reduzir qualquer constituinte tóxico, persistente ou bio-acumulativo no lodo, para preservar a fauna aquática (MATTHEWS, 1992). Nos EUA a disposição do lodo em oceanos é proibida desde 1991 (HEMPHILL, 1992).

A incineração também não parece ser a forma mais adequada para solucionar a questão da disposição do lodo. Este processo possui alto custo operacional e pode causar problemas de poluição atmosférica (LIU, 1982). Segundo MATTHEWS (1992), além do custo e da emissão de gases, que podem contribuir para aumentar os níveis de poluição, há a questão das cinzas geradas ao final do processo, e que precisam ter um destino final adequado. Geralmente estas cinzas acabam sendo dispostas em aterros sanitários e muitas vezes são consideradas resíduo perigoso, principalmente se houver a presença de metais pesados.

Apesar de alguns problemas, a incineração, quando bem controlada e com recuperação de energia pode ser um processo vantajoso, principalmente quando não é possível a utilização do

lodo (por exemplo como condicionante) devido ao seu alto teor de metais ou excesso de nutrientes. Esta prática é adotada para cerca de 7% do todo lodo produzido na Europa e a tendência é que sua utilização aumente. O maior problema do uso da incineração é a possibilidade de emissão de substâncias tóxicas como as dioxinas (DAVIS, 1996).

A disposição do lodo de esgoto em aterros é uma prática antiga e que tem como desvantagem a necessidade de se encontrar áreas em que possa ser realizada, além dos possíveis riscos de contaminação do solo e dos aquíferos por patógenos, como por exemplo protozoários, que devido ao pequeno tamanho dos cistos e oocistos, podem facilmente migrar pela água (EPA, 1993). Como uma alternativa mais viável surge a disposição do lodo de esgoto em solos aproveitando o potencial fertilizante deste resíduo.

Segundo PILLAI, WIDMER et al. (1996), o lodo de esgoto é utilizado de forma rotineira na agricultura em várias partes do mundo. Com a proibição da disposição de lodo nos oceanos e o aumento das restrições para disposição em aterros, esta prática acaba sendo favorecida, e tende a ser cada vez mais utilizada no futuro.

### **3.2 - Disposição do Lodo no Solo**

A utilização do lodo de esgoto em solos agrícolas é uma prática antiga e que faz parte da agricultura tradicional (HAYS, 1977). Segundo esta autora, existem outros aspectos que favorecem a utilização dos resíduos gerados pelas Estações de Tratamento de Esgotos (ETE) na agricultura, dentre os quais pode-se destacar:

1. estes resíduos não podem ser dispostos em corpos d'águas pois causariam a eutrofização das águas elevando os níveis de poluição;
2. os custos para repor nutrientes em solos esgotados são altos, e como o lodo de esgoto é uma fonte valiosa destes nutrientes, pode-se aproveitar o potencial nutritivo do resíduo;
3. o custo de algumas tecnologias para a disposição do lodo, como a incineração, é alto. Portanto,

a possibilidade de reaproveitar o resíduo torna-se cada vez mais atrativa, considerando a questão econômica.

Os benefícios da utilização do lodo nos solos são também reconhecidos por BURGE&MARS (1978), que citam entre outros, a reposição de nutrientes esgotados em solos pobres, a melhoria da estrutura física dos solos e sua recuperação. Além disto, a aplicação de lodo de esgoto no solo promove a reciclagem dos constituintes orgânicos e minerais, sendo ainda uma alternativa de disposição de menor custo (SANIN, VESIIND et al., 1994).

STOLL&PARAMESWARAN (1996) definem a utilização do lodo na agricultura como uma forma de gerenciamento de resíduo, que combina reuso e reciclagem de uma matéria rica em elementos importantes para as plantas. Deste modo, pode-se considerar uma boa opção o reuso deste resíduo como condicionante do solo, com aplicação na agricultura, pela alta concentração de matéria orgânica e elementos, como P e N (HU, GIBBS et al., 1996). No entanto, os autores lembram que o lodo contém patógenos que podem colocar em risco a saúde humana.

Para que sejam obtidos bons resultados, a utilização do lodo deve ser feita de modo disciplinado. Para atingir este objetivo, é necessário suporte técnico que garanta a qualidade do lodo, principalmente no que diz respeito a patógenos e metais pesados. Além da garantia de qualidade, é preciso que realizar programas que incentivem a utilização deste resíduo em solos agrícolas, para torná-la mais popular entre os agricultores (MATTHEWS, 1992).

A utilização do lodo de esgoto deve ser feita de forma controlada para não prejudicar os solos. Uma forma de obter este controle é através de normas que disciplinem seu uso. Estas normas, além de disciplinarem a aplicação do lodo, consideram os possíveis impactos que podem ocorrer se a forma de aplicação não for correta (MATTHEWS, 1992).

Além de indicar como deve ser feita a aplicação do lodo no solo, as normas sugerem qual a taxa (TDS) de aplicação de lodo no solo que deve ser usada. NUVOLARI (1996) através da aplicação de lodo de esgoto, estudou a biodegradação da matéria orgânica presente no lodo, com

diferentes taxas de aplicação: 5,0; 10,0 e 15,0 TDS/ha, respectivamente. Considerando os testes de respirometria, a taxa de 5,0 TDS/ha foi a que melhor se adaptou às condições da pesquisa, levou cerca de 20 dias para ocorrer a biodegradação, sendo esta a recomendada. É importante definir a taxa de aplicação de lodo, que o solo tem condições de receber, sem que exceda seus limites de saturação.

As normas também fazem referências sobre a presença de possíveis patógenos, que podem ser encontrados no lodo. Para garantir a qualidade do lodo, em relação aos patógenos, é aconselhado realizar análises que possam indicar sua presença antes da aplicação, para não colocar em risco a saúde do homem.

De forma geral, as análises realizadas para verificar a presença de patógenos utilizam índices, que dizem respeito a presença de organismos indicadores de contaminação fecal, como por exemplo os coliformes fecais. Porém, deve-se lembrar que nem sempre a isenção de organismos indicadores, como os coliformes fecais, asseguram que o lodo está livre de patógenos, como por exemplo protozoários, que podem ser mais resistentes que estes microrganismos (HELMER, HESPANHOL et al., 1991; HO, TAM et al., 1995).

Ainda se tratando de patógenos, WÜZER, WIEDENMAMM et al. (1995) consideram em seu trabalho, que os resíduos gerados nas ETE's podem conter quantidades significativas de patógenos humanos, os quais podem, além da agricultura, provocar contaminação de fontes de água, se forem usados indiscriminadamente e sem orientação.

Segundo a EPA (1992), o lodo de esgoto tem elementos nutritivos benéficos para as plantas (P e N) e propriedades condicionantes do solo, no entanto também pode conter organismos patogênicos, como bactérias, vírus, protozoários, e outros microrganismos que podem causar doenças ao homem. Deve-se considerar que a aplicação do lodo no solo pode criar uma fonte de exposição em potencial para o homem, se o resíduo estiver contaminado com patógenos. Esta contaminação pode ocorrer de forma direta ou indireta.

Entre as formas de contaminação direta pode-se citar:

1. contato com o lodo inadvertidamente;
2. caminhar sobre a área em que o lodo foi aplicado, logo após esta aplicação;
3. manuseio do solo e produtos deste onde o lodo foi aplicado; e,
4. inalação dos patógenos durante a aspersão do lodo, ou utilizando o solo após a aplicação.

Já as formas de contaminação indireta podem ocorrer dos seguintes modos:

1. consumo de cultivos contaminados pelos patógenos onde o lodo foi aplicado;
2. consumo do leite e outros produtos alimentares obtidos de animais criados em pastagens onde o lodo foi utilizado;
3. ingestão de água contaminada, no caso de fontes próximas de locais de aplicação do lodo, ou pela migração dos microrganismos pelo aquífero;
4. consumo de peixe contaminado não adequadamente cozido; e,
5. contato com vetores (pássaros, roedores, etc.) que entraram em contato com o lodo contaminado.

No caso de patógenos, além da necessidade da caracterização microbiológica é preciso conhecer o comportamento destes microrganismos no solo após a utilização do lodo. Sabe-se que a sobrevivência e viabilidade destes organismos no solo, pode ser afetada por diversos fatores como umidade, exposição aos raios solares, temperatura, pH, etc. De um modo geral a taxa de sobrevivência no solo para estes organismos está expressa na Tabela 3.1:

TABELA 3.1 - Tempo de sobrevivência de patógenos no solo.

<b>PATÓGENO</b>	<b>MÁXIMO ABSOLUTO</b>	<b>MÁXIMO COMUM</b>
<b>Bactéria</b>	1 ano	2 meses
<b>Vírus</b>	1 ano	3 meses
<b>Cistos de protozoários</b>	10 dias	2 dias
<b>Ovos de helmintos</b>	7 anos	2 anos

FONTE: EPA, 1992.

Como pode-se verificar, a partir da Tabela 3.1, estes patógenos sobrevivem bastante tempo no solo, principalmente no caso os ovos de helmintos, e portanto, podem ser responsáveis pela disseminação de doenças entéricas, se houver um contato direto com o homem.

No caso dos (oo)cistos de protozoários, pode-se verificar que estes possuem uma taxa de sobrevivência baixa no solo, sendo destruídos pelos diversos fatores ambientais, como por exemplo falta de umidade. Por este motivo, geralmente não são considerados uma ameaça à saúde pública e animais, não sendo citados, na maioria das vezes, nos guias que regulamentam a utilização do lodo, ou em medidas que possam eliminar patógenos presentes no lodo de esgoto (EPA, 1992).

Porém, existem trabalhos que contrariam a questão da baixa viabilidade dos (oo)cistos no solo. Há indícios que os oocistos de coccídios, por exemplo *Cryptosporidium*, podem permanecer viáveis no solo por 15 meses, enquanto que os cistos de *E. histolytica* sobrevivem 42 horas em solos úmidos e 18 horas quando o solo está seco (EPA, 1986). Estes trabalhos não especificam as condições em que esta sobrevivência pode ocorrer, apenas apontam que existe esta possibilidade, e que neste caso, podem ser responsáveis pela disseminação de doenças.

HU, GIBBS et al. (1996) também encontraram cistos de *Giardia* no lodo de esgoto que ficou estocado pelo período de um ano. Além disto, este protozoário pode resistir por vários meses em águas com temperaturas entre 4 e 10°C e são mais resistentes aos processos de desinfecção que os coliformes fecais. Segundo estes autores, a presença dos cistos deste protozoário é um fator importante para impedir o reuso do lodo, principalmente em solos agrícolas, que neste caso pode colocar em risco a saúde das pessoas que entrarem em contato com este resíduo.

Há controvérsia em relação ao tempo de sobrevivência dos (oo)cistos de protozoários fora de seu habitat. É preciso realizar estudos detalhados para que se possa afirmar com segurança a viabilidade destes patógenos no lodo de esgoto e no solo.

### 3.3 - Patógenos do Lodo

Sabe-se que o lodo de esgoto contém uma grande variedade de microrganismos. Estes podem ser de vida livre, ou patogênicos, sendo estes últimos agentes que podem colocar em risco a saúde do homem e outros animais.

Estes organismos são responsáveis por doenças entéricas de veiculação hídrica, e portanto facilmente transmissíveis. Os principais grupos destes patógenos são: bactérias, vírus, protozoários e helmintos (vermes) (BURGE&MARSH, 1978). Os principais microrganismos patogênicos encontrados no lodo de esgoto doméstico estão citados na Tabela 3.2.:

TABELA 3.2 - Principais patógenos do lodo de esgoto e doenças relacionadas

TIPO	ORGANISMO	DOENÇA
Bactéria	<i>Salmonella</i> spp <i>Shigela</i> spp <i>Leptospira</i> spp <i>Vibrio cholerae</i>	Salmonelose Desintéria bacilar Doença de Weil Cólera
Vírus	Hepatite A Adenovirus	Hepatite infecciosa Doença respiratória, infecção nos olhos, gastroenterite
Protozoários	<i>Cryptosporidium</i> spp <i>Giardia lamblia</i> <i>Entamoeba histolytica</i>	Diarréia (gastroenterite) Diarréia (gastroenterite) Desintéria amebiana
Helmintos	<i>Ascaris lumbricoides</i> <i>Toxocara</i> spp <i>Taenia</i> spp <i>Ancylostoma duodenalis</i>	Ascariíase Febre, dor abdominal Teníase Anemia

FONTE: Adaptado EPA- 1993

Segundo SANIN, VESIIND et al. (1994) o lodo de esgoto possui microrganismos patogênicos de origem entérica e não patogênicos, como por exemplo os coliformes fecais e streptococcus. Estes microrganismos podem ser transmitidos ao homem por via direta- como por exemplo através da contaminação das mãos, ou através de outros organismos que entrem em

contato com o lodo contaminado- neste caso são os vetores, que podem ser representados pelos pássaros e roedores (FOESS&SIEGER, 1993).

De acordo com HAYS (1977) a utilização do lodo de esgoto em solos agrícolas deve levar em conta os riscos de uma possível contaminação deste resíduo por patógenos. Para tentar minimizar estes risco, é necessário realizar programas de monitoramento que acompanhem as concentrações de bactérias, vírus, protozoários e vermes no solo após a aplicação do lodo. Não deve-se esquecer, que além do solo é preciso tomar cuidado para que o aquífero também não seja contaminado, pois altos índices de patógenos no lodo, podem levar a contaminação deste e afetar seu uso (LIU, 1982).

Quando a idéia é a de utilizar este lodo como condicionante de solo, é de suma importância o cuidado para que os patógenos sejam eliminados, considerando que mesmo este resíduo sendo tratado por processos convencionais como digestão anaeróbia ou secagem, pode ainda conter patógenos, colocando em risco a saúde (GIBBS, HU et al., 1995).

Segundo THIRIAT, BIGOT et al. (1997), a disposição do lodo através de sua aplicação no solo é uma alternativa econômica, mas que deve ser cuidadosamente monitorada para prevenir qualquer contaminação com patógenos, como por exemplo cistos de *Giardia*, que podem trazer sérias conseqüências para a saúde pública.

De acordo com a EPA (1992), a saúde pública e dos animais, pode ser protegida dos patógenos existentes no lodo de diversas formas dentre as quais pode-se citar:

1. redução do número de patógenos através do tratamento do lodo e/ou atenuação ambiental;
2. redução do transporte de patógenos por vetores, através da eliminação ou redução destes; e,
3. limitando o contato humano e de animais nos locais em que o lodo for utilizado, até que ocorra uma diminuição natural nos níveis destes patógenos.

Ainda em relação a existência de patógenos no lodo, a EPA (1992) recomenda que a densidade máxima destes microrganismos, que pode estar presente no lodo de esgoto, deve ser

reduzida a níveis que não coloquem em risco a saúde humana, que são os seguintes:

- Salmonella* spp - menor que 3 (organismos) por 4 gramas de sólidos totais no lodo de esgoto
- Vírus entéricos - menor que 1(organismo) por 4 gramas de sólidos totais no lodo de esgoto
- Ovos de helmintos viáveis - menor que 1(organismo) por 4 gramas de sólidos totais no lodo de esgoto.

Nesta publicação não há nenhuma referência quanto à densidade máxima de protozoários patogênicos que pode ser encontrada no lodo de esgoto, sem colocar em risco a saúde. Uma possível justificativa é a baixa resistência destes microrganismos no ambiente, embora, segundo HU, GIBBS et al. (1996), existam evidências que estes patógenos podem permanecer no lodo pelo período de até 1 ano.

---

### 3.3.1 - Protozoários do Lodo

Os protozoários são seres unicelulares, microscópicos, e constituídos por citoplasma e núcleo. Podem ser encontrados em ambientes aquáticos ou no solo. Há uma grande variedade destes microrganismos presentes no lodo de esgoto, que podem ser de vida livre ou parasitas do homem e de outros animais.

O citoplasma destes microrganismos é constituído por uma camada externa mais densa (ectoplasma), que tem função de proteção, locomoção e ingestão de alimentos, e uma camada interna (endoplasma) que possui várias organelas necessárias para a sobrevivência do organismo, como por exemplo, vacúolo digestivo (Figura 3.2).

O núcleo é uma estrutura responsável pela reprodução e controle das funções vitais da célula. O número desta estrutura é variável, sendo este um fator importante na identificação e caracterização das diferentes espécies de protozoários.

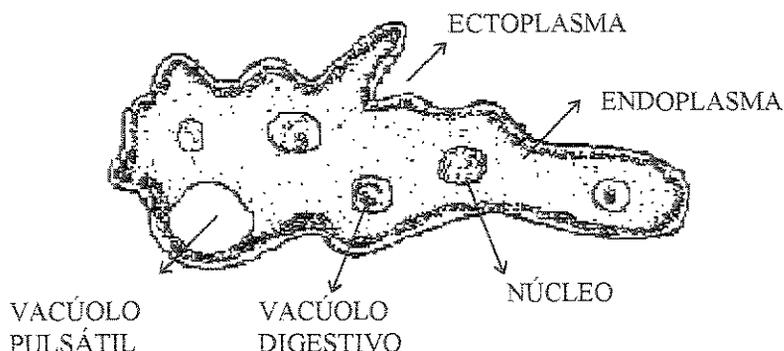


FIGURA 3.2 - Esquema geral de um protozoário (ameba)

FONTE: Adaptado PESSÔA& MARTINS (1982)

Uma outra característica destes microrganismos é a formação de cistos, que é uma forma de resistência do protozoário. Os cistos são formas capazes de resistir às condições adversas do ambiente, como por exemplo diminuição da umidade, e podem voltar a sua forma original quando as condições ambientais forem novamente favoráveis. Além disto, os cistos são eliminados pelos organismos infectados e são portanto, responsáveis pela disseminação das doenças causadas por estes parasitas. Alguns protozoários não formam cistos, mas sim oocistos, que são as formas reprodutivas responsáveis pela disseminação da parasitose.

Os protozoários podem ser agrupados em 4 classes distintas, de acordo com seu modo de locomoção:

1. Classe Sarcodina- os protozoários pertencentes a esta classe locomovem-se através de estruturas denominadas pseudópodos, que são formadas pela movimentação do seu citoplasma. Neste grupo estão presentes as amebas e dentre estas, *Entamoeba histolytica*, que é um protozoário patogênico presente no lodo de esgoto;
2. Classe Ciliophora- estes protozoários apresentam numerosos cílios responsáveis pela locomoção e captura de alimentos. Um protozoário de vida livre, comum ao lodo de esgoto e pertencente a este grupo, é *Vorticella* spp;

3. Classe Mastigophora- estes protozoários locomovem-se com a ajuda de uma estrutura denominada flagelo. Nesta classe estão presentes vários protozoários parasitas do homem., como por exemplo, *Giardia lamblia*, protozoário patogênico encontrado no esgoto;

4. Classe Sporozoa- nesta classe todos os protozoários são parasitas e não possuem estrutura de locomoção. O *Cryptosporidium* spp é um protozoário pertencente a este grupo, e comumente encontrado no lodo de esgoto.

Os protozoários encontrados no lodo de esgoto podem, ou não, serem patogênicos. Há uma grande variedade de protozoários de vida livre que são comuns à fauna do lodo, dentre os quais podemos citar: *Vorticella* spp (Figura 3.3), *Amoeba* spp, *Opercularia* spp, entre outros. Estes protozoários são importantes na degradação da matéria orgânica, além de serem responsáveis por manter o equilíbrio da fauna do lodo.

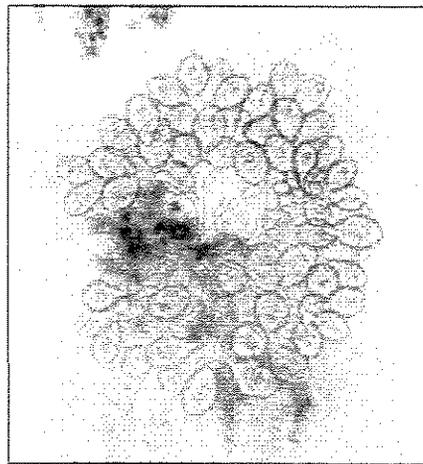


FIGURA 3.3 - Colônia de *Vorticella* spp no lodo de esgoto

FONTE: CETESB- 1989.

Apesar dos protozoários de vida livre, que são comuns no lodo e benéficos, pois contribuem para estabilizar a matéria orgânica, há a possibilidade da presença de protozoários

patogênicos, que podem ser prejudiciais para o homem e ambiente. Estes protozoários, comuns ao lodo de esgoto doméstico, são responsáveis principalmente por doenças entéricas e gastroenterites, pois são parasitas do intestino humano.

A principal forma de transmissão destas doenças é através da via oro-fecal. Os indivíduos contaminados eliminam, em seus excretas, as formas infectantes destes microrganismos, que acabam atingindo a rede de esgoto doméstico, e de forma inadequada o solo. Quando as condições de saneamento são precárias e não há tratamento adequado do esgoto, estas formas acabam sendo eliminadas e descartadas junto com o esgoto em corpos d'água, e deste modo são transmitidas através da água contaminada, pois a água é considerada um vetor em potencial para a transmissão de doenças (TEUNIS, MEDEMA et al., 1997).

O tamanho dos cistos dos protozoários dificulta sua retenção durante os processos físicos, como por exemplo a filtração que pode ocorrer durante o tratamento. Com isto, estes microrganismos acabam acumulados no lodo, sendo necessário um tratamento deste para sua completa remoção (EPA, 1986).

Um indivíduo, não infectado, ao entrar em contato com águas que receberam despejo de origem doméstica, sem tratamento, poderá ser infectado e desta forma o ciclo de transmissão da doença está completo (Figura 3.4).

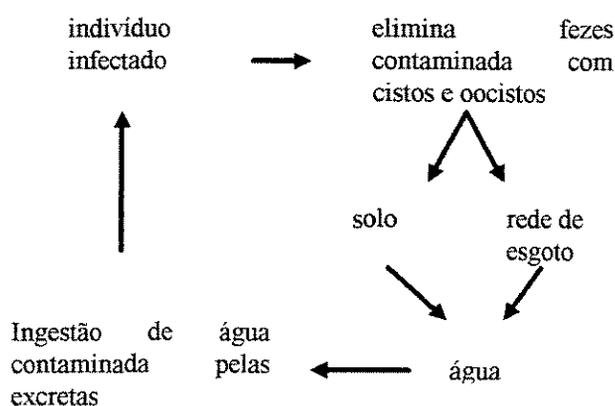


FIGURA 3.4 - Esquema de contaminação pela água.

Segundo FALK, KARANIS et al. (1998), os estágios infectantes (oo)cistos são excretados juntamente com as fezes de pessoas infectadas e são transmitidos pela via fecal-oral pela água contaminada ou alimento, ou ainda pelo contato direto hospedeiro-hospedeiro. As águas superficiais podem estar contaminadas com (oo)cistos através do esgoto humano ou fezes de animais. Todas as águas de fontes superficiais, particularmente em regiões de precário saneamento básico estão sujeitas a este tipo de contaminação.

A concentração de patógenos capaz de infectar um indivíduo, depende do grau de infectividade do (oo)cisto, que está diretamente relacionada com sua viabilidade (poder de causar infecção), e da resistência do organismo do indivíduo ao entrar em contato com o patógeno. Segundo TEUNIS, MEDEMA et al. (1997), apesar da concentração dos microrganismos patogênicos ser relativamente baixa, ainda assim há risco de contaminação para alguns consumidores.

Esta concentração de patógenos necessária para que um indivíduo contraia uma dessas doenças nem sempre é alta. Para *Entamoeba histolytica*, a infecção pode aparecer mesmo após a ingestão de apenas 1 cisto, porém, a dose infectiva (concentração) mais comum fica entre 10 e 100 cistos ingeridos. No caso de *Giardia lamblia*, esta concentração infectiva varia entre 25 e 100 cistos ingeridos (FEACHEM, BRADLEY et al., 1983), e para *Cryptosporidium* a concentração é de 10 oocistos (EPA, 1993).

A falta de um sistema adequado de tratamento de esgoto, principalmente nos lugares com saneamento básico menos desenvolvido, aumenta a probabilidade da disseminação de doenças parasitárias, o que pode levar a uma epidemia destas doenças (GRIMASON, SMITH et al., 1993). Por este motivo, devido a esta falta de tratamento, e do despejo de esgoto no corpos d'água, fica fácil entender porque ainda hoje estes protozoários são responsáveis pelo alto índice de doenças entéricas, considerando, em alguns casos, que a concentração necessária para a infecção pode ser de apenas 1 (oo)cisto. Além disto, os (oo)cistos, pelo seu pequeno tamanho, são capazes de passar através dos processos de tratamento e atingirem a água, seu principal veículo de propagação.

### 3.3.2 - Protozoários Patogênicos

Entre os protozoários patogênicos podemos citar os mais comuns no esgoto e águas residuárias, como por exemplo *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, etc.. Estes microrganismos são responsáveis por doenças entéricas e gastroenterites facilmente transmitidas através do contato do homem e outros animais, com água e lodo contaminados.

A infecção causada por estes protozoários provoca gastroenterites com diarreia, vômitos e dores abdominais. Estes protozoários são parasitas do intestino humano e alimentam-se das células vermelhas do sangue (hemácias), dificultando a absorção de alimentos pelo intestino. Em indivíduos mais debilitados, principalmente crianças, estas doenças podem até provocar morte, pela falta de resistência do indivíduo.

O protozoário *Entamoeba histolytica* (Figura 3.5) pertence a classe Sarcodina e pode ser associado com condições sanitárias precárias. Seus cistos são pouco encontrados em águas superficiais, mas estão presentes onde há contaminação fecal (FEACHEM, BRADLEY et al., 1983). Este protozoário foi descrito pela primeira vez em 1875 por Lösch, que encontrou os cistos presentes nas fezes de um camponês russo (PESSÔA&MARTINS, 1982). Em 1967, KOTT&KOTT detectaram a presença de cistos de *Entamoeba histolytica* em efluentes de esgoto.



FIGURA 3.5 - Cistos de *Entamoeba histolytica*

FONTE- PESSÔA&MARTINS, 1982.

*Giardia lamblia* (Figura 3.6.) é um protozoário flagelado de ampla distribuição, principalmente em áreas de saneamento precário. Os cistos deste protozoário são resistentes ao cloro e muito comuns no esgoto (FEACHEM, BRADLEY et al., 1983). Seus cistos foram descritos pela primeira vez em 1859 por Lambl (PESSÔA&MARTINS, 1982).

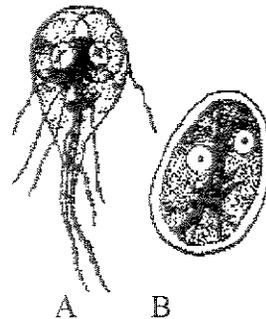


FIGURA 3.6 - *Giardia lamblia*: forma vegetativa(A) e cisto(B).

FONTE- PESSÔA&MARTINS, 1982.

O protozoário *Giardia* também é comumente encontrado no esgoto e causador de doença entérica (HOLMAN, FROST et al., 1983; GASSMANN&SCHWARTZBROD, 1991; HU, GIBBS et al., 1996). Este microrganismo é resistente aos processos de desinfecção, como por exemplo a cloração, que é muito utilizada nas estações de tratamento. Nos EUA, este protozoário é responsável por cerca de 60% das gastroenterites provocadas por ingestão de águas contaminadas (GILMOUR, SMITH et al., 1991).

*Cryptosporidium parvum* é um protozoário coccídio, pertencente à Classe Sporozoa, e tem sido atualmente muito estudado devido a estreita relação deste parasita com os portadores do vírus da AIDS, já que é considerado um parasita oportunista (CASEMORE, 1991). Como já foi mencionado anteriormente, este protozoário não apresenta a forma de cisto, mas sim de oocistos, que são as formas reprodutivas transmitidas e irão completar seu ciclo de vida ao entrarem em contato com o hospedeiro. Os oocistos são liberados para o ambiente juntamente com as fezes do

homem e outros animais, e são capazes de viver longos períodos no ambiente.

Os oocistos de *Cryptosporidium* também são muito encontrados em amostras de água e esgoto. Uma pesquisa realizada no Arizona, Califórnia, Texas e outros estados norte americanos, detectou a presença deste protozoários em 77% das amostras de água que foram analisadas (ROSE, 1988 *apud* SMITH, McDIARMID et al., 1989), revelando que além de possuir ampla distribuição, este protozoário é resistente aos processos de tratamento de águas e esgoto. Existem várias espécies deste protozoário, mas a que parasita o homem é o *C. parvum* (CASEMORE, 1991; SMITH, McDIARMID et al., 1989).

Os (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* são atualmente considerados os mais problemáticos, pois possuem distribuição universal e são responsáveis por grande parte das doenças entéricas de veiculação hídrica (KARANIS, SCHOENEN et al., 1998). Estes (oo)cistos são extremamente resistentes ao ambiente hostil e podem sobreviver em condições ambientais extremas, além de serem mais resistentes a certos processos de tratamento que as bactérias indicadoras (KFIR, HILNER et al., 1995). As epidemias causadas por estes protozoários, têm sido reportadas durante os anos passados nos EUA e em muitos países da Europa. Os dois são responsáveis por causar diarreia em humanos e em muitos outros animais (FALK, KARANIS et al., 1998), e sua presença na água residuária e tratada tem sido responsável por numerosas epidemias de diarreia (AHMAD, LEE et al., 1997).

*Cryptosporidium* e *Giardia* são protozoários patogênicos entéricos, parasitas obrigatórios que produzem doença gastrointestinal. A forma infectiva é o cisto e/ou oocisto que pode ser transmitido através da água e alimentos contaminados (BERTOLUCCI, GILLI et al., 1998).

Existem trabalhos que indicam que o efluente e o lodo de esgoto podem ser fontes de (oo)cistos responsáveis pela contaminação da água. Porém existem poucos estudos que examinam e confirmam sua ocorrência no esgoto. As concentrações destes parasitas dependem do tamanho da comunidade contribuinte e do nível de infecção desta comunidade (BUKHARI&SMITH,

1995).

Segundo BERTOLUCCI, GILLI et al. (1998), os (oo)cistos podem viver por longos períodos no ambiente e representam uma grande preocupação por causa do risco para a saúde, resistência aos desinfetantes e tamanho e dimensão que permitem sua passagem através do leito de filtração. Ainda não é conhecida qual a influência da idade e permanência no ambiente do (oo)cisto na infectividade e conseqüente risco para a saúde. A informação da concentração infectante é pouca.

A coexistência destes parasitas no mesmo ambiente é comum, o que aumenta a necessidade de se encontrar uma forma segura de eliminá-los, além dos cuidados necessários para evitar a proliferação destes protozoários (KFIR, HILNER et al., 1995). Estes protozoários são reconhecidos na última década como a causa mais comum de gastroenterites em países desenvolvidos e em desenvolvimento (GRIMASON, SMITH et al., 1993; EPA, 1986).

Estes protozoários são responsáveis pela alta incidência de doenças entéricas e devem ser tratados com rigor pelos sanitaristas, por sua maior resistência que organismos indicadores e por poderem sobreviver a alguns processos de desinfecção usados nas ETE's, apesar do tratamento de esgotos ser considerado como uma barreira importante para reduzir a concentração (oo)dos cistos de protozoários patogênicos (GAVAGNHAM, SYKORA et al., 1993). Apesar disto, ELLIS, RODRIGUES et al. (1993) afirmam que o tratamento convencional de esgotos não é totalmente eficiente na remoção de organismos parasitas. Geralmente é preciso uma combinação de diferentes métodos para que sejam eliminados o maior número possível destes agentes.

Segundo a EPA (1992), a redução dos patógenos deve ser feita antes da utilização do lodo de esgoto, e é necessária uma combinação de diferentes parâmetros, como por exemplo temperatura e pH, para que a eficiência do processo aumente e o número de patógenos seja reduzido.

Sabe-se que os (oo)cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium* podem passar através dos

processos convencionais usados no tratamento de água e esgoto. Existem alguns processos, físicos, químicos ou biológicos, que podem diminuir o número destes patógenos. Na Tabela 3.3 são apresentados alguns processos mais utilizados e sua eficiência na redução dos patógenos mais comuns, além da eficiência na redução de alguns vetores que podem ser responsáveis pela transmissão destes microrganismos.

TABELA 3.3 - Algumas propostas para controlar patógenos e vetores no lodo de esgoto

<b>Proposta</b>	<b>Eficiência</b>	<b>Processo</b>
Eliminar patógenos com altas temperaturas (através de processo físicos, químicos ou biológicos)	Depende do tempo e da temperatura. Temperaturas suficientes mantidas por tempos longos podem reduzir bactérias, vírus, cistos de protozoários e ovos de helmintos à níveis baixos. Os helmintos são mais resistentes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Compostagem</li> <li>• Secagem térmica</li> <li>• Pasteurização</li> <li>• Digestão aeróbia</li> <li>• Digestão anaeróbia</li> </ul>
Eliminar patógenos com radiação	Depende da dose. Doses suficientes podem reduzir os patógenos mais comuns. Os vírus são mais resistentes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Radiação Gama</li> <li>• Feixe de elétron de alta energia</li> </ul>
Eliminar patógenos com desinfetantes químicos	Reduz substancialmente bactérias, vírus e vetores. <u>Provavelmente reduz cistos de protozoários.</u> Não é eficiente para ovos de helmintos, a não ser quando combinado com calor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cloração</li> <li>• Estabilização com cal</li> </ul>
Inibir o crescimento dos patógenos reduzindo o conteúdo orgânico volátil do lodo de esgoto (fonte de alimentos de microrganismos)	Reduz bactéria e os vetores	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Digestão aeróbia</li> <li>• Digestão anaeróbia</li> <li>• Compostagem</li> </ul>
Inibir a sobrevivência dos patógenos reduzindo a umidade do lodo	Reduz vírus e bactérias. Reduz a atração dos vetores quanto mais tempo o lodo permanecer seco. <u>Provavelmente eficiente em reduzir cistos de protozoários.</u> Não é eficiente para helmintos, a menos que esteja combinado com outro processo, por exemplo, alta temperatura.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Secagem térmica</li> <li>• secagem por ar</li> </ul>

FONTE- EPA, 1992. (Em destaque as observações referentes aos cistos de protozoários)

Os (oo)cistos dos protozoários comportam-se de modo diferente aos processos utilizados para a desinfecção do lodo. Segundo CASEMORE (1991), os oocistos de *Cryptosporidium* são resistentes ao cloro; porém são suscetíveis a grandes variações de temperaturas e baixa umidade, e também possuem alguma sensibilidade a irradiação por uv.

MADORE, ROSE et al. (1987), trabalhando com *Cryptosporidium* verificaram que este protozoário é mais resistente aos processos de desinfecção que as bactérias, podendo permanecer viável mesmo após 24 horas de exposição a uma temperatura de 4°C em solução de hipoclorito de sódio 3%. Os cistos de *Giardia* foram encontrados ainda viáveis mesmo após 12 meses de estocagem de lodo (GIBBS, HU et al., 1995).

O cloro, muito usado para desinfecção nas ETE's, também não é totalmente eficiente na redução dos patógenos. Sabe-se que vírus entéricos, (oo)cistos de protozoários e ovos de helmintos podem resistir ao processo de cloração, permanecendo no lodo (BURGE&MARSH, 1978; HELMER, HESPANHOL et al., 1991). Além disso, para que a cloração seja um processo eficiente é preciso considerar a concentração deste desinfetante e o tempo de contato do resíduo a ser desinfetado com o agente.

O hidróxido de cálcio  $\text{Ca(OH)}_2$  também é um agente químico que pode ser utilizado para eliminar organismos patogênicos. Este agente é capaz de reduzir enterobactéria e pseudomonas em níveis não detectáveis; porém sua eficiência não é comprovada para (oo)cistos de protozoários (*Giardia* e *Cryptosporidium*) e ovos de helmintos quando usados por um período inferior a três meses (WÜRZER, WIEDENMAMM et al., 1995).

Outro fator que deve ser considerado, em relação aos protozoários patogênicos, é que estes são mais resistentes que os coliformes fecais, e portanto, é preciso considerar que nem sempre a ausência destes indica que também não há presença de outros microrganismos, como por exemplo *Giardia* (HO, TAM et al., 1995). Segundo HELMER, HESPANHOL et al. (1991) os coliformes fecais não são bons indicadores da presença/ausência de protozoários patogênicos e helmintos, pois estes podem ser mais resistentes aos processos de desinfecção.

AHMAD, LEE et al. (1997), concluem em seu trabalho que a relação qualitativa entre a presença de cistos de *Giardia* e coliformes fecais existiram em 9 de 10 amostras de água, porém, a análise estatística indicou que não havia correlação significativa entre a concentração de cistos de *Giardia* e a concentração de coliformes fecais no esgoto. O nível de bactérias coliformes e a turbidez são critérios para a qualidade da água, bem como os coliformes fecais, mas estes critérios não demonstram a ausência/presença dos parasitas na água final (KARANIS, SCHOENEN et al., 1998).

O trabalho feito por JAKUBOWISK, BOUTROS et al. (1996), confirmam a dificuldade em correlacionar coliformes fecais e outros parasitas, como os protozoários de forma segura, pois dados obtidos sobre a qualidade da água, coletados durante epidemias de veiculação hídrica, que ocorreram entre 1991/92, indicam que o grupo coliformes foi somente encontrado em 33% das amostras que estavam contaminadas com protozoários patogênicos. Estes dados vêm confirmar que o grupo dos coliformes fecais pode não ser bom indicador da contaminação por protozoários patogênicos.

### **3.4 - Métodos de Recuperação dos Protozoários Presentes no Lodo**

A detecção dos protozoários não é fácil de ser realizada, já que estes microrganismos encontram-se dispersos em grandes volumes de amostra e os métodos usados para detecção nem sempre possuem índices satisfatórios de recuperação. No caso do lodo de esgoto, pode haver ainda uma grande quantidade de material particulado dificultando a separação e identificação destes microrganismos.

A maioria dos métodos utilizados para análise do lodo são variações dos desenvolvidos para análise de águas residuárias (SANIN, VESIIND et al., 1994), já que não existem métodos padronizados para recuperar e identificar protozoários patogênicos em grandes volumes de amostras (GRIMASON, SMITH et al., 1993). Atualmente, o modo de detecção é caro e

demorado, e além disto a literatura indica diferentes técnicas, porém com taxa de recuperação que diferem muito nos trabalhos existentes (FALK, KARANIS et al., 1998).

Para conhecer qual a real concentração de cistos de *Giardia* no esgoto é preciso determinar um método real de detecção e enumeração, bem como o conhecimento de sua viabilidade. No entanto, são poucos os métodos publicados e a recuperação apresentada por estes métodos é muito baixa (THRIAT, BIGOT et al., 1997).

De um modo geral, os métodos de baseiam-se na concentração dos cistos dos protozoários através da centrifugação, seguida por sedimentação ou suspensão e posterior observação ao microscópio óptico ou de imunofluorescência. A identificação dos microrganismos é feita com base em suas características morfológicas, como dimensões e presença de determinadas estruturas internas, por exemplo o número e a posição dos núcleos presentes.

Para recuperar os (oo)cistos podem ser utilizadas as soluções de sulfato de zinco e sacarose, e em alguns casos formol/éter, ou a simples decantação. Estes métodos são também usados em laboratório de parasitologia, como procedimento de rotina. Após a concentração dos cistos é feita a coloração (lugol) e posterior análise das lâminas, no microscópio óptico comum, no aumento de 10 e 40 vezes.

#### 3.4.1 - Recuperação por Suspensão dos (oo)Cistos

Neste método, a recuperação dos (oo)cistos de protozoários é feita promovendo sua suspensão. Esta suspensão é obtida com a utilização de solução de sulfato de zinco ou solução de sacarose. Após a centrifugação da amostra com a solução em questão, a película formada no sobrenadante é transferida, com a ajuda de uma alça de platina, para uma lâmina, corada com lugol e observada ao microscópio.

#### 3.4.1.1 - Recuperação com Solução de Sulfato de Zinco- ZnSO<sub>4</sub> (33%)

O sulfato de zinco é utilizado na centrifugação, promovendo a suspensão dos (oo)cistos. É conhecido como método de Faust e utiliza a solução na concentração de 33%.

Este método foi utilizado por KOTT&KOTT (1967) para concentrar cistos de *Entamoeba histolytica* presentes em amostras de efluentes de esgoto. As amostras (5-10 litros) foram centrifugadas e para a suspensão dos cistos foi utilizado ZnSO<sub>4</sub>; após a centrifugação os cistos foram coletados e corados com lugol para observação em microscópio óptico.

A solução de sulfato de zinco também foi usada por MARZOCHI (1977) para a recuperação de protozoários patogênicos presente no solo. Neste caso foram coletadas amostras de solo (200 a 250 gramas), que foram transferidas para um cálice graduado de 1000cm<sup>3</sup>. O volume deste cálice foi completado com solução saturada de NaCl (cloreto de sódio) até o volume final.

A suspensão obtida foi deixada em repouso por 10 minutos e após este tempo o sobrenadante foi transferido para um recipiente de 5 litros, cujo volume foi completado com água destilada e novamente deixado em repouso. O precipitado obtido após este repouso foi centrifugado com sulfato de zinco, e para análise dos protozoários foi coletada a película que se forma no sobrenadante, com a ajuda de uma alça de platina e transferida para uma lâmina com lugol e examinada ao microscópio óptico.

Esta mesma solução foi utilizada por ELLIS, RODRIGUES et al. (1993) para concentrar e recuperar cistos de protozoários e ovos de helmintos presentes em lagoas de estabilização. As amostras coletadas, foram inicialmente centrifugadas (1000g X 10min) e o sobrenadante foi descartado. Após isto procedeu-se nova centrifugação com 5ml de solução de sulfato de zinco 33%. Para análise foram tomadas alíquotas de 1ml e observadas ao microscópio óptico comum.

### 3.4.1.2 - Recuperação com Sacarose

A sacarose também pode ser utilizada para promover a suspensão dos cistos dos protozoários. McHARRY (1984) utilizou esta solução para suspender os cistos de *Giardia* presentes em efluentes de esgoto. As amostras foram filtradas e lavadas com água destilada até o sobrenadante ficar limpo. O sedimento obtido foi então centrifugado com solução sacarose 1,5M (800g X 2min). Para observação foi utilizada microscopia óptica.

MADORE, ROSE et al. (1987) utilizaram esta solução para suspender cistos de *Cryptosporidium* presentes em efluentes de esgoto. Inicialmente as amostras foram centrifugadas (1200rpm X 1min); o precipitado obtido pela centrifugação foi suspenso em formalina 10% e refrigerado. Transcorrida a refrigeração, este precipitado foi lavado e suspenso em solução 1% de Tween 80 (utilizado para promover a separação das células, e desta forma facilitar a identificação). Para a concentração final dos cistos foi utilizada solução de sacarose. O precipitado foi centrifugado e o sobrenadante foi observado com uma gota de lugol em microscópio óptico comum.

A solução de sacarose também foi utilizada por SMITH, McDIARMID et al. (1989) para concentrar oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água. As amostras foram primeiramente filtradas e o filtrado final foi suspenso em solução de sacarose por centrifugação. Após a centrifugação o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e lavado em água destilada para remover a sacarose. Para identificação dos oocistos foram usadas técnicas de microscopia óptica (coloração com lugol) e de imunofluorescência.

Para verificar a ocorrência e viabilidade de cistos de *Giardia* na água, GILMOUR, SMITH et al. (1991) também utilizaram a solução de sacarose. Segundo SYKORA et al. (1991), que também concentraram cistos de *Giardia* presentes na água, com solução de sacarose, esta solução é eficiente para concentrar cistos presentes em amostras de baixas densidades ou separá-los de altas concentrações de matéria particulada, como no caso do lodo.

Com o objetivo de determinar qual a melhor concentração de sacarose para promover a suspensão dos cistos de *Giardia duodenalis* e *Entamoeba coli*, MOITINHO&FERREIRA (1992) testaram várias concentrações desta solução, e baseado nestas concentrações e nas massa específicas dos cistos, concluíram que os melhores índices de recuperação foram obtidos com solução de massa específica igual a  $1200\text{kg/m}^3$ . A solução com essa concentração permitiu suspensão de cerca de 90% dos cistos, o que indica um alto índice de recuperação.

A solução de sacarose 1M também foi usada por KFIR, HILNER et al. (1995) para concentrar cistos de *Giardia* e *Cryptosporidium*.

Outra solução também utilizada para promover a suspensão dos cistos presentes em amostras de água foi o carbonato de cálcio-  $\text{CaCO}_3$  (VESEY, SLADE et al., 1993). Segundo os autores, este método não causa muita compactação das células após a centrifugação. Este método também foi usado por SHEPHERD&WHY-JONES (1995).

### 3.4.2 - Recuperação pela Sedimentação dos (oo)Cistos

Neste caso os (oo)cistos são concentrados pela sua sedimentação no precipitado formado durante a centrifugação. Pode-se utilizar a técnica do formol/éter, ou ainda a simples decantação da amostra. Depois de centrifugada a amostra, faz-se a observação do precipitado com a ajuda de microscópio óptico comum.

#### 3.4.2.1 - Recuperação com Formol/Éter

O formol/éter é um método utilizado em procedimentos de rotina em laboratório de parasitologia. Este método foi usado por SMITH (1989) para concentrar oocistos de

*Cryptosporidium* presentes em amostras de água.

HO, TAM et al. (1995) também utilizaram a sedimentação com formol/éter para concentrar cistos de *Giardia* presentes em amostras de água.

#### 3.4.2.2 - Concentração por Simples Decantação

Esta metodologia também é comum em laboratório de parasitologia e é conhecida como Método de Hoffman. A concentração pode ser feita por simples decantação, ou em alguns casos, utilizando centrifugação da amostra com água destilada. Esta metodologia foi utilizada por HOLMAN, FROST et al. (1983) para concentrar cistos de *Giardia* presentes na água.

### 3.5 - Recuperação dos (oo)Cistos

O maior problema dos métodos utilizados para concentração dos (oo)cistos, é o baixo índice de recuperação apresentado. A perda pode ocorrer durante a filtração ou concentração dos (oo)cistos.

Durante a filtração da amostra a ser analisada, deve-se tomar cuidado para que não ocorram grandes perdas de material. Para evitar este tipo de problema é preciso padronizar os métodos utilizados, que conseguem os maiores índices de recuperação (SHEPHERD&WHY-JONES, 1995). Esta padronização é importante para que o número de microrganismos presentes nas amostras não seja subestimado, já que as perdas são grandes durante os procedimento de laboratório (GILMOUR, SMITH et al. 1991).

As perdas, além de ocorrerem durante a filtração, também podem acontecer durante a centrifugação da amostra pela destruição dos (oo)cistos. Outro problema que pode ocorrer, é que os métodos utilizados tendem a compactar outras partículas ao redor dos (oo)cistos causando problemas na hora de identificação (VESEY, SLADE et al., 1993).

Para tentar minimizar estas perdas, KFIR, HILNER et al. (1995) utilizaram métodos específicos para concentração de vírus em amostras de água que continham protozoários. Estes métodos são baseados na ultrafiltração das amostras através de membranas filtrantes usadas para concentrar vírus e os índices de recuperação obtidos ficaram em torno de 50%, o que levou os autores a concluir que esta metodologia também podem ser adaptada e usada na recuperação de cistos de protozoários.

Visando também uma melhor recuperação de cistos de protozoários presentes em amostras de água, HO, TAM et al. (1995) usaram primeiramente a filtração da amostra em gaze, seguida por filtração em filtro Milipore, cujo diâmetro de poro era 1,2 $\mu$ . Depois da filtração, os filtros foram lavados com formol, para promover extração completa dos cistos e garantir sua recuperação, que neste trabalho ficou em torno de 61%.

Os melhores índices de recuperação foram os obtidos por SHEPHERD&WHY-JONES (1995) que testaram vários tipos de filtro para verificar qual apresentava melhor recuperação na concentração de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água de rio. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a filtração realizada em filtro de acetato de celulose e diâmetro de poro de 1,2 $\mu$  teve o melhor resultado, com recuperação de cerca de 70% dos oocistos.

Além da importância da concentração dos (oo)cistos, é preciso identificá-los. Esta identificação é baseada na morfologia destes cistos, ou seja, da observação do formato, tamanho, estruturas internas como núcleo, etc.. Para ajudar nas observações são realizadas técnicas de coloração, que podem ser simples como a utilização do lugol (que cora estruturas internas) ou mais sofisticadas como as técnicas de coloração de imunofluorescência que utilizam anticorpos específicos para marcar os (oo)cistos.

Mesmo com a utilização da imunofluorescência, podem ocorrer erros na identificação dos organismos. Em trabalho realizado por ROSE et al. (1988, apud BUKHARI, SMITH et al., 1997), notaram que os anticorpos usados para detectar os oocistos tinham reação cruzada com leveduras, o que acabou gerando erro na interpretação dos resultados, pois a quantidade real de oocistos que a amostra continha, era na verdade menor que a quantidade encontrada, pois as leveduras tinham sido identificadas como oocistos.

A coloração com lugol foi utilizada por KOTT&KOTT (1967) para corar cistos de *Entamoeba histolytica* presentes em amostras de esgoto, e por JAKUBOWSKI, SYKORA et al. (1991) para corar cistos de *Giardia*, também em amostras de esgoto.

Os métodos utilizados para concentrar (oo)cistos de protozoários presentes em lodo de esgoto, além de apresentarem baixos índices de recuperação, não permitem determinar se os cistos recuperados estão ou não viáveis. É preciso desenvolver técnicas que assegurem a viabilidade dos cistos encontrados, já que os métodos comumente usados podem indicar que há contaminação, mas não a viabilidade dos organismos patogênicos encontrados nestas amostras (GILMOUR, SMITH et al., 1991).

Enquanto esta técnicas não estão à disposição, a melhor forma de garantir a utilização do lodo de esgoto com segurança é assumindo que todos os cistos encontrados são viáveis e portanto podem colocar em risco a saúde do homem se esta utilização não for feita com cuidado (HU, GIBBS et al., 1996).

De um modo geral, os métodos para concentração de (oo)cistos são ineficientes. Um trabalho feito pela SPDL indicou índice de recuperação para oocistos de *Cryptosporidium* entre 3-29%, e para cistos de *Giardia* entre 27-60%, entretanto existem trabalhos que apresentam índices de recuperação menores. A eficiência de recuperação é tem maior variação quando o número de organismos é baixo, e com isto acaba-se subestimando a porcentagem de amostras que são positivas e a concentração de (oo)cistos nesta amostras (THRIAT, BIGOT et al., 1997).

A necessidade da padronização de uma metodologia, que seja eficiente na recuperação dos (oo)cistos dos protozoários patogênicos, faz-se cada vez mais necessária para ajudar a detectar a presença destes microrganismos, que são cada vez mais comuns e causam sérios problemas epidemiológicos, quando contaminam a água e solo. É preciso encontrar uma maneira fácil de recuperá-los, para que análises de controle da qualidade da água e outros resíduos, como o lodo de esgoto sejam parte da rotina, garantindo a saúde do homem e ambiente, e permitindo a reciclagem de resíduos, que deve ser feita visando a qualidade ambiental.

---

## 4 - METODOLOGIA

Neste trabalho foi analisada a presença de protozoários patogênicos no lodo de esgoto, na mistura solo/lodo após a aplicação do lodo e a água percolada nos reatores, também após a aplicação. Além disto foram avaliados diferentes métodos de recuperação dos protozoários para verificar qual método era mais eficiente.

É importante a padronização de um método de recuperação dos (oo)cistos de protozoários, pois não existem métodos padronizados para este resíduo, que seja específico para os protozoários. Existem alguns Kits de imunofluorescência que podem ser usados para identificar os (oo) cistos, porém são métodos sofisticados e caros, e que além disto necessitam de um microscópio de imunofluorescência, que nem todo laboratório possui.

Desta forma, neste trabalho procurou-se avaliar, dentro de métodos simples utilizados em laboratórios de parasitologia, para exames de rotina, um método que fosse capaz de proporcionar uma boa recuperação destes (oo)cistos.

De um modo geral, o trabalho pode ser dividido em 5 etapas:

- seleção de métodos de concentração dos cistos de protozoários;
- montagem dos reatores;
- aplicação do lodo de esgoto no solo dos reatores;
- observação dos cistos de protozoários; e,
- modificações na metodologia do sulfato de zinco.

#### 4.1 - Seleção de Métodos para Recuperação dos Cistos de Protozoários

A seleção de métodos de recuperação dos (oo)cistos de protozoários foi a primeira etapa do trabalho a ser realizada. Foram testados 4 métodos para verificar o que obtinha maior índice de recuperação dos cistos de protozoários. Estes métodos são comumente utilizados em laboratórios de parasitologia para concentração de cistos de protozoários e ovos de helmintos em exames de fezes. Estes métodos também são usados para concentrar os patógenos em amostras de água e efluente de esgoto.

Esta seleção foi feita com o objetivo de definir qual apresentava maior índice de recuperação e também que permitia maior clareza e facilidade na identificação dos (oo)cistos de protozoários presentes no lodo de esgoto.

Para a realização dos testes, era necessário que o lodo de esgoto estivesse contaminado com um número conhecido de patógenos. A fim de garantir esta contaminação, foi adicionado um sedimento (*pool*), resultante de exames de fezes de pessoas contaminadas, com estes patógenos. Este material foi obtido junto ao Laboratório de Parasitologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP. O material era guardado fixado em formol 10%.

Antes de adicionar o *pool* obtido no hospital, foi feita uma contagem de 1ml (com 3 repetições) do material para saber o número de cistos/ovos por ml. Na Figura 4.1 está demonstrado o esquema geral dos métodos analisados.

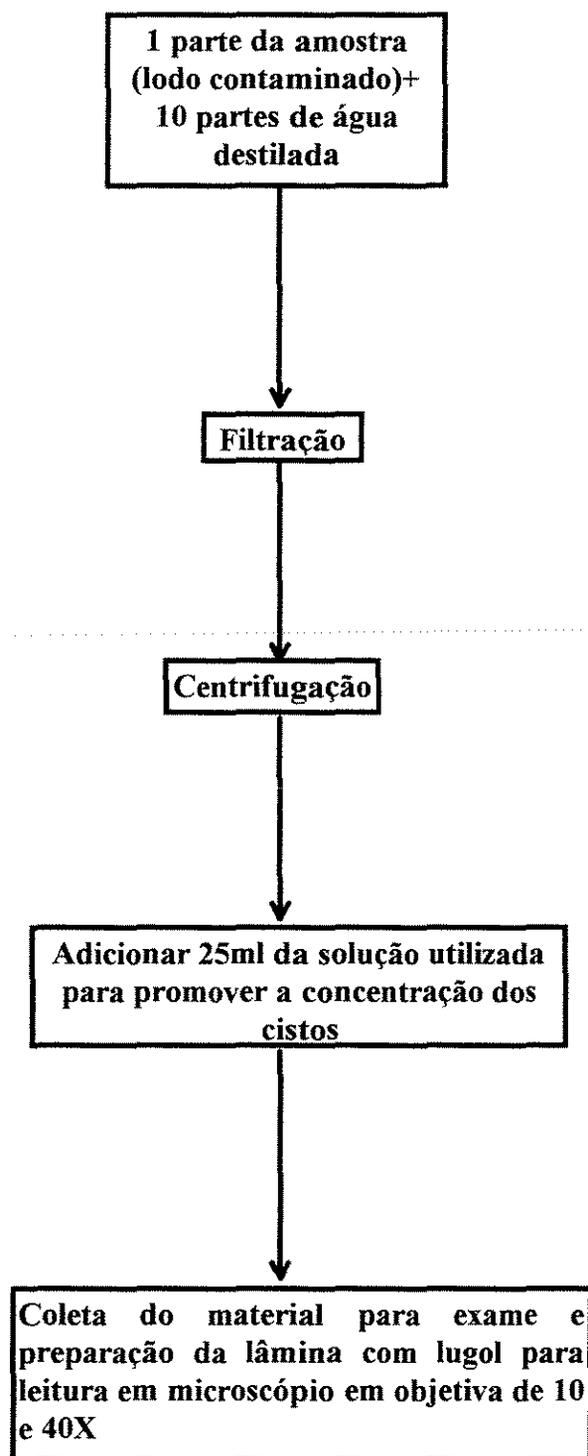


FIGURA 4.1 - Esquema geral do preparo da amostra para testar as metodologias

Após a contagem, o *pool* de patógenos (100ml) foi adicionado a uma amostra de 200ml de lodo de esgoto. Esta amostra foi então subdividida em 12 amostras e cada método foi testado com 3 repetições.

#### 4.1.1 - Método de Hoffman (sedimentação simples)

O método consiste basicamente em deixar o líquido filtrado, no caso o lodo de esgoto previamente contaminado, ou a mistura solo/lodo, em um cálice de sedimentação por um período de repouso mínimo de 2 horas. Após o repouso, utilizando uma pipeta Pasteur retira-se do fundo do cálice uma pequena parte do material sedimentado. Este material é colocado sobre uma lâmina limpa, corado com lugol, coberto com lamínula e observado em microscópio óptico comum nas objetivas de 10 e 40X.

#### 4.1.2 - Método de Faust (suspensão)

Este método é baseado na suspensão dos (oo)cistos pela diferença de densidade. A suspensão inicial (lodo + *pool* + solo) é filtrada em gaze. O líquido filtrado é então transferido para um tubo de centrifuga e centrifugado por 5 minutos a 1500rpm. O líquido sobrenadante é decantado e adicionou-se cerca de 10ml de água destilada. Procedeu-se nova centrifugação e descartou-se novamente o líquido sobrenadante. Este procedimento é necessário para “lavar o sedimento”.

Depois que o sedimento estiver limpo, adiciona-se 25ml de sulfato de zinco 33% e realizou-se nova centrifugação 5 minutos a 1500rpm. Para o exame microscópio do material, é retirado material da película sobrenadante superficial, com a ajuda de uma alça de platina. O material coletado é colocado sobre uma lâmina limpa, corado com lugol e coberto com lamínula. A observação é feita em microscópio óptico comum nas objetivas de 10 e 40X.

#### 4.1.3 - Método da Sacarose (suspensão)

O princípio deste método também é a suspensão dos (oo)cistos através da diferença de densidade. O procedimento adotado é o mesmo descrito para o método de Faust, só que a solução utilizada para recuperar os cistos é a sacarose na concentração 1M.

#### 4.1.4 - Método do formol/éter (sedimentação)

Neste método a recuperação dos (oo)cistos é feita pela sedimentação. Após a centrifugação do filtrado, adiciona-se ao sedimento 10ml de solução formol 7,5% e deixa a mistura em repouso durante 20 ou 30 minutos. Depois deste período adiciona-se 3ml de éter, tampa-se o tubo e agita-se vigorosamente. É feita nova centrifugação por 5 minutos 1500rpm. Após a centrifugação limpa-se os detritos superficiais do tubo e o sobrenadante é decantado. O material observado é o que fica sedimentado no tubo de centrifuga, que deve ser coletado e transferido para uma lâmina limpa junto com uma gota de lugol, para posterior observação em microscópio óptico comum nas objetivas de 10 e 40X.

Para a realização desta etapa foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos:

- solução de sulfato de zinco nas concentrações 33%;
- solução formol 10%;
- solução Sacarose 1M;
- éter etílico;
- lugol (corante);
- vidrarias de laboratório;
- alça de platina;
- gaze;
- lâmina e lamínula;
- centrifuga;
- balança analítica; e,
- microscópio óptico comum (Carl-Zeiss- Jenamed 2) nas objetivas de 10 e 40X.

## 4.2 - Montagem dos Reatores

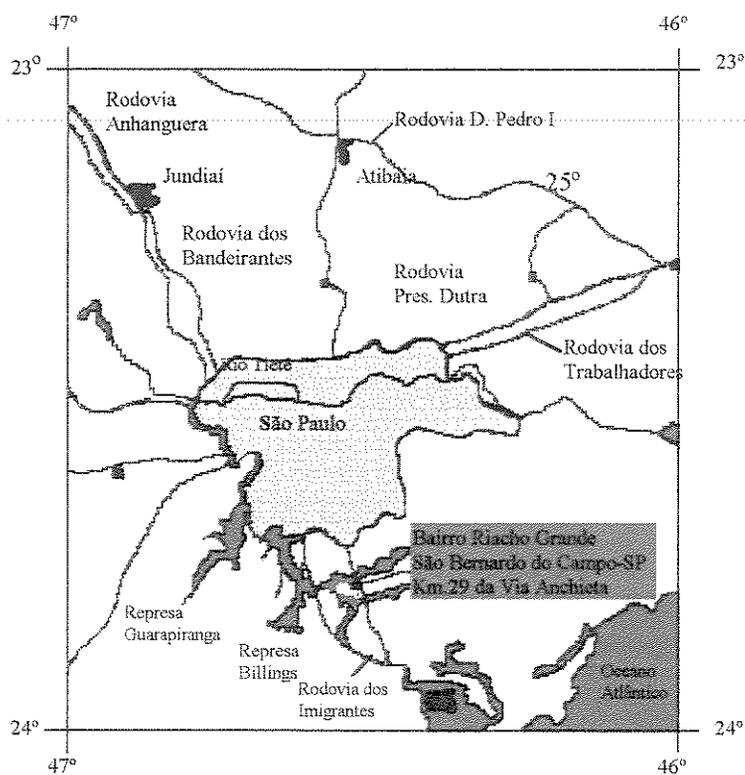
### 4.2.1 - Lodo de esgoto

O lodo de esgoto usado no trabalho foi coletado em São Bernardo do Campo- SP, na estação de tratamento do Bairro Riacho Grande (Figura 4.2), situada às margens da represa Billings. O sistema usado na ETE é valo de oxidação com aeração prolongada. O esgoto tratado é basicamente de origem doméstica ,com população equivalente a 10.000 habitantes.

A vazão afluyente é de  $5 \text{ L}^{\text{s}^{-1}}$ . A ETE possui 1 unidade de gradeamento, 2 caixas de areia, 2 valos de oxidação, 2 decantadores e 1 poço para armazenamento de lodo. O esgoto entra no valo de oxidação, que possui um aerador (escova rotativa com placas de madeira) para fornecer oxigênio, e inicia-se a degradação da matéria orgânica pelas bactérias aeróbias. Do valo de oxidação, o esgoto segue para os decantadores, onde ocorre a separação dos sólidos sedimentáveis. O sobrenadante sai e o lodo retorna ao valo de oxidação para reativá-lo e deste forma manter a biomassa de microrganismos. O tempo de detenção do lodo no valo de oxidação é de cerca de 30 dias e o descarte final acontece a cada 3-4 semanas para o leito de secagem.



MAPA GERAL DO ESTADO



DETALHE DA RMSP

FIGURA 4.2- Localização da ETE Riacho Grande- SBC-SP  
 (A) Mapa Geral do Estado de São Paulo  
 (B) Detalhe da Localização da ETE

#### 4.2.2 - Materiais

##### Montagem dos Reatores

Os reatores foram montados no Campus do Centro Superior de Educação Tecnológica-CESET/UNICAMP- situado em Limeira-SP, e para esta etapa foram usados os seguintes materiais:

- 12 recipientes de plástico (bombonas);
- 400 litros de areia média-grossa;
- 600 litros de pedra britada nº1;
- 3m<sup>2</sup> de solo (terra fina seca ao ar);
- 300 litros de argamassa de cimento e areia;
- 30m<sup>2</sup> de Bidin (OP-30 da Rodhia);
- 12 adaptadores com rosca e flange para caixa d'água de diâmetro 3/4";
- 48 unidades de sonda porosa (capacidade 125ml);
- 48 caixas de acrílico (capacidade 150ml);
- 200 metros de mangueira acrílica com diâmetro 5mm; e,
- cal.

Cada recipiente plástico possui as seguintes medidas: 1,0m de altura por 0,60m de diâmetro. Cada recipiente foi fixado em cima de blocos assentados com argamassa de cimento e areia a uma altura de 0,4m do terreno para permitir a coleta de amostras do líquido percolado, cujo ponto de descarte (drenagem) está situado no fundo (Figura 4.3).

A montagem dos reatores foi feita seguindo os passos descritos a seguir:

1. primeiro os recipientes plásticos (bombonas) foram lavados para que qualquer resíduo fosse eliminado;

2. a seguir, os recipientes foram furados na base, para que o líquido que drenasse após a aplicação do lodo pudesse ser coletado para posterior análise;

3. a parte inferior do recipiente foi então preenchida com argamassa de cimento para nivelar a base;

4. depois da secagem da argamassa, foi colocada uma camada de pedra britada e areia. Recobrimo estas camadas foi colocado o Bidin (manta acrílica); e,

5. depois disto, o recipiente começou a ser preenchido com o solo. Foram feitas 4 camadas de 15cm, sendo que em cada camada foram colocadas 1 unidade de ponta porosa e 1 unidade de caixa acrílica, para coleta de líquido. Estas unidades foram disposta em espiral, para que uma unidade não ficasse situada exatamente acima da outra.

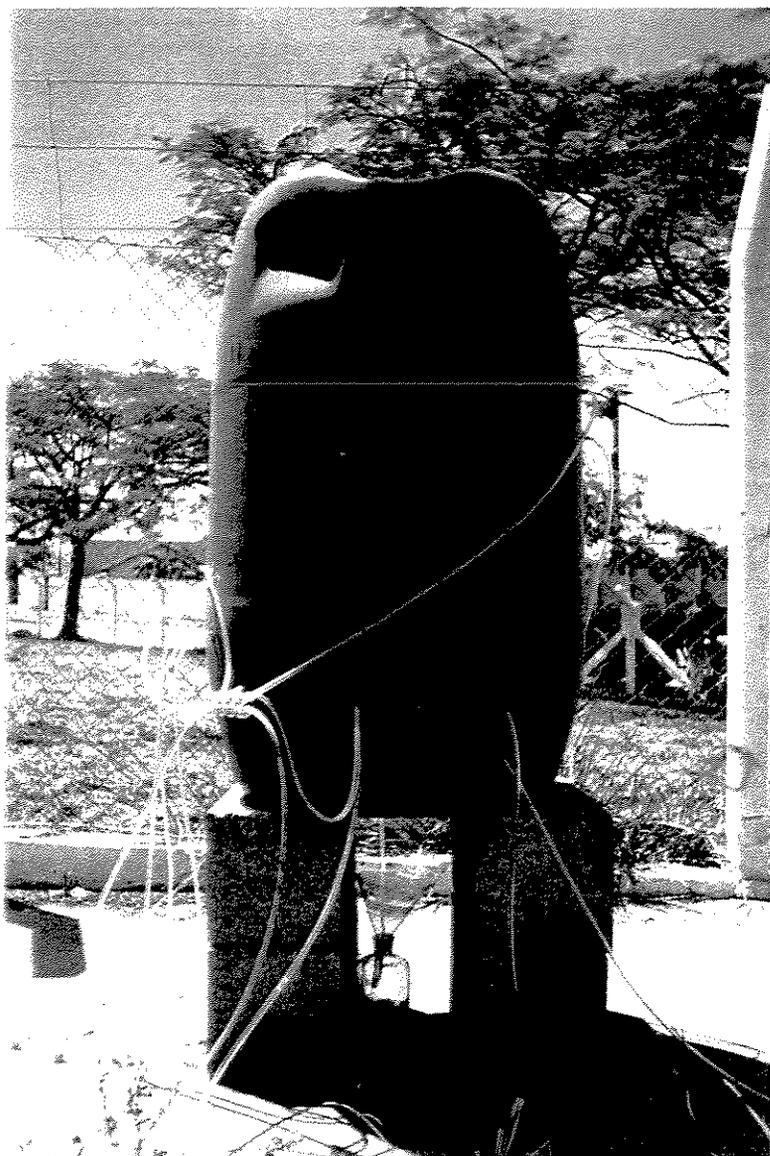


FIGURA 4.3 - Reator montado para o experimento.

Estes reatores foram montados em duas séries, uma com o pH natural do solo e outra com correção de pH (em torno de 7,0). Foram utilizadas 3 taxas de aplicação de lodo de esgoto nos reatores de pH não corrigido, e nos reatores de pH corrigido apenas uma. Ambas as séries tinham o controle, no qual não foi aplicado lodo de esgoto. Na Tabela 4.1 estão descritas as taxas de aplicação de lodo nos reatores:

TABELA 4.1 - Taxas de aplicação de lodo

TAXA DE APLICAÇÃO DE LODO	REATOR COM SOLO -pH NATURAL	REATORES COM SOLO -pH CORRIGIDO
0 (CONTROLE)	2 REATORES	2 REATORES
2,5 TDS	2 REATORES	-
5,0 TDS	2 REATORES	2 REATORES
7,5 TDS	2 REATORES	-

TDS- Tonelada de Sólido Seco por Hectare

O lodo de esgoto foi aplicado no solo na forma líquida, porém mantendo-se os valores calculados para as taxas na forma de matéria seca. Para se obter o volume do lodo líquido equivalente ao peso seco foi necessário, antes da aplicação, a determinação do sólidos totais (ST) no lodo a cada aplicação.

As reaplicações do lodo de esgoto foram feitas após um tempo mínimo de 42 dias, que era o tempo necessário para degradar a matéria orgânica. Este intervalo de tempo foi determinado de acordo com ensaios de respirometria, do CO<sub>2</sub> gerado (NUVOLARI, 1996).

Foram feitas 5 aplicações de lodo de esgoto nos reatores (bombonas), nas seguintes datas: 03/06/97, 04/09/97, 01/12/97, 10/03/98 e 09/07/98.

O solo usado no experimento foi retirado do local natural até uma profundidade máxima de 0,30m devido a maior proliferação e atividades microbianas e transportado para o local do

experimento, onde foi disposto nos reatores. O solo utilizado foi previamente analisado no IAC - Instituto Agronômico de Campinas e tinha as seguintes características (Tabela 4.2):

TABELA 4.2 - Caracterização do solo utilizado no experimento

P <sub>resina</sub>	M.O.	pH CaCl <sub>2</sub>	K	Ca	Mg	Acidez potencial H+Al	Soma de bases SB	C.T.C	Saturação em bases V
µg/cm <sup>3</sup>	%		meq/100 cm <sup>3</sup>						%
2	0,4	4,5	0,04	0,3	0,1	2,3	0,4	2,7	16

#### 4.2.3 - Análise do lodo de esgoto

Para a verificação da presença de (oo)cistos de protozoários patogênicos, o lodo de esgoto era observado ao chegar da ETE. Para garantir a conservação do material, este era fixado em formol 10%. Para as análises foi utilizado o método de Faust (sulfato de zinco), pois já havia sido feita uma seleção de metodologia, e esta foi a que recuperou de forma mais eficiente os (oo)cistos de protozoários. A seguir estão descritos os passos do procedimento:

1. 10ml de lodo de esgoto era retirado da amostra total e misturado com 10 partes (100ml) de água destilada;
2. essa mistura era então filtrada em gaze;
3. o filtrado era colocado em tubo de centrifuga e centrifugação durante 5 minutos a 1500rpm, esta etapa era repetida até que o sobrenadante final estivesse límpido;
4. quando o sobrenadante já estava límpido, 25ml de solução de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>) 33% era adicionado;
5. nova centrifugação por mais 5 minutos a 1500rpm;
6. coleta do material da película sobrenadante com alça de Platina a transferência do material para uma lâmina com lugol; e,

7. observação no microscópio óptico comum em objetivas de 10 e 40X.

#### 4.2.4 - Análise da mistura solo/lodo

Após a aplicação do lodo de esgoto no solo, eram retiradas amostras para análise da presença de (oo)cistos de protozoários. Para cada análise era separada 10g da mistura solo/lodo (depois de ter sido feito o quarteamento), que era suspensa em 100ml de água destilada e filtrada em gaze. O filtrado era concentrado por centrifugação (5min X 1500rpm), e o sobrenadante era descartado e novamente adicionada água destilada para proceder a lavagem do sedimento.

Depois desta lavagem, o sobrenadante era descartado e adicionava-se 25ml de solução de sulfato de zinco 33%. Era feita nova centrifugação para promover a suspensão dos (oo)cistos (5min X 1500rpm). Após esta centrifugação o material era coletado da película sobrenadante com alça de platina e transferido para uma lâmina com uma gota de lugol para posterior observação em microscópio óptico comum em objetivas de 10 e 40X.

#### 4.2.5 - Análise do líquido percolado após aplicação do lodo no solo

O líquido percolado após a aplicação do lodo de esgoto no solo era coletado em um recipiente de vidro colocado embaixo das bombonas. Para esta análise, 10ml do líquido eram misturados com 100ml de água destilada. Esta mistura era então centrifugada (5min X 1500rpm). Cerca de 1ml do líquido era reservado, no qual adicionava-se 25ml de solução sulfato de zinco para promover a suspensão dos (oo)cistos.

### 4.3 - Identificação dos protozoários

A identificação dos (oo)cistos dos protozoários foi feita com base nas suas características morfológicas como formato, dimensão, presença de núcleos, entre outros. Os cistos são estruturas claras e que podem ser diferenciados pela posição e número de núcleos. A utilização do lugol facilita a observação destas estruturas. Para que a identificação fosse mais rápida, foram usadas chaves de identificação, e fotografias presentes em livros de parasitologia (KATZ, 1989).

As lâminas devem ser completamente observadas, para garantir que a contagem está sendo feita na lâmina inteira. A Figura 4.4 é um esquema de como deve ser feita a observação da lâmina, para garantir que toda a superfície da lâmina será analisada.

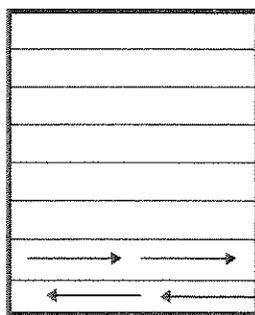


FIGURA 4.4 - Esquema de observação da lâmina: setas indicam sentido de leitura na lamínula

### 4.4 - Modificações no Método de Sulfato de zinco

Este foi um dos métodos testados para verificar a porcentagem de recuperação dos (oo)cistos. Além da concentração da solução de sulfato de zinco em 33%, foram também testadas as concentrações de 50% e 75%, além de dois tempos de repouso da amostra, 2 e 24 horas, antes

de iniciar a filtração e centrifugação da amostra. Estas modificações foram feitas com o objetivo de aumentar o índice de recuperação dos(oo)cistos.

Para testar os métodos e facilitar o acompanhamento da recuperação dos cistos de protozoários foi montada uma parte experimental no Laboratório de Saneamento -FEC-UNICAMP. Foram usadas garrafas plásticas de refrigerante de 2 litros (tipo PET), as quais foram preenchidas com o mesmo solo usado nas bombonas.

As garrafas (Figura 4.5) foram previamente lavadas e cortadas a parte superior. Na parte inferior das garrafas foi feito um furo, para que ao aplicar o lodo a água que percolasse não ficasse retida. As garrafas foram então enchidas com o mesmo solo utilizado nos reatores em Limeira.



FIGURA 4.5 - Garrafas (PET) montadas para ensaios em laboratório.

Para que as modificações pudessem ser feitas, foi novamente necessário garantir que o lodo de esgoto estivesse contaminado com (oo)cistos de protozoários. Neste caso, também foi necessário utilizar material positivo de exame de fezes, que foi novamente obtido junto ao Laboratório de Parasitologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP e Laboratório de Parasitologia da Prefeitura de Campinas.

Foi feita uma contagem no *pool* de protozoários para que fosse conhecido o número de cistos/ml. Após a contagem, foi adicionado em cada garrafa, 10ml deste *pool* em 200ml de lodo de esgoto. A partir daí foram realizadas análises no lodo de esgoto e no solo que recebeu o lodo.

A amostra era coletada, e suspensa em 100ml de água destilada. Depois de 2 horas de repouso a amostra era analisada, ou então era deixada em repouso por 24h. Depois de transcorrido o tempo de repouso a análise começava:

A contagem dos microrganismos era feita através da coleta do material que estava suspenso logo após a centrifugação com a solução de sulfato de zinco, e que era coletado com ajuda da alça de platina.

As lâminas eram coradas com lugol e observadas em microscópio óptico comum no aumento de 40X. De cada amostra era contado 1ml e tirado a média, sendo que foram feitas três repetições para cada combinação de concentração da solução de sulfato de zinco e tempo de repouso da amostra, com exceção da solução na concentração 75%, que só foi testada para o tempo de repouso da amostra de 24 horas.

Depois de realizadas as análises foram tiradas as médias e desvio padrão dos resultados obtidos, para que pudesse ser feita comparação das diferentes concentrações da solução de sulfato de zinco e tempo de repouso da amostra.

## **5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos na parte experimental. Para facilitar a compreensão, os resultados serão apresentados separadamente, seguindo as etapas apresentadas na metodologia no capítulo 4.

---

É importante que esta metodologia seja definida, e que seja dada maior atenção a estes protozoários patogênicos, que podem ser responsáveis por altos índices de doenças entéricas.

### **5.1 - Seleção de métodos para recuperação dos (oo)cistos de protozoários:**

Para definir qual a melhor metodologia que seria utilizada para a recuperação dos (oo)cistos de protozoários no lodo de esgoto e na mistura solo/lodo foram testadas 4 metodologias diferentes. Os testes foram feitos segundo o esquema apresentado no item 4.1 do capítulo 4.

Como pode ser observado na Revisão Bibliográfica (capítulo 3), os métodos testados para recuperação dos (oo)cistos de protozoários patogênicos no lodo de esgoto, são métodos usados para a recuperação destes microrganismos em amostras de água e efluentes de esgoto. Não existem métodos especificamente padronizados para recuperação de (oo)cistos de protozoários no lodo de esgoto.

Antes da realização destes testes, as amostras utilizadas foram enriquecidas com um *pool* de (oo)cistos de protozoários (item 4.1). Inicialmente foi feita uma contagem, para poder estimar o número de (oo)cistos/ml presente no *pool*, antes deste ser adicionado na amostra de lodo.

O número médio obtido foi 1600 (oo)cistos/ml. Este *pool* foi adicionado ao lodo e os 4 métodos foram testados, sendo que para cada método foram feitas 3 repetições. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.1.

TABELA 5.1 - Recuperação dos (oo)cistos de protozoários em diferentes métodos

<b>METODOLOGIA</b>	<b>Nº MÉDIO (OO)CISTOS RECUPERADOS/ML</b>	<b>% DE RECUPERAÇÃO</b>
Hoffman (decantação)	283	18
Sulfato de zinco 33%	368	23
Sacarose 1M	118	13
Formol/éter	281	16

**Nº médio de (oo)cistos de protozoários/ml inicial - 1600**

A Figura 5.1 apresenta uma comparação dos resultados obtidos nas diferentes metodologias para a recuperação dos (oo)cistos de protozoários.

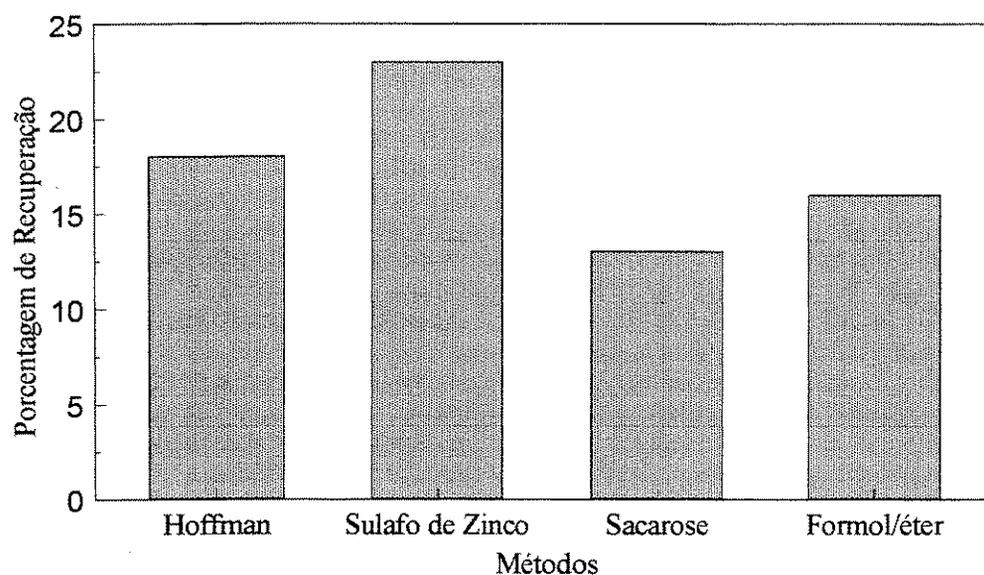


FIGURA 5.1 - Porcentagem de recuperação dos (oo)cistos de protozoários em diferentes metodologias

Da mesma forma, a amostra foi previamente contaminada com um *pool* de ovos de helmintos, para que os métodos pudessem ser testados. A concentração média presente era de 1813 ovos/ml. Os resultados para os 4 métodos testados estão apresentados no ANEXO.

O método que apresentou melhor resultado para recuperação dos (oo)cistos de protozoários foi o que utilizou solução sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ )- 33%, cujo índice de recuperação ficou em 23%. Além de maior recuperação, este método facilita a identificação dos (oo)cistos, pois como estes ficam suspenso, não há acúmulo de material particulado proveniente do lodo para dificultar sua identificação.

O método de Hoffman (decantação) apresentou recuperação de 18% para os (oo)cistos de protozoários. A dificuldade em usar este método é a grande quantidade de sedimento, que dificulta a visualização dos (oo)cistos e ovos de helmintos.

Embora a sacarose possa ser usada para promover a suspensão dos (oo)cistos e ovos de

helminhos em resíduos com grande quantidade de matéria particulada (SYKORA et al., 1991), não obteve bons índices de recuperação nos testes realizados. O formol/éter também não teve índice de recuperação satisfatório para os patógenos.

Estes testes foram realizados para que a metodologia que tivesse melhor recuperação fosse definida. No caso de análise de patógenos, é fundamental procurar o melhor índice de recuperação possível, para garantir maior confiabilidade nas análises e evitar subestimar a quantidade de patógenos, que pode estar presente no lodo de esgoto, principalmente o doméstico. Como já foi discutido na Revisão Bibliográfica, o maior problema de todos os métodos é a baixa recuperação apresentada, e a dificuldade de estabelecer um método que melhores estes índices.

Segundo vários autores esta baixa recuperação pode acontecer por causa das dificuldades durante o procedimento da análise. Sempre ocorrem perdas durante as análises e estas podem acontecer durante a filtração ou centrifugação. Alguns (oo)cistos podem ficar retidos na filtração e durante a centrifugação os (oo)cistos podem ter sua parede arrebatada, devido a sua fragilidade. Se a parede arrebentar, haverá dificuldade na hora de identificação. No caso dos helmintos, existe uma cutícula que reveste o ovo preservando-o e facilitando sua identificação.

Além destas perdas, existe uma outra questão, que é a viabilidade dos (oo)cistos. Não há uma maneira de verificar se estão ou não viáveis. Neste trabalho os (oo)cistos não estavam mais viáveis, pois haviam sido fixados. Como o principal objetivo foi seleção de metodologia, o fato dos (oo)cistos estarem fixados não tinha importância, pois estávamos verificando índice de recuperação e não viabilidade. Quando se trabalha com viabilidade, segundo HU et al. (1996), todo (oo)cisto que for encontrado deve ser considerado viável, como fator de segurança.

Um dos objetivos deste trabalho foi selecionar um método que pudesse ser eficiente para os protozoários e helmintos, e que ao mesmo tempo fosse fácil de ser feito, sem a necessidade de equipamentos sofisticados. Procurou-se fazer a recuperação da forma mais simples possível utilizando apenas a microscopia óptica.

Em muitas pesquisas são usados Kits de imunofluorescência para marcar e identificar os protozoários. Este método, além de ser mais caro, o que dificulta sua utilização em muitos casos, necessita de um microscópio de imunofluorescência, que nem todos os laboratórios possuem. Portanto foi decisivo o fato de procurar simplificar ao máximo estas análises, para que qualquer laboratório, com um microscópio óptico comum fosse capaz de fazê-las.

Apesar da recuperação, no caso de (oo)cistos de protozoários ter sido baixa, o método que foi escolhido para realizar as análises do lodo de esgoto e da mistura solo/lodo foi o dos sulfato de zinco 33%, que foi o que apresentou melhor índice de recuperação.

## **5.2 - Resultado das aplicações do lodo de esgoto nos reatores**

---

O lodo de esgoto era analisado ao chegar da ETE, antes da sua aplicação no solo. Para estas análises, o procedimento usado está descrito no item 4.2. Eram retiradas amostra do lodo, que era então analisado antes de sua aplicação no solo. Amostras do solo dos reatores também eram retiradas e analisadas. Neste caso a coleta era feita de diferentes regiões dos reatores, feito o quarteamento, e a amostra era analisada.

Também era coletado o solo dos reatores (bombonas) antes da aplicação do lodo, para que se pudesse ter certeza que o solo não estaria contaminado, e que se as análises fossem positivas, era realmente o lodo que estaria contaminado. Foram feitas análises na água percolada dos reatores, e que era coletada em um recipiente de vidro.

Apesar dos resultados negativos para (oo)cistos de protozoários patogênicos, sempre que o lodo foi aplicado nos reatores, era feita análise do solo e da água percolada. As análises eram feitas como medida de garantia, para que pudesse ter certeza de que não havia a presença destes microrganismos. Como o resultado foi negativo, não havia mais sentido realizar o acompanhamento no laboratório, que seria realizado nas garrafas.

Algumas considerações devem ser feitas frente a estes resultados obtidos, porém deve-se lembrar que neste trabalho estão sendo considerados apenas os (oo)cistos de protozoários, o que não significa que não pudesse haver outro tipo de patógeno presente no lodo de esgoto. É preciso considerar que o lodo de esgoto doméstico da ETE Riacho Grande não apresentou (oo)cistos de protozoários patogênicos no período de estudo, o que não quer dizer que nenhum outro período de estudo, este lodo não possa estar contaminado, já que a variação das parasitoses é sazonal.

Uma justificativa para esse resultado negativo pode ser a baixa taxa de infecção existente no esgoto tratado pela ETE. Além disto, o número de (oo)cistos liberados por uma pessoa infectada é baixo, e estes, quando liberados, acabam ficando dispersos em um grande volume de esgoto, o que dificulta sua recuperação. Há ainda a questão que o (oo)cisto, ao ser eliminado junto com as fezes do portador, encontra um ambiente hostil que pode favorecer sua destruição.

Aliado a isto, existe a baixa recuperação que a técnica oferece, além das perdas de material que podem ocorrer durante os passos do procedimento de análise, como por exemplo durante a centrifugação. Os (oo)cistos podem arrebentar devido a sua estrutura membranosa delicada, e isto dificulta a identificação. Para que os (oo)cistos possam ser identificados corretamente, é preciso que conservem sua estrutura morfológica intacta.

Uma outra questão que deve ser levantada é a idade do lodo. Se o lodo ficar armazenado durante alguns dias antes da análise, os (oo)cistos não resistem e acabam sendo destruídos, pois estão fora de seu ambiente natural.

Deve-se entender que para que esta utilização do lodo de esgoto seja feita sem riscos para a saúde, no que diz respeito aos (oo)cistos de protozoários patogênicos, é preciso realizar um monitoramento constante deste lodo juntamente com outros parâmetros, como coliformes fecais e ovos de helmintos. Além disto seria necessário um monitoramento do esgoto que está entrando na ETE para ser tratado, e desta forma verificar se há ou não a entrada dos patógenos.

Como não foram encontrados no lodo de esgoto os (oo)cistos não era necessário realizar este acompanhamento. A viabilidade dos (oo)cistos, que também seria monitorada, não pode ser feita, pois quando os (oo)cistos foram inoculados nas amostras de lodo, estes já estavam fixados, ou seja, estavam mortos e não fazia sentido analisar sua viabilidade, ou taxa de decaimento. Para que isto pudesse ser feito seria necessário utilizar microrganismos vivos. Desta forma, o principal objetivo foi fazer mudanças na metodologia, com o objetivo de procurar aumentar a taxa de recuperação dos protozoários.

### **5.3 - Modificações na Metodologia do Sulfato de zinco**

A metodologia definida para o trabalho foi a do sulfato de zinco, que apresentou melhor resultado para recuperação dos (oo)cistos de protozoários. Com o objetivo de aumentar este índice de recuperação, foram feitas algumas modificações no método, que estão descritas a seguir:

- utilização de solução sulfato de zinco nas concentrações 33%, 50% e 75%; e,
- tempo de repouso da amostra antes da análise de 2 e 24 horas.

O procedimento inicial foi o mesmo realizado para testar metodologia: foram feitas contagens deste pool para determinar qual o número de (oo)cisto/ml a amostra apresentava. O número de (oo)cistos/ml encontrado foi 286 (oo)cistos/ml.

Os resultado obtidos estão apresentados em forma de tabelas e gráficos, primeiramente para a solução sulfato de zinco 33%, depois para a mesma solução na concentração 50% e 75%. Também foram feitas comparações entre as diferentes concentrações da solução para verificar os índices de recuperação.

Solução- Sulfato de Zinco 33%

Inicialmente a suspensão contendo o lodo de esgoto e água destilada foi deixada em repouso por 2 horas, antes de começar a análise. Os resultados estão expressos na Tabela 5.2.

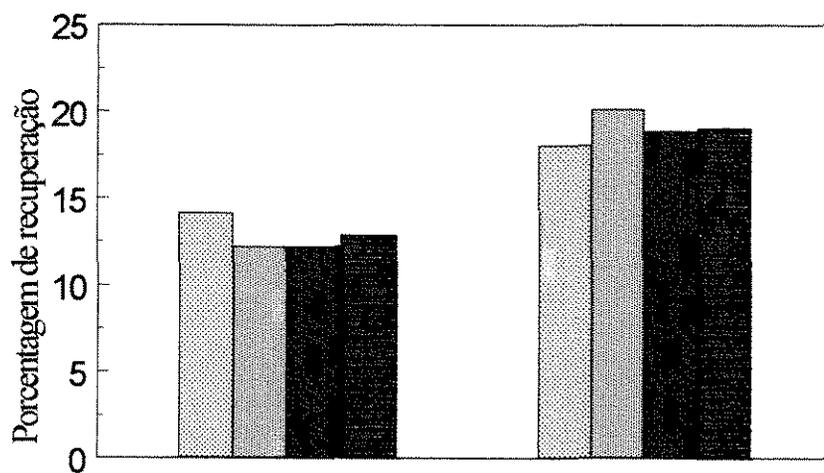
TABELA 5.2 - Taxa de recuperação para o método de sulfato de zinco 33% com tempo de repouso de 2 horas.

Amostra	Nº Médio de (oo)cistos/ml Inicial	Nº Médio De (oo)cistos/ml Recuperados	Porcentagem de Recuperação
01	286	40	14,10
02		35	12,17
03		35	12,17
	<b>MÉDIA</b>	<b>36,67</b>	<b>12,81</b>
	<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>2,36</b>	<b>0,91</b>

Para as análises que foram feitas após 24 horas de repouso, os valores de recuperação encontrados, também utilizando solução sulfato de zinco na concentração 33%, estão apresentados na Tabela 5.3:

TABELA 5.3 - Taxa de recuperação para o método de sulfato de zinco 33% com tempo de repouso de 24 horas.

Amostra	Nº Médio de (oo)cistos/ml Inicial	Nº Médio De (oo)cistos/ml Recuperados	Porcentagem de Recuperação
01	286	52	18,04
02		57	20,12
03		54	18,88
	<b>MÉDIA</b>	<b>54,33</b>	<b>19,01</b>
	<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>2,05</b>	<b>0,85</b>



Sulfato de zinco 33%	repouso 2 horas	repouso 24 horas
amostra 1	14,10	18,04
amostra 2	12,17	20,12
amostra 3	12,17	18,88
média	12,81	19,01

FIGURA 5.2 - Comparação da porcentagem média de recuperação dos (oo)cistos de protozoários com sulfato de zinco 33% em diferentes tempos de repouso nas três amostras

Solução- Sulfato de zinco 50%

Para esta concentração também foram testados dois tempos diferentes de repouso da amostra antes da análise. Os resultados obtido para tempo de repouso de 2 horas estão apresentados na Tabela 5.4, e para o tempo de repouso de 24 horas na Tabela 5.5.

TABELA 5.4 - Taxa de recuperação para o método de sulfato de zinco 50% com tempo de repouso de 2 horas.

Amostra	Nº Médio de (oo)cistos/ml Inicial	Nº Médio De (oo)cistos/ml Recuperados	Porcentagem de Recuperação
01	286	66	23,08
02		65	22,66
03		70	24,34
	<b>MÉDIA</b>	<b>67</b>	<b>23,36</b>
	<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>2,16</b>	<b>0,71</b>

TABELA 5.5 - Taxa de recuperação para o método de sulfato de zinco 50% com tempo de repouso de 24 horas.

Amostra	Nº Médio de (oo)cistos/ml Inicial	Nº Médio De (oo)cistos/ml Recuperados	Porcentagem de Recuperação
01	286	100	34,96
02		99	34,61
03		104	36,36
	<b>MÉDIA</b>	<b>101</b>	<b>35,31</b>
	<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>2,16</b>	<b>0,76</b>

Estes resultados estão apresentados na Figura 5.3.

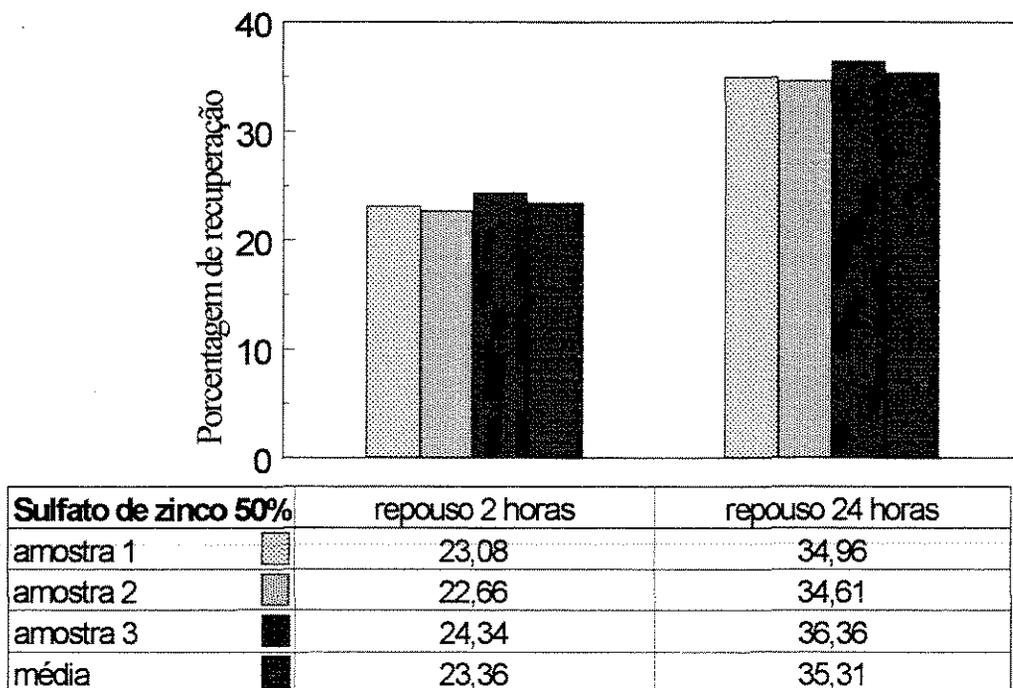


FIGURA 5.3 - Comparação da porcentagem média de recuperação dos (oo)cistos de protozoários com sulfato de zinco 50% em diferentes tempos de repouso

#### Solução- Sulfato de zinco 75%

Para esta concentração foi feito apenas teste para tempo de repouso da amostra de 24 horas. Como a solução de sulfato de zinco na concentração 50% já havia aumentado o índice de recuperação, esta concentração foi testada apenas para verificar se este índice poderia ser aumentado em consequência deste aumento da concentração da solução. Inicialmente foi testado o tempo de repouso de 24 horas, e como houve uma queda da taxa de recuperação, não foram feitos os testes para tempo de repouso de 2 horas.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.6.

TABELA 5.6 - Taxa de recuperação para o método de sulfato de zinco 75% com tempo de repouso de 24 horas.

Amostra	Nº Médio de (oo)cistos/ml Inicial	Nº Médio De (oo)cistos/ml Recuperados	Porcentagem de Recuperação
01	286	55	19,23
02		48	16,78
03		53	18,53
<b>MÉDIA</b>		<b>52</b>	<b>18,18</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>		<b>2,94</b>	<b>1,03</b>

A Figura 5.4 apresenta estes resultados plotados em gráfico.

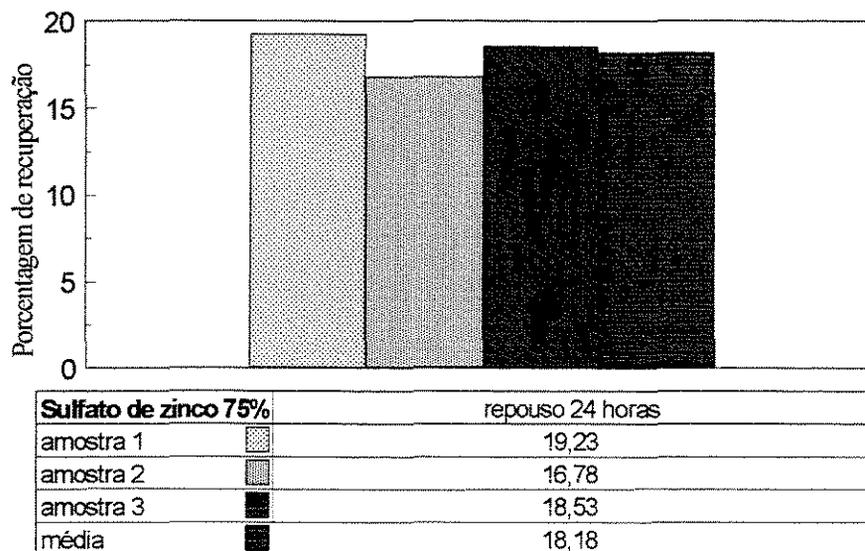


FIGURA 5.4 - Comparação da porcentagem média de recuperação dos (oo)cistos de protozoários com sulfato de zinco 75% em tempo de repouso de 24 horas

Como pode ser observado, a utilização da solução de sulfato de zinco na concentração de 50% aumentou a recuperação dos (oo)cistos de protozoários que estavam presentes no lodo. O índice de recuperação passou de 19,01% para 35,31%, ou seja, praticamente dobrando a taxa de recuperação dos (oo)cistos.

Com o aumento da concentração da solução de sulfato de zinco para 75% houve uma queda no índice de recuperação, o que significa que nem sempre um aumento da concentração significa aumento de recuperação. Na Tabela 5.7 e Figura 5.5 pode ser observada a comparação dos índices de recuperação para as três concentrações de solução de sulfato de zinco no tempo de repouso de 24 horas.

Tabela 5.7 - Comparação das porcentagens de recuperação dos (oo)cistos de protozoários para as 3 concentrações de sulfato de zinco com tempo de repouso de 24 horas

<b>CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO <math>ZnSO_4</math></b>	<b>MÉDIA</b>	<b>DESVIO PADRÃO</b>
33%	19,01	0,85
50%	35,31	0,76
75%	18,18	1,03

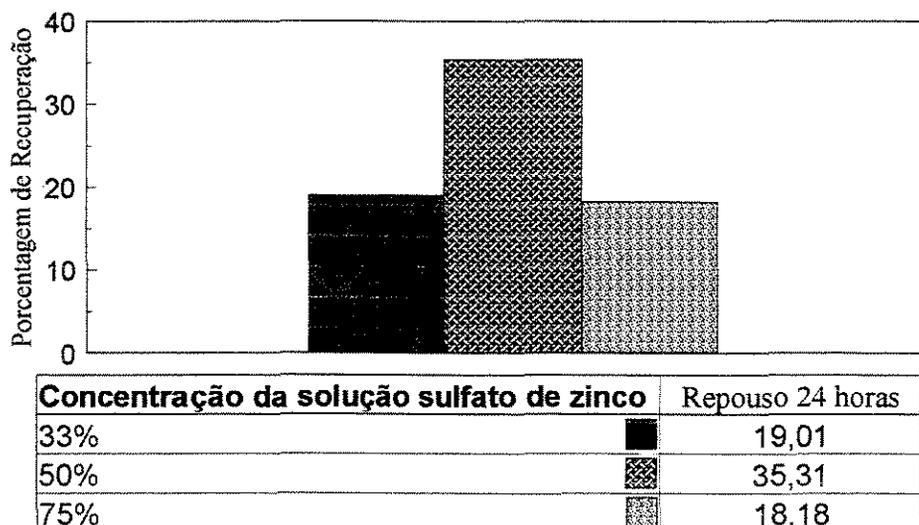


Figura 5.5 - Comparação da porcentagem de recuperação dos (oo)cistos nas 3 concentrações no tempo de repouso de 24 horas

Pode-se observar que a melhor recuperação foi com o sulfato na concentração 50% e tempo de repouso da amostra 24 horas. Esta necessidade de um tempo de repouso maior da amostra de lodo em suspensão com a água destilada é porque os (oo)cistos acabam ficando concentrados no lodo, e quando o lodo é deixado em contato por um tempo maior com a água há uma liberação destes, ocorrendo um aumento do índice de recuperação.

Além da análise do lodo, foram feitas análises do solo das garrafas, onde o lodo foi aplicado. Para estas análises, foram retiradas várias camadas do solo (diferentes profundidades) e foram feitas análises com a solução de sulfato de zinco 33% e 50% nos dois tempos de repouso (2 e 24 horas). Estas análises foram negativas para os (oo)cistos dos protozoários.

Com estes resultados pode-se concluir, que neste tipo de solo os protozoários ficaram retidos na camada de lodo. Uma justificativa para este resultado, além do tipo de solo, é o baixo número de (oo)cistos que a *pool* adicionado continha.

Os (oo)cistos que foram usados no trabalho estavam fixados, pois se não estivessem seria impossível a realização do trabalho, porque quando os (oo)cistos não estão fixados seu tempo de sobrevivência é de 1 dia. Por este motivo, mesmo que as análises tenham realizadas alguns dias depois do lodo aplicado nas garrafas, não poderia haver diminuição da taxa de recuperação, usando mesma concentração da solução de sulfato de zinco e mesmo tempo de repouso da amostra.

Como pode-se verificar, pelos resultados apresentados, há um limite no aumento da concentração de sulfato de zinco que proporciona aumento da recuperação dos (oo)cistos. Os melhores resultados foram conseguidos com a solução na concentração de 50% e tempo de repouso, que permitia os (oo)cistos se desprenderem do lodo, de 24 horas.

O aumento na recuperação significa uma melhoria nas análises dos patógenos no lodo de esgoto. A preocupação com a detecção e recuperação dos protozoários patogênicos está aumentando nos últimos tempo, principalmente pela sua alta incidência. A padronização de uma metodologia com bons índices de recuperação podem ajudar a detecção dos patógenos e garantir uma utilização do lodo de esgoto sem colocar em risco a saúde do homem e ambiente.

## 6 - CONCLUSÕES

Neste capítulo serão apresentadas as conclusões obtidas no trabalho. O principal objetivo foi a seleção de metodologia de recuperação de (oo)cistos de protozoários patogênicos e as conclusões dizem respeito a estes métodos.

1. O método que apresenta melhor índice de recuperação para os (oo)cistos de protozoários patogênicos é o que utiliza solução de sulfato de zinco para promover a suspensão. Além disto, é o método que permite maior clareza na hora da identificação destes (oo)cistos, pois não há acúmulo de material particulado, o que é comum no lodo de esgoto, que possam encobrir os (oo)cistos;
2. estes testes de metodologia também foram feitos para os ovos de helmintos e embora o método de Hoffman tenha apresentado melhor recuperação (72%), o método que utiliza sulfato de zinco também teve recuperação os (63%). Por este motivo ficou estabelecido que para a recuperação dos patógenos, seria melhor usar o sulfato de zinco, principalmente porque desta forma, as análises para os dois grupos de patógenos pode ser feita ao mesmo tempo, facilitando o trabalho;
3. se a concentração da solução sulfato de zinco for aumentada para 50%, o índice de recuperação dos (oo)cistos fica em 19,01% para um tempo de repouso da amostra antes da análise de 2 horas;
4. quando, além do aumento da concentração da solução de sulfato de zinco de 33 para 50%, o tempo de repouso da amostra antes da análise é aumentado para 24 horas, o índice de recuperação passa para 35,31%, isto é, o índice praticamente dobra com o aumento da

- concentração da solução e o aumento do tempo de repouso da amostra antes da análise;
5. se aumentarmos ainda mais a concentração da solução de sulfato de zinco, no caso para 75%, com tempo de repouso de 24 horas, não há um aumento da recuperação, pelo contrário esta fica em torno de 18%. A viscosidade da solução pode ser responsável pela dificuldade de suspensão dos (oo)cistos;
  6. o tempo de repouso da amostra antes de sua análise é importante para que os (oo)cistos, que ficam aderidos as partículas do lodo de esgoto possam ser liberados e deste modo são recuperados. No tempo de 2 horas fica mais difícil dos (oo)cistos serem liberados, principalmente se a amostra de lodo analisada estiver seca; e,
  7. é importante a combinação tempo de repouso da amostra antes da análise e concentração da solução para que sejam obtidos melhores resultados.
-

## 7 - SUGESTÕES

É importante a padronização de um método simples para a recuperação dos (oo)cistos, para que estas análises possam ser feitas como rotina em laboratórios, sem grande custo, como acontece no caso de análises com microscopia de imunofluorescência. Além de um método de recuperação é importante determinar a viabilidade dos (oo)cistos, para que o reuso do lodo de esgoto seja feito com maior segurança.

Além da padronização de método de concentração dos (oo)cistos, é preciso definir se realmente existe uma correlação entre os organismos indicadores (coliformes) e os (oo)cistos de protozoários. É preciso correlacionar os coliformes, streptococcus, protozoários e helmintos, para que seja estabelecido um indicador sanitário seguro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD,R.A., LEE,E., TAN,I.T.L., MOHAMAD-KAMEL,A.G. Occurrence of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in Raw Water and Treated Water from Two Water Treatment Plants in Selangor, Malaysia. **Water Research**, v. 31, n. 12, p. 3132-3136. 1997.

ANGLIAN WATER. **Manual of good practice for utilization of sewage sludge in agriculture**. 2.ed.rev. United Kingdom O. 1991,53p.

BERTOLUCCI,G.C., GILLI,G., CARRARO,E., GIACOSA,D., PUPPO,M. Influence of Raw Water Storage on *Giardia*, *Cryptosporidium* and Nematodes. **Water Science and Technology**, v.37, n.2, p.261-267. 1998.

BUKHARIZ., SMITH, H.V. Effect of Three Concentration Techniques on Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts Recovered from Bovine Feces. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.10, p.2592-2595. Oct. 1995.

BURGE,W.D., MARSH,P.B. Infectious Disease Hazards of Landspreading Sewage Wastes. **Journal of Environmental Quality**, v.7, n.1, p.1-9, 1978.

CASEMORE,D.P. The Epidemiology of Human Cryptosporidiosis and the Water Route of Infection. **Water Science and Technology**, v.24, n.2, p.157-164. 1991.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - **Microbiologia de Lodos Ativados**. Série Manuais. Agosto, 1989. 23p.

DAVIS,R.D. The Impact of EU and UK Environmental Pressures on the Future of Sludge Treatment and Disposal. **Water and Environmental Management**. v.10, Feb. p.65-69. 1996.

ELLIS,K.V., RODRIGUES,P.C.C., GOMEZ,C.L. Parasite Ova and Cysts in Waste Stabilization Ponds. **Water Research**, v.27, n.9, p.1455-1460. 1993.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY-USEPA- (1986) **Development of a Qualitative Pathogen Risk Assessment Methodology for Municipal Sludge Landfilling**. EPA/600/6-88/006. May 1986.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY-USEPA- (1992) **Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge**. Environmental Regulations and Technology- EPA/625/R-92/013. Dec. 1992.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY-USEPA- (1993) **Preliminary Risk Assessment for Pathogens in Landfilled Municipal Sewage Sludge**. EPA/600/R-94/110. Sep. 1993.

FALK,C.C., KARANIS,P., SCHOENEN,D., SEITZ,H.M.. Bench Scale Experiments for the Evaluation of a Membrane Method for the Recovery Efficiency of *Giardia* and *Cryptosporidium* from Water. **Water Research**,v.32, n.3, p.565-568. 1998.

FEACHEM,R.G., BRADLEY,D.H., GARELICK,H., MARA,D.D. **Sanitation and Disease Health Aspects of Excreta and Wastewater Management**. 1<sup>a</sup> ed.. New York: John Wiley and Sons, 1983. 501p.

FOESS,G.W., SIEGER,R.B. Pathogen/Vector Attraction Reduction Requeriments of the Sludge Rules. **Water Engineering& Management**, p.25-26, June. 1993.

GASSMANN,L., SCHWARTZBROD,J. Wastewater and *Giardia* Cysts. **Water Science and Technology**, v.24, n.24,p.183-186. 1991.

GAVAGNHAN,P.D., SYKORA,J.L., JAKUBOWSKI,W., SORBER,C.A., SNINSKY,A.M., LICHTER,M.D., KELETI,G. Inactivation of *Giardia* by Anaerobic Digestion of Sludge. **Water Science and Technology**, v.27, n.3-4, p.111-114. 1993

GIBBS,R.A., HU,C.J., HO,G.E., PHILLIPS,P.A., UNKOVICH,I. Pathogen Die-Off in Stored Wastewater Sludge. **Water Science and Technology**, v.31, n.5-6, p.91-95. 1995.

GILMOUR,R.A., SMITH,H.V., SMITH,P.G., MORRIS, G.P., GIRDWOOD,W.A. The Occurrence and Viability of *Giardia* spp Cysts in UK Waters. **Water Science and Technology**, v.24, n.2, p.179-182. 1991

GRIMASON,A.M.,SMITH,H.V.,THITAL,W.N.,SMITH,G.P.,JACKSON,M.H., GIRDWOD,R.W.A. Occurence and Removal of *Cryptosporidium* spp. Cysts in Kenian Waste Stabilization Ponds. **Water Science and Technology**, v.27, n.3-4, p.97-104. 1993.

HAYS,B.D. Potential for Parasitic Disease Transmission with Land Application of Sewage Plant Effluents and Sludge. **Water Research**, v.11, p.583-595. 1977.

HELMER,R., HESPANHOL,I., SALIBA,L.J. Public Health Criteria for the Aquatic Envirmment: Recent WHO Guidelines and Their Application. **Water Science and Technology**, v.24, n.2, p.35-42. 1991.

- HEMPPHIL,B. Rules and Options for Sludge Disposal. **Water. Engineering & Managment.**, Feb. p.24-26. 1992.
- HO,B.S.W., TAM,T.Y., PRIMROSE,H, YAM,W.C. Detection and Enumeration of *Giardia* Cysts in River Waters of Hong Kong by Flocculation-Percoll/Sucrose Gradient Immunofluorescence Method. **Water Science and Technology**, v.31, n.5-6, p.431-434. 1995.
- HOLMAN,B., FROST,F., PLAN,B., FUKUTAKI,K., JAKUBOWSKI,W. Recovery of *Giardia* Cysts from Water- Centrifugation vs Filtration. **Water Research**,v.17, n.11, p.1705-1707. 1983.
- HU,C.J, GIBBS,R.A., MORT,N.R., HOFSTEDE,H.T., HO,G.E., UNKOVICH,I. *Giardia* and its Implications for Sludge Disposal. **Water Science and Technology**, v.34, n.7-8, p.179-186. 1996.
- JAKUBOWSKI,W., SYKORA,J.L., SORBER,C.A., CASSON,L.W., GAVAGHAN,P.D. Determining Giardiasis Prevalence by Examination of Sewage. **Water Science and Technology**, v.1.24, n.2, p.173-178. 1991.
- JAKUBOWSKI,W., BOUTROS,S., FABER,W., FAYER,R., GHIORSE,W., LeCHEVALLIER,M., ROSE,J., SCHAUB,S., AJAIB,S., STEWART,M. Environmental Methods for *Cryptosporidium*. **Journal of American Water Works Association**, v, p.107-121. 1996.
- KARANIS,P., SCHOENEN,D., SEITZ,H.M.. Distribution and Removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Water Supplies in Germany. **Water Science and Technology**,v.37, n.2, p.9-18. 1998.

KATZ,M., DESPOMMIE,D.D.. **Parasitic Diseases**. 2<sup>a</sup> ed.. New York- Springer. 1989.  
301p.

KFIR,R.,HILNER,C., du PREEZ,M., BATEMAN,B. Studies Evaluating the Applicability of Utilising the Same Concentration Techniques for the Detection of Protozoan Parasites and Viruses in Water. **Water Science Technology**, v.31, n.5-6, p.417-423. 1995.

KOTT,H., KOTT,Y. Detection and Viability of *Entamoeba histolytica* cysts in Sewage Effluents. **Water & Sewage Works**, May, p.177-180. 1967.

LIU,D. The Effect of Sewage Land Disposal on the Microbiological Quality of Groundwater. **Water Research**, v.16, p.957-961. 1982.

MADORE,M.S., ROSE,J.B., GERBA,C.P., ARROWOOD,M.J., STERLING,C.R. Occurrence of *Cryptosporidium* Oocysts in Sewage effluents and Selected Surface waters. **Journal of Parasitology**, v.73, n.4, p.702-705. 1987.

McHARRY,M.J. Detection of *Giardia* in Sewage Effluent. **Journal of Protozoology**, v.31, n.2, p.362-364. 1984.

MARZOCHI,M.C.A. Estudo dos Fatores Envolvidos na Disseminação dos Enteroparasitas II- Estudo da Contaminação de Verduras e Solo de Hortas na Cidade de Ribeirão Preto. **Revista do Instituto de Medicina Tropical- S.P.**, v.19, n.3, p.148-155. 1977.

MATTHEWS,P.J. Sewage Sludge Disposal in the UK: A New Challenge for the Next Twenty Years. **Water and Environmental Management**, v.6 October, p.551-559. 1992

- MOITINHO, M.L.R., FERREIRA, C.L. Avaliação das Massas Específicas de Cistos de *Giardia duodenalis* e *Entamoeba coli*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical-S.P.**, v.34, n.5, p.395-397. 1992.
- NUVOLARI, A., **Aplicação de Lodo de Esgotos Municipais no Solo: ensaios de respirometria para avaliar a estabilidade do lodo.** Campinas: Faculdade de Engenharia Civil da UNICAMP, 1996. (Dissertação)
- PESSÔA, S.B., MARTINS, A.V. **Parasitologia Médica.** 11. ed.. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1982. Cap5: Noções sobre as principais técnicas usadas em parasitologia, p.814-850.
- PILLAI, S.D., WIDMER, K.W., DOWD, S.E., RICKE, S.C. Occurrence of Airborne Bacteria and Pathogen Indicators during Land Application of Sewage Sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.1, p.196-299. Jan. 1996.
- SANIN, F.D., VESIIND, P.A., MARTEL, C.J. Pathogen Reduction Capabilities of Freeze/Thaw sludge Conditioning. **Water Research**, v.28, n.11, p.2393-2398. 1994.
- SHEPHERD, K.M., WYN-JONES, A.P. Evaluation of Different Filtration Techniques for the Concentration of *Cryptosporidium* Oocysts from water. **Water Science Technology**, v.31, n.5-6, p.425-429. 1995.
- SMITH, H.V., McDIARMID, A., SMITH, A.L., HINSON, A.R., GILMOUR, R.A., An Analysis of Staining Methods for the Detection of *Cryptosporidium* spp in Water-related samples. **Parasitology**, 99, p.323-327. 1989.
- STOLL, U., PARAMESWARAN, K. Treatment and Disposal of Domestic Sewage Sludge and Nightsoil Sludge for Bangkok. **Water Science and Technology**, v.34, n.11, p.209-217. 1996.

SYKORA,J.L., SORBER,C.A., JAKUBOWSKI,W., CASSON,L.W., GAVAGHAN,P.D., SHAPIRO,M.A., SCHOTT,M.J. Distribution of *Giardia* Cysts in wastewater. **Water Science Techonology**, v.24, n.2, p.178-182. 1991.

TEUNIS,P.F.M., MEDEMA,G.J., KRUIDENIER,L., HAVELAARA.H. Assessment of the Risk of Infection by *Cryptosporidium* or *Giardia* in Drinking Water from a Surface Water Source. **Water Reserch**,v.31, n..6, p.1333-1346. 1997.

THIRIAT,L., BIGOT,V., SCHWARTZBROD,J. Evaluation of Procedure for Detection of Viable *Giardia* Cysts in Wastewater Sludge. **Water Science Technology**, v.35, n.11-12, p.377-380. 1997.

VESEY,G., SLADE,J.S., BYRNE,M., SHEPHERD,K., FRICKER,C.R. A New Method for the Concentration of *Cryptosporidium* Oocysts from Water. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.82-86. 1993.

WÜRZER,M., WIEDENMAMM,A., BOTZENHART,K. Microbiological Quality of Residues from Drinking Water Preparation. **Water Science and Technology**, v.31, n.5-6, p.75-79. 1995.

## **ANEXO**

---

Neste Anexo são apresentados os resultados obtidos para ovos de helmintos, testando as 4 metodologias estudadas. O lodo de esgoto foi previamente contaminado com um pool de ovos de helmintos obtidos junto ao Hospital de Clínicas da UNICAMP. Os resultados estão expressos em tabela e gráfico.

TABELA 1 - Recuperação de ovos de helmintos em diferentes metodologias

<b>METODOLOGIA</b>	<b>Nº MÉDIO OVOS RECUPERADOS/ML</b>	<b>% DE RECUPERAÇÃO</b>
Hoffman (decantação)	1306	72
Sulfato de zinco 33%	1138	63
Sacarose 1M	424	23
Formol/éter	623	34

**Nº médio de ovos de helmintos/ml inicial - 1813**

Para melhor visualização destes resultados, pode-se observar a Figura 1.

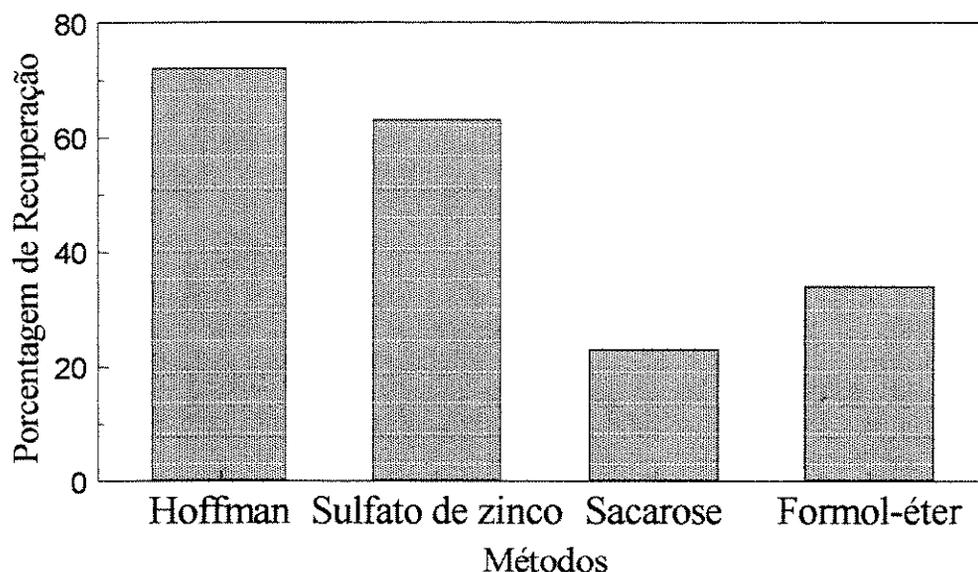


FIGURA 1 - Comparação entre os diferentes métodos analisados para recuperação de ovos de helmintos.