

C2



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Taís Rondello Bonatti

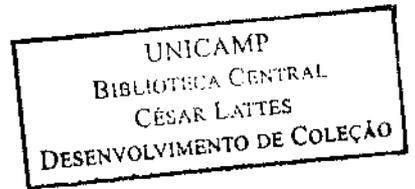
Ocorrência de cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Cryptosporidium* spp. e ovos da família Ascarididae em amostras de lodo de esgoto.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) TAÍS RONDELLO BONATTI
R. Maura B. Franco
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do Título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco.

CAMPINAS, 2007.



| | |
|--|-----------|
| UNIDADE | BC |
| Nº CHAMADA: | T/UNICAMP |
| | B64o |
| V. _____ Ed. _____ | |
| TOMBO BCI | 92120 |
| PROC. | 16.14507 |
| C <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/> | |
| PREÇO | 11,00 |
| DATA | 25/04/07 |
| BIB-ID | 403663 |

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

B64o Bonatti, Taís Rondello
Ocorrência de cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Cryptosporidium* spp. e ovos da família Ascarididae em amostras de lodo de esgoto / Taís Rondello Bonatti. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadora: Regina Maura Bueno Franco.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Giardia*. 2. *Cryptosporidium*. 3. *Ascaris*. 4. Lodo de esgoto. I. Franco, Regina Maura Bueno. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Occurrence of *Giardia* spp. cysts, *Cryptosporidium* spp. oocysts and Ascarididae family eggs in sewage sludge samples.

Palavras-chave em inglês: *Giardia*; *Cryptosporidium*; *Ascaris*; Sewage sudge; Biosolid.

Titulação: Mestre em Parasitologia.

Banca examinadora: Regina Maura Bueno Franco, Wagner Bettiol, Marlene Tiduko Ueta.

Data da defesa: 31/01/2007.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

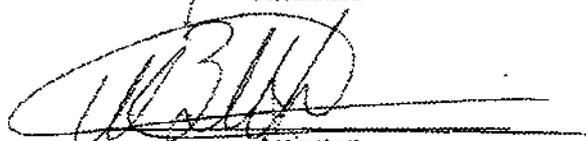
Campinas, 31 de janeiro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

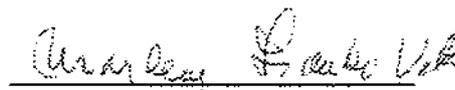
Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Wagner Bettiol


Assinatura

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta


Assinatura

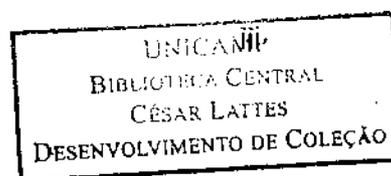
Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

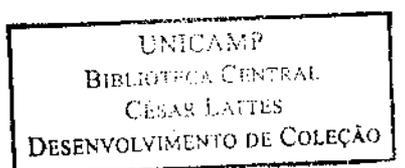
Assinatura

257816007



Dedico esta obra aos meus pais,
Ismenia e Waldir, e à minha irmã Débora.

iv



AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Biologia da UNICAMP.

À subcomissão do Curso de Pós – Graduação em Parasitologia.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Parasitologia.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de mestrado no ano de 2005.

À Deus pela minha vida e por ter permitido a realização e conclusão desse trabalho.

À minha mãe que passou junto comigo todas as alegrias e tristezas durante esse processo, das coletas à redação da tese, pela paciência infinitamente divina nos meus piores e melhores momentos. Ao meu pai que providenciou o transporte, companhia e “colo” em todas as coletas na Companhia de Saneamento de Jundiaí (CSJ). Sem ele, boa parte desse trabalho não seria possível. À minha irmã querida que cedeu gentilmente o espaço no seu quarto e tantas vezes teve paciência com a minha bagunça para escrever a tese.

À Profa. Dra. Regina Maura que enfrentou o desafio de me orientar no mestrado, pelas inúmeras horas de conversa e apoio.

v



Ao Sr. José Luis Llanos Carrito, pelo auxílio no delineamento experimental das coletas e experimentos controle.

À SANASA, por ter permitido a coleta do lodo de esgoto, especialmente aos funcionários da Estação de Tratamento de Esgoto Samambaia.

Ao Dr. Fernando Carvalho Oliveira da Companhia de Saneamento de Jundiaí (CSJ), pela disposição em me auxiliar nas coletas desde antes do início da tese e no decorrer dela, providenciando a separação do lodo da ETE Samambaia. Aos funcionários da CSJ que forneceram material para o inquérito parasitológico fecal.

Aos amigos do Laboratório de Protozoologia, pelo apoio e auxílio à realização desse trabalho: Nilson Branco, Luciana Urbano dos Santos, Mirna Pereira, Rita França, Diego Leal e Romeu Cantusio Neto.

Ao Caio pela paciência, apoio e carinho em todos os momentos.

RESUMO

A presença dos protozoários patogênicos *Giardia* e *Cryptosporidium* tem sido comumente relatada em amostras de águas superficiais e esgoto que incluem os afluentes, efluentes e resíduos gerados do tratamento, como o lodo de esgoto. Tais parasitos são reconhecidos mundialmente como importantes agentes causadores de diarreia em humanos e animais e destacam-se pelo grande potencial de veiculação hídrica. *Ascaris lumbricoides* é um dos helmintos entéricos mais resistentes e geralmente usado como indicador parasitológico devido à sua grande capacidade de resistência ambiental. O lodo de esgoto (LE), resíduo originado do tratamento de esgoto pelo sistema de lodos ativados, tem gerado muitas discussões em relação à sua disposição final. No Brasil, atualmente, a quase totalidade do lodo produzido em estações de tratamento de esgoto (E.T.E.s) é destinada a aterros sanitários competindo por espaço com o lixo urbano. Outras alternativas são propostas, como o despejo em oceanos, rios e lagos e a incineração. A aplicação do LE em solos com a finalidade de fertilização representa a melhor alternativa de uso, pois tal resíduo apresenta elevado teor de matéria orgânica, vários nutrientes de interesse agrícola e age como corretivo da acidez do solo. O presente trabalho teve por objetivos: (1) verificar a ocorrência de cistos de *Giardia*, oocistos de *Cryptosporidium* e ovos de *Ascaris* sp. em amostras de LE, provenientes da E.T.E. Samambaia, (2) investigar a aplicabilidade de duas metodologias de concentração de cistos e oocistos a este tipo de amostra, (3) verificar os danos morfológicos de cistos mediante o emprego de microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.) e (4) efetuar a investigação da viabilidade dos ovos de *Ascaris* sp. eventualmente presentes nas amostras, mediante o uso do corante vital Azul Trypan. Cistos estiveram presentes em 50,0% das amostras e oocistos, em 8,3%, considerando-se os dois procedimentos empregados. A concentração de cistos variou de 0 a 4800 cistos/g e de oocistos, de 0 a 600 oocistos/g, o que representa risco potencial à contaminação do solo onde o LE será aplicado e, possivelmente, para lençóis freáticos ou outros corpos d'água. Para as amostras brutas, a melhor técnica para cistos foi a Homogeneização em

Solução de Eluição e para as amostras artificialmente contaminadas, Centrifugo-concentração seguida de clarificação em éter. Os resultados discrepantes mostram a dificuldade de trabalhar com esse tipo de amostra e a grande variabilidade de resultados. Fatores como temperatura, forças iônicas e, principalmente, o pH influenciaram na recuperação de cistos, oocistos e ovos. Foram verificadas alterações morfológicas mínimas nas paredes dos cistos mediante emprego da M.E.V. após 45 dias de exposição à luz solar. Em relação aos helmintos, foram encontrados ovos de *Toxocara* sp, *Ascaris* sp e similares a *Trichuris* sp mediante emprego da técnica padronizada pela Norma Oficial Mexicana. O lodo de esgoto pode, portanto, conter grande quantidade e variedade de patógenos, o que ressalta a importância de um tratamento adequado, assim como a necessidade do desenvolvimento de técnicas apropriadas para a pesquisa de *Giardia*, *Cryptosporidium* e *Ascaris* neste tipo de amostra e a revisão da legislação em vigência que não contempla os protozoários em questão.

Palavras-chave: *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Ascaris*, lodo de esgoto.

ABSTRACT

The presence of the pathogenic protozoan *Giardia* and *Cryptosporidium* has been commonly reported in superficial water and sewage samples, including affluent, effluent and residues generated from the treatment, as the sewage sludge. Such parasites are recognized worldwide as important agents of diarrhea in humans and animals and have great potential of water transmission. *Ascaris lumbricoides* is one of the most resistant enteric pathogens and generally is used as a parasitological indicator due to its great environmental resistance. The sewage sludge (SS), residue originated from the activated sludge treatment system, has generated many discussions regarding its final disposal. In Brazil, nowadays, almost the total amount of sewage sludge produced in sewage treatment plants (S.T.P.s) is destined to sanitary landfills competing for space with the urban trash. Other alternatives are proposed, as the oceanic disposal as in rivers or lakes and incineration. The SS application in soils with the purpose of fertilization presents the best alternative, therefore such residue contains elevated tenor of several organic matter nutrients of agricultural interest and acts like acidity corrective of the soil. The present work had for objectives: (1) verify the occurrence of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts and *Ascaris* sp. eggs in SS samples from Samambaia S.T.P., (2) investigate the applicability of two methodologies of cysts and oocysts concentration to this kind of sample, (3) verify the morphological injuries of cysts by means of the electronic scanning microcopy (ESM) and (4) verify the viability of the *Ascaris* sp. eggs occasionally present in samples by means of Trypan Blue vital dye. Cysts were detected in 50,0% of the samples and oocysts, in 8,3%, considering both the procedures employed. The cysts concentration varied from 0 to 4800 cysts/g and of oocysts, from 0 to 600 oocysts/g, what represent the potential risk of contamination of the soil where the CSS will be applied and, possibly, for subterranean water supplies or others water bodies. For the raw samples, the best method for cysts detection was Homogenization in Elution Solution and for the artificially contaminated samples, Centrifuge-concentration followed by ether clarification. The discrepant results show the difficulty to work with this kind of sample and the great variability of

results. Factors as temperature, ionic forces and, mainly, the pH, influenced on the cysts, oocysts and eggs recovery. Lower morphological alterations were verified on the cyst wall by means of ESM after 45 days of exposition to the solar light. Regarding the helminths, *Toxocara* sp, *Ascaris* sp and similar to *Trichuris* sp eggs were found by means of the technique standardized by the Mexican Official Norm. The sewage sludge contains a great amount and variability of pathogens, what stands out the importance of an adequate treatment, as well as the need of development of suitable methods for the research of *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Ascaris* in this kind of sample and the law revision that does not contemplates such protozoan.

Key – words: *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Ascaris*, sewage sludge.

| LISTA DE FIGURAS | PG |
|--|----|
| Figura 1. Leira no início da exposição ao sol..... | 54 |
| Figura 2. Leira ao final do período de 90 dias de exposição ao sol..... | 55 |
| Figura 3. Adaptação da Norma Oficial Mexicana (NOM-001-ECOL-1996) para a análise quantitativa de ovos de helmintos em lodo de esgoto..... | 66 |
| Figura 4. Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> presente na amostra artificialmente contaminada da leira 4 (t_{90}), mediante emprego do método CC/CE e visualização por RID (400X)..... | 72 |
| Figura 5. Cistos de <i>Giardia</i> presentes no inóculo purificado com o objetivo de contaminar artificialmente amostra de efluente hospitalar que serviu como controle para o procedimento de microscopia eletrônica de varredura. Visualização por RID (400X)..... | 73 |
| Figura 6. Cistos de <i>Giardia</i> visualizados com Microscopia Eletrônica de Varredura: a. amostra controle (efluente hospitalar contaminado artificialmente) (3000X). b. leira 4, amostra t_{45} com emprego do método CC/CE (3000X)..... | 74 |
| Figura 7. a. Ovos de <i>Ascaris</i> sp. viáveis encontrados na leira 4, amostra t_{90} (não incorporaram o corante vital Azul Trypan). b. Ovos de <i>Ascaris</i> sp. encontrados na leira 4, amostra t_{90} (incorporaram o corante vital Azul Trypan) (250X)..... | 75 |
| Figura 8. a e b: Ovos de <i>Toxocara</i> sp. não viáveis encontrados na leira 1, amostra t_{90} (incorporaram o corante vital Azul Trypan) (480 X)..... | 75 |
| Figura 9. Ovo similar à <i>Trichuris</i> sp. não viável encontrado na leira 4, amostra t_0 (não incorporou o corante vital Azul Trypan) (250X)..... | 76 |

LISTA DE TABELAS

PG

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Espécies de <i>Cryptosporidium</i> reconhecidas, tamanhos dos oocistos, principais hospedeiros, ocorrência em humanos e localização no hospedeiro..... | 12 |
| Tabela 2. Organograma das coletas de amostras de lodo de esgoto durante 90 dias e pareamento com as amostras artificialmente contaminadas..... | 56 |
| Tabela 3. Quantidade de (oo)cistos/grama de lodo de esgoto encontrada mediante os procedimentos de Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrifugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nas amostras brutas e eficiências de recuperação dos experimentos controle (%) para as amostras da Leira 1 | 78 |
| Tabela 4. Quantidade de (oo)cistos/grama de lodo de esgoto encontrada mediante os procedimentos de Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrifugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nas amostras brutas e eficiências de recuperação dos experimentos controle (%) para as amostras da Leira 2 | 79 |
| Tabela 5. Quantidade de (oo)cistos/grama de lodo de esgoto encontrada mediante os procedimentos de Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrifugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nas amostras brutas e eficiências de recuperação dos experimentos controle (%) para as amostras da Leira 3 | 80 |
| Tabela 6. Quantidade de (oo)cistos/grama de lodo de esgoto encontrada mediante os procedimentos de Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrifugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nas amostras brutas e eficiências de recuperação dos experimentos controle (%) para as amostras da Leira 4 | 81 |
| Tabela 7. Concentração de cistos de <i>Giardia</i> por grama de lodo de esgoto, média e desvio padrão (DP) para ambos os procedimentos utilizados para amostras brutas: Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrifugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nos diferentes tempos de coleta (t_0 , t_{45} e t_{90})..... | 82 |

| | |
|---|----|
| Tabela 8. Concentração de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> por grama de lodo de esgoto, média e desvio padrão (DP) para ambos os procedimentos utilizados para amostras brutas: Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrífugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nos diferentes tempos de coleta (t_0 , t_{45} e t_{90}). | 82 |
| Tabela 9. Eficiências de recuperação de cistos de <i>Giardia</i> , média e desvio padrão (DP) para ambos os procedimentos utilizados nas amostras artificialmente contaminadas: Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrífugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nos diferentes tempos de coleta (t_0 , t_{45} e t_{90})..... | 83 |
| Tabela 10. Eficiências de recuperação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> , média e desvio padrão (DP) para ambos os procedimentos utilizados nas amostras artificialmente contaminadas: Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrífugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nos diferentes tempos de coleta (t_0 , t_{45} e t_{90})..... | 83 |
| Tabela 11. Ocorrência de ovos e larvas de helmintos em lodo de esgoto mediante procedimento da Norma Oficial Mexicana (NOM, 1996) empregado nas amostras das leiras e verificação da viabilidade de ovos empregando coloração por Azul Trypan..... | 84 |
| Tabela 12. Concentração de ovos de helmintos por grama de lodo esgoto encontrados mediante procedimento da Norma Oficial Mexicana (NOM, 1996) visualizados mediante verificação da viabilidade de ovos com Azul Trypan..... | 85 |
| Tabela 13. Concentração de ovos de helmintos por grama de lodo esgoto encontrados mediante procedimento da Norma Oficial Mexicana (NOM, 1996) e verificação da viabilidade dos ovos por coloração com Azul Trypan..... | 86 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| Resumo..... | vii |
| Abstract..... | ix |
| Lista de Figuras..... | xi |
| Lista de Tabelas..... | xii |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 2. Revisão da Literatura..... | 8 |
| 2.1. Protozoários..... | 8 |
| 2.1.1. Gênero <i>Giardia</i> | 8 |
| 2.1.2. Gênero <i>Cryptosporidium</i> | 11 |
| 2.2. Helmintos..... | 16 |
| 2.2.1. <i>Ascaris</i> sp..... | 16 |
| 2.2.2. <i>Toxocara</i> sp..... | 19 |
| 2.3. Epidemiologia Ambiental..... | 21 |
| 2.3.1. Dispersão ambiental de espécies de <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> | 21 |
| 2.3.2. Gênero <i>Giardia</i> | 23 |
| 2.3.3. Gênero <i>Cryptosporidium</i> | 24 |
| 2.3.4. Presença de <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> no solo..... | 26 |
| 2.3.5. Helmintos..... | 27 |
| 2.4. Lodo de esgoto..... | 29 |
| 2.4.1. Composição e tratamento de esgoto..... | 29 |
| 2.4.2. Classificação do lodo..... | 35 |
| 2.5. Metodologias de detecção..... | 36 |
| 2.5.1. Métodos para a detecção de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em esgoto bruto (afluente) e esgoto tratado (efluente)..... | 37 |
| 2.5.2. Métodos para a detecção de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> em lodo de esgoto..... | 41 |
| 2.5.3. Métodos para a detecção de helmintos..... | 43 |

| | |
|---|----|
| 2.5.3.1. O uso de corantes vitais na determinação da viabilidade de ovos de helmintos..... | 47 |
| 3. Objetivos..... | 49 |
| 4. Justificativa..... | 50 |
| 5. Material e métodos..... | 53 |
| 5.1. Local de coleta..... | 53 |
| 5.2. Periodicidade..... | 55 |
| 5.3. Obtenção das amostras..... | 56 |
| 5.4. Análise Parasitológica..... | 57 |
| 5.4.1. Procedimento 1: Homogeneização da amostra de lodo de esgoto com solução de eluição..... | 57 |
| 5.4.2. Procedimento 2: Centrífugo – concentração seguida de clarificação com éter..... | 58 |
| 5.5. Enumeração e visualização de cistos e oocistos..... | 59 |
| 5.6. Quantificação de cistos e oocistos nas amostras..... | 60 |
| 5.7. Amostras artificialmente contaminadas (Controle Positivo)..... | 61 |
| 5.8. Avaliação de danos morfológicos mediante emprego de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 62 |
| 5.8.1. Amostras artificialmente contaminadas (Controle Positivo)..... | 62 |
| 5.8.2. Purificação dos cistos de <i>Giardia</i> | 63 |
| 5.8.3. Procedimento para a visualização por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 64 |
| 5.9. Outros métodos..... | 65 |
| 5.9.1. Detecção dos ovos de <i>Ascaris</i> e de outros helmintos..... | 65 |
| 5.9.2. Viabilidade dos ovos de helmintos..... | 67 |
| 5.9.3. Determinação dos valores de pH..... | 67 |
| 5.10. Análise Estatística..... | 67 |
| 6. Resultados..... | 69 |
| 6.1. Ocorrência de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> | 69 |
| 6.2. Amostras artificialmente contaminadas (Controle Positivo)..... | 70 |

| | |
|--|-----|
| 6.3. Purificação de cistos de <i>Giardia</i> para semeadura em amostra de efluente hospitalar..... | 72 |
| 6.4. Avaliação de danos morfológicos mediante evidência direta visual com emprego de Microscopia Eletrônica de Varredura..... | 73 |
| 6.5 Outros métodos..... | 74 |
| 6.5.1. Detecção de ovos de <i>Ascaris</i> sp. e de outros helmintos..... | 74 |
| 6.5.2. Teste de correlação de Pearson para a presença de cistos de <i>Giardia</i> spp. e ovos de <i>Ascaris</i> sp..... | 76 |
| 6.5.3. Determinação dos valores de pH..... | 77 |
| 7. Discussão..... | 87 |
| 7.1. Visão geral sobre o lodo de esgoto..... | 87 |
| 7.2. Ocorrência de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> nas amostras de lodo de esgoto..... | 91 |
| 7.3. A remoção de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> durante o tratamento de esgoto..... | 98 |
| 7.4. Comparação entre os métodos empregados (HSE e CC/CE) e eficiências de recuperação obtidas..... | 100 |
| 7.5. Correlação entre a presença de cistos de <i>Giardia</i> , oocistos de <i>Cryptosporidium</i> e ovos de <i>Ascaris</i> sp..... | 105 |
| 7.6. Fatores que influenciam na inativação de cistos de <i>Giardia</i> e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> | 106 |
| 7.7. Danos morfológicos visualizados em cistos de <i>Giardia</i> mediante emprego da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 110 |
| 7.8. Ocorrência de ovos de helmintos em esgoto..... | 112 |
| 8. Conclusões..... | 117 |
| 9. Referências..... | 119 |
| 10. Anexos..... | 133 |
| 10.1. Anexo I: Investigação parasitológica conduzida em trabalhadores de uma estação de tratamento de esgoto (Nota de pesquisa submetida)..... | 133 |

10.2. Anexo II: Comparison of two methodologies for detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in activated sludge samples from a sewage treatment plant in the city of Campinas, São Paulo State, Brazil (Artigo científico aceito para publicação) 141

1. INTRODUÇÃO

A presença de espécies dos protozoários patogênicos *Giardia* e *Cryptosporidium* tem sido comumente relatada em amostras de águas superficiais e esgoto que incluem os afluentes, efluentes e resíduos gerados no tratamento, como o lodo de esgoto (ARMON et al., 2002). Tais parasitos são reconhecidos mundialmente como importantes agentes causadores de diarreia em humanos e animais e destacam-se pelo grande potencial de veiculação hídrica (SHEPHERD e WYN-JONES, 1996).

Diversos surtos de criptosporidiose e de giardiose foram relacionados à contaminação dos corpos d'água por esgoto, como o de criptosporidiose ocorrido em Milwaukee, Estados Unidos, em 1993 (403.000 pessoas afetadas) e relacionado à giardiose na Suécia, em 1992 (1.400 casos diagnosticados) (FOX e LYTLE, 1996; ROSE, 1997; LJUNGSTROM e CASTOR, 1992).

Ascaris lumbricoides é um dos helmintos entéricos mais prevalentes e seu ovo é geralmente usado como indicador parasitológico devido à grande capacidade de resistência ambiental (AHMAMID et al., 1999). Cerca de 25% da população mundial está infectada por esse helminto, sendo que a maior prevalência ocorre nos países em desenvolvimento (AHMAMID et al., 1999, CARNEIRO et al., 2002). Apesar da maioria das infecções geralmente ser assintomática, seus efeitos podem contribuir substancialmente para a morbidade infantil quando associada à má nutrição, pneumonia, doenças entéricas e deficiência de vitamina A, além de poder causar obstrução intestinal,

principalmente nos casos em que a carga parasitária é alta (CARNEIRO et al., 2002; SCHMIDT e ROBERTS, 1996).

O esgoto doméstico é um dos vários resíduos decorrentes da atividade diária humana (PAULINO et al., 2001). Segundo a Pesquisa Nacional do Saneamento Básico (IBGE, 2000), no Brasil, 47,8% dos municípios não têm coleta de esgoto e aqueles que contam apenas com o serviço de coleta (32,0%) superam os que coletam e tratam o esgoto (20,2%). O despejo do efluente da maioria dos municípios que não contam com tratamento, segundo a mesma pesquisa, é feito preferencialmente em rios, seguido de outras opções como mar, lagos ou lagoas e baías o que compromete a qualidade dessas águas, geralmente usadas para abastecimento e consumo humano ou recreação.

Antes de passar por qualquer tipo de tratamento de estabilização e de higienização, o esgoto apresenta macro e micronutrientes, além de uma grande variedade de microrganismos (PAULINO et al., 2001). Muitos destes são saprófitos e geralmente participam do processo aeróbio e anaeróbio de estabilização (PAULINO et al., 2001). Nestes dois processos, ocorre uma etapa na qual o esgoto é misturado com uma suspensão concentrada de biomassa responsável pela degradação dos poluentes, o lodo ativado (GERNAEY et al., 1998). Em sistemas de lodos ativados, embora o ambiente seja aquático, os organismos presentes não são necessariamente os mesmos de ambientes naturais de águas doces uma vez que o processo apresenta características específicas, como turbulência, por causa da aeração e turbidez, devido ao material em suspensão (VAZOLLÉR et al., 1989). Ao final do processamento (pelos microrganismos), os flocos do lodo são separados da parte fluidizada por meio de

sedimentação, o efluente volta para o rio enquanto o lodo concentrado continua no decantador (GERNAEY et al., 1998).

Esse lodo concentrado resultante do tratamento, quando tratado e processado, torna-se o lodo de esgoto, um material rico em nutrientes e matéria orgânica (USEPA, 1999). Após tratamento e processamento, o lodo de esgoto ainda pode conter organismos patogênicos, tais como vírus, bactérias e parasitos, dentre eles *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Ascaris* e outros helmintos, que apresentam formas de resistência (cistos, oocistos e ovos, respectivamente) capazes de sobreviverem às condições adversas do ambiente (extremos de temperaturas, variação de pH e umidade, entre outras).

Um dos tratamentos realizados para a inativação desses patógenos é a compostagem pelo sistema de leiras revolvidas, ou seja, a secagem por meio da incidência de luz solar durante um determinado período de tempo. Nesse período, o lodo de esgoto é revolvido constantemente com o objetivo de expor todas as suas camadas à luz solar de maneira uniforme (TSUTYA, 2000).

Segundo Melo e Marques (2000), a perspectiva do cenário que prevê a evolução da produção do lodo de esgoto no Brasil é difícil devido ao grau de desenvolvimento e evolução da população nas diferentes regiões do país. Entretanto, tendo em vista o crescimento de grandes centros urbanos e o desenvolvimento de regiões, como, por exemplo, o Nordeste, aliados à expansão da consciência ecológica, é possível prever um aumento considerável, nos próximos anos, na criação de novas Estações de Tratamento de Esgoto (E.T.E.s), com o conseqüente aumento na produção de lodo de esgoto. Segundo a SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo), para a região

metropolitana de São Paulo, é prevista a produção de 766 toneladas por dia, em base seca, para o ano de 2015 (MELO e MARQUES, 2000).

Tal resíduo tem gerado muitas discussões em relação à sua disposição final (PAULINO et al., 2001; SANTAMARÍA e TORANZOS, 2003; SILVA et al., 2001; WALKER et al., 1998). No Brasil, a quase totalidade do lodo gerado em estações de tratamento de esgoto (E.T.E.s) é destinada a aterros sanitários competindo por espaço com o lixo urbano, um grave problema das grandes cidades (OPERSAN, 2006). Nas regiões metropolitanas de São Paulo e Campinas, a maioria desses aterros está com sua capacidade próxima ao esgotamento o que é agravado pela escassez de áreas disponíveis e aptas à construção de novos aterros (OPERSAN, 2006). Além disso, esse tipo de disposição apresenta alto custo de manutenção. Outras alternativas são propostas, como o reuso industrial com a produção de agregado leve, fabricação de tijolos, cerâmica e cimento, conversão em óleo combustível, "landfarming" (decomposição da matéria orgânica no solo) e uso agrícola (TSUTYA, 2000). O despejo em oceanos, rios e lagos, é prática proibida internacionalmente, pois pode causar sérios danos ao ambiente e a incineração que embora pareça uma alternativa prática, gera gases poluentes para a atmosfera (SILVA et al., 2001).

Deste modo, a aplicação do lodo de esgoto em solos com a finalidade de fertilização representa a melhor alternativa de uso, pois ele apresenta elevado teor de matéria orgânica, macro e micro-nutrientes, além de agir como corretivo da acidez do solo (ANDREOLI e CARNEIRO, 2002). Seu uso também pode contribuir para reduzir gastos com fertilizantes, principalmente os fosfatados e nitrogenados (SILVA et al., 2001).

Entretanto, é inerente ao uso na agricultura a preocupação com os efeitos na Saúde Pública devido aos seguintes fatores: - a presença de parasitos entéricos, como protozoários e helmintos, no solo ainda não está completamente elucidada e eles podem ser fontes de contaminação de alimentos e água, tanto superficial quanto subterrânea; - a baixa dose infectante de alguns patógenos, em especial *Giardia* e *Cryptosporidium* os quais podem ocasionar sérias implicações para pessoas imunocomprometidas e imunocompetentes (principalmente idosos e crianças); - pode ocorrer o crescimento de bactérias patogênicas como os coliformes (usados como indicadores de segurança, mas que não predizem a presença de outros patógenos) e – possibilidade de ocorrência de doenças devido a agentes desconhecidos (SANTAMARÍA e TORANZOS, 2003). Além disso, estudos recentes sugerem que fatores como temperatura, umidade e pH podem não ser suficientes para a inativação dessas formas, dependendo dos níveis de intensidade (JIMÉNEZ et al., 2002).

Em países como os Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia e Inglaterra, conselhos e agências governamentais de conservação do meio ambiente desenvolveram diretrizes para o uso e manejo do lodo de esgoto. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) promulgou regulamentos para a disposição desse resíduo em solos que incluem critérios microbiológicos (BIOVIR, 2006) para o monitoramento da presença de bactérias, vírus, ovos de helmintos, cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. No Brasil, apesar do crescente interesse pela utilização agrícola do lodo de esgoto, apenas em 2006, o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) promulgou uma norma (375/2006) para a aplicação que estabelece limites para ovos de helmintos, *Salmonella*, coliformes

termotolerantes e vírus. Os Estados de São Paulo e Paraná também possuem normas sobre o tema. Em São Paulo, a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), promulgou uma norma (P.4.230) que estabelece o controle da qualidade e da quantidade do lodo de esgoto a ser aplicado: além das quantidades máximas permitidas para coliformes fecais e *Salmonella* spp., os ovos de helmintos podem estar presentes em uma quantidade de até um ovo por grama, mas não são contemplados *Giardia* e *Cryptosporidium* (CETESB, 1999). Existe também uma Instrução Técnica da CETESB (2005) sobre o reuso de água para irrigação proveniente de esgoto sanitário tratado que prevê níveis máximos de ovos de helmintos (até 1 ovo/L), além de coliformes termotolerantes, mas que também não contempla tais protozoários. No Paraná, há uma norma estabelecida pelo IAP (Instituto Ambiental do Paraná), em 1998. No Brasil, especialmente nas áreas cobertas com vegetação do tipo cerrado, onde a silvicultura (manutenção, aproveitamento e uso racional das florestas) com espécies de rápido crescimento (eucaliptos e pinheiro) é amplamente praticada, observa-se uma baixa disponibilidade de nutrientes no solo, o que torna promissor a aplicação do lodo de esgoto nesses locais (POGGIANI et al., 2000). No Estado de São Paulo, onde há 800 mil hectares dedicados à cultura de eucaliptos, a SABESP está estudando qual seria a melhor maneira de disponibilizar a grande quantidade de lodo de esgoto produzida diariamente (POGGIANI et al., 2000).

A inexistência de uma metodologia especialmente desenvolvida e padronizada para verificar a ocorrência de determinados patógenos é outro fator que ressalta a importância do estudo do lodo de esgoto, considerando também a

habilidade destes organismos em sobreviverem às condições ambientais adversas.

Diante desse cenário, é interessante, do ponto de vista da Saúde Pública, investigar a ocorrência de cistos de espécies de *Giardia*, oocistos de espécies de *Cryptosporidium* e ovos de *Ascaris* sp. em amostras de lodo de esgoto, considerando que o esgoto é uma fonte notória de patógenos e que tal resíduo tem como principal destino, os solos usados para agricultura. Além disso, há uma escassez de dados no Brasil em relação à presença desses protozoários patogênicos nesse tipo de resíduo, bem como uma metodologia adequada para a sua detecção.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Protozoários

2.1.1. Gênero *Giardia*

Giardia é um protozoário flagelado que pertence a Classe Zoomastigophorea e Ordem Diplomonadida e está presente no trato intestinal de praticamente todas as espécies de vertebrados (THOMPSON, 2000; THOMPSON, 2004). *Giardia duodenalis* (também referida como *Giardia intestinalis* e *Giardia lamblia*) tem uma distribuição global e causa cerca de $2,8 \times 10^8$ casos por ano (LANE e LLOYD, 2002) além de ser o parasito intestinal mais comum nos países em desenvolvimento.

Seis espécies de *Giardia* são reconhecidas com base nas características morfológicas e ocorrência nos hospedeiros (OLSON et al., 2004). A taxonomia atual desse protozoário ainda não está totalmente elucidada devido às inúmeras variações genéticas relacionadas à espécie *Giardia duodenalis* (MONIS e THOMPSON, 2003; OLSON et al., 2004). Estudos realizados em diversos países com a aplicação de procedimentos baseados na amplificação do DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), caracterizaram diretamente o parasito a partir de amostras fecais e ambientais (THOMPSON, 2004). Tais pesquisas elucidaram divisões genéticas na espécie *Giardia duodenalis*, demonstrando que essa não é uma espécie uniforme, mas um complexo de espécies que compreende uma grande variedade de genótipos que exibem diferenças na especificidade dos hospedeiros (THOMPSON, 2004). São considerados os seguintes grupos genotípicos: A, subdivido em AI, amplamente distribuído geograficamente e com grande potencial zoonótico, e AII, que consiste

inteiramente de genótipo específico para humanos; e B que compreende dois subconjuntos, III e IV dos quais apenas o segundo é específico para humanos (THOMPSON, 2004). Dentro do que se conhecia como *Giardia duodenalis* pode-se incluir, no mínimo, oito genótipos: A e B, que provém de infecções humanas e, nestes grupos, somente dois sub-genótipos apresentam potencial zoonótico: AI e BIII; C e D, originados de cães; E, proveniente de gado bovino e suíno; F, derivado de gatos; G, de ratos domésticos e o genótipo derivado de roedores silvestres (THOMPSON, 2004).

Embora os animais silvestres sejam suscetíveis à infecção com genótipos zoonóticos de *Giardia duodenalis*, existem poucas evidências de que essas infecções tenham sido as fontes de surtos de origem hídrica. Esses animais têm uma maior probabilidade de se tomarem infectados a partir da água contaminada com material fecal de origem humana ou, menos provavelmente, a partir de animais domésticos, o que serviria para amplificar os números dos isolados contaminantes originais (CACCIÒ et al., 2005).

Thompson (2004) ressalta que a transmissão de *Giardia* de humano à humano pode ocorrer indiretamente por meio da ingestão acidental de cistos em água ou alimentos contaminados, ou diretamente em ambientes nos quais os níveis de higiene estejam comprometidos, como centros de saúde ou comunidades menos favorecidas economicamente. Após a ingestão dos cistos, a exposição aos ácidos estomacais e aos sais biliares estimula a excitação. Os trofozoítos atingem o intestino delgado, dividem-se por fissão binária e colonizam a sua superfície. Conforme passam pelo intestino delgado, encistam e são

eliminados posteriormente nas fezes (MONIS e THOMPSON, 2003; OLSON et al., 2004).

Os cistos de *Giardia* são recobertos por uma parede composta de uma camada filamentosa externa de 0,3 a 0,5 μm , que contém proteínas e galactosamina, além de uma camada membranosa interna com duas membranas (CAPIZZI-BANAS et al., 2002). Os trofozoítos são móveis, apresentam simetria bilateral, formato piriforme a elipsoidal, com dimensões que variam de 12-15 μm de comprimento e de 6-8 μm de largura. Apresentam superfície dorsal convexa e um disco adesivo na face ventral, responsável pela adesão ao epitélio intestinal. São binucleados, com quatro pares de flagelos e um par de corpos medianos distintos (THOMPSON, 2004).

Os sintomas da giardiose incluem diarreia aguda ou crônica, desidratação, dores abdominais, rápida perda de peso e, em crianças, podem interferir no crescimento e desenvolvimento físicos especialmente por aumentar a permeabilidade do epitélio intestinal levando a uma reação inflamatória que ocasiona alterações digestórias e interfere na absorção de nutrientes fundamentais (THOMPSON, 2000; THOMPSON, 2004).

Esta parasitose pode ser considerada como uma infecção re-emergente devido, principalmente, aos numerosos surtos de diarreia ocasionados em crianças que frequentam creches, por afetar animais de fazenda, de granja e de estimação e pela possibilidade de transmissão zoonótica (THOMPSON, 2000).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, na Ásia, África e América Latina, cerca de 200 milhões de pessoas têm giardiose sintomática e 500 mil casos são diagnosticados todos os anos (WHO, 1996).

No Brasil, existem vários estudos epidemiológicos publicados sobre a prevalência de giardiose. Segundo Franco (1996), a prevalência de *Giardia duodenalis* em crianças com idade entre 2 e 42 meses que freqüentavam creches na cidade de Campinas, S.P., foi de 10,09%. Entretanto, deve-se considerar os portadores assintomáticos da infecção que também contribuem para o aumento da prevalência.

2.1.2. Gênero *Cryptosporidium*

O protozoário *Cryptosporidium* pertence ao Filo Apicomplexa e ocorre na maioria das espécies de vertebrados (TZIPORI e WARD, 2002; FAYER, 2004). Esse gênero está relacionado aos coccídios, grupo composto por protozoários de importância para a medicina humana e veterinária. Entretanto, estudos moleculares recentes sugerem que *Cryptosporidium* tem afinidade filogenética com as gregarinas devido às semelhanças encontradas nos estádios do ciclo de vida (CARRENO et al., 1999; FAYER, 2004). Atualmente, são reconhecidas 16 espécies de *Cryptosporidium* (Tabela 1) (CACCIÒ et al., 2005; SUNNOTEL et al., 2006).

Tabela 1. Espécies de *Cryptosporidium* reconhecidas, tamanhos dos oocistos, principais hospedeiros, ocorrência em humanos e localização no hospedeiro.

| Espécies | Tamanho do oocisto (µm) | Principais hospedeiros | Ocorrência em humanos | Localização |
|-----------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| <i>C. hominis</i> | 4,5 x 5,5 | Humanos | sim | Intestino delgado |
| <i>C. parvum</i> | 4,5 x 5,5 | Ruminantes | sim | intestino |
| <i>C. andersoni</i> | 5,5 x 7,4 | Bovinos | não | Abomaso |
| <i>C. muris</i> | 5,6 x 7,4 | Roedores | sim | Estômago |
| <i>C. suis</i> | 5,1 x 4,4 | Porcos | sim | Intestino delgado |
| <i>C. felis</i> | 4,5 x 5,0 | Gatos | sim | intestino delgado |
| <i>C. canis</i> | 5,0 x 4,7 | Cães | sim | Intestino delgado |
| <i>C. bovis</i> | 4,2-4,8 x 4,8-5,4 | Ruminantes | não | Intestino delgado |
| <i>C. wrairi</i> | 4,0-5,0 x 4,8-5,6 | Cobaio | não | intestino delgado |
| <i>C. bailey</i> | 4,6 x 6,2 | Aves | não | Cloaca, bursa e trato respiratório |
| <i>C. meleagridis</i> | 4,5-5,0 x 4,6-5,2 | Peru | sim | Intestino |
| <i>C. galli</i> | 8,0-8,5 x 6,2-6,4 | Galinhas | não | Proventrículo |
| <i>C. serpentis</i> | 4,8-5,6 x 5,6-6,6 | Répteis | não | Estômago |
| <i>C. saurophilum</i> | 4,2-5,2 x 4,4-5,6 | Répteis | não | Intestino e mucosa da cloaca |
| <i>C. molnari</i> | 4,7-4,5 | Peixes | não | Estômago |
| <i>C. scophthalmi</i> | 3,0-4,7 x 3,7-5,0 | Peixes | não | Intestino |

Fontes: Cacciò et al. (2005) e Sunnotel et al. (2006).

Dessas espécies, sete delas estão relacionadas com a doença humana (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* e *C. muris*) além de dois genótipos, o de macaco e o de cervídeos (CACCIÒ et al., 2005).

No caso de *C. parvum*, é importante ressaltar que essa parece ser a espécie que apresenta menor especificidade de hospedeiro uma vez que foi identificada em camundongos, gados, humanos, cavalos e outros hospedeiros mamíferos (FAYER, 2004). Recentemente, foi proposta a criação de uma nova espécie, *C. pestis*, para designar o genótipo bovino de *C. parvum*, entretanto,

ainda há discussões em relação à sua nomenclatura. Xiao et al. (2006), em resposta à Slapeta (2006) argumentam que, no simpósio "A taxonomia do gênero *Cryptosporidium*" foram propostos alguns requerimentos para designar uma nova espécie, como os dados de tamanho e morfologia dos oocistos, caracterização genética, a verificação, quando possível, da especificidade de hospedeiro tanto naturalmente quanto experimentalmente e seguir as regras da "International Code of Zoological Nomenclature". Segundo tais autores, a nomenclatura de *C. pestis* não seguiu esses critérios enquanto que Slapeta (2006) diz que a ultra-estrutura, genética e biologia dessa nova espécie já foram bem caracterizadas, o que justificaria a sua criação.

A criptosporidiose foi relatada em 90 países e seis continentes, tanto em pacientes imunocompetentes como em imunocomprometidos (pacientes VIH positivos, transplantados e aqueles em quimioterapia) (FAYER et al., 2000) e ganhou destaque com o início da pandemia de SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) nos anos 80, na qual o *Cryptosporidium* surgiu como uma ameaça à vida para as pessoas infectadas.

A exposição aos oocistos de *Cryptosporidium* pode ocorrer diretamente por meio do contato com animais e humanos infectados ou indiretamente pela ingestão de água contaminada ou alimentos lavados com esse tipo de água e até mesmo pelo ar, por meio de aerossóis (TZIPORI e WARD, 2002; CACCIÒ et al., 2005).

O ciclo de vida inicia-se com a ingestão do oocisto pelo hospedeiro: dez oocistos ou menos podem induzir infecção, como foi registrado em pesquisa realizada com voluntários adultos (TZIPORI e WARD, 2002). Após a excitação,

quatro esporozoítos são liberados no intestino e invadem as células epiteliais do trato gastrointestinal. Os estádios subseqüentes são intracelulares, mas extracitoplasmáticos, pois o parasito localiza-se na superfície da microvilosidade da célula epitelial hospedeira. É importante ressaltar que essa localização específica do *Cryptosporidium* na célula de epitélio intestinal durante o desenvolvimento, proporciona proteção da resposta imunológica do hospedeiro assim como do ambiente hostil do intestino, enquanto pode ter acesso às reservas nutricionais e energéticas. Além disso, ele permanece em um vacúolo parasitóforo, ou organela alimentar, circundado por uma membrana que permite a entrada de nutrientes da célula hospedeira para o parasito (TZIPORI e WARD, 2002).

O desenvolvimento assexuado realiza-se por meio de duas gerações sucessivas de merogonia, liberando oito e quatro merozoítos, respectivamente. Os quatro merozoítos liberados da segunda merogonia dão origem aos estádios de desenvolvimento sexuado, os micro e macro-gamontes os quais, após unirem-se, dão origem ao zigoto. Em seguida, esse zigoto sofre duas divisões, completando o ciclo com a formação do oocisto (TZIPORI e WARD, 2002; FAYER, 2004). Dois tipos de oocistos são formados: os de parede fina, responsáveis pela auto-infecção do hospedeiro (cerca de 20% da produção total) e os de parede espessa, liberados nas fezes e resistentes às condições ambientais adversas (equivalente a 80% do total) (MONIS e THOMPSON, 2003).

Os oocistos apresentam um tamanho pequeno e formato esférico com quatro esporozoítos no interior com formato de meia-lua (FAYER, 2004). A parede externa do oocisto, que circunda os esporozoítos, proporciona proteção sob

condições extremas de temperatura e umidade por vários meses, especialmente nos países de clima temperado, nos quais a temperatura em rios e lagos permanece baixa durante o ano todo, mas acima da temperatura de congelamento da água, fazendo com que essas formas permaneçam infectantes (FAYER, 2004).

Esse protozoário causa uma infecção aguda autolimitante cujo principal sintoma é a diarreia em indivíduos imunocompetentes nos quais a doença tende a passar mais rapidamente dependendo das condições do hospedeiro (idade, presença de anticorpos maternos ou exposição prévia e dose infectante) e fatores relacionados ao parasito, tais como origem e idade dos oocistos e genótipo/espécie (TZIPORI e WARD, 2002). No caso de indivíduos imunocomprometidos, como portadores de VIH, ocorre o desenvolvimento de diarreia crônica que pode persistir durante toda a vida do indivíduo e levar ao óbito; em crianças mal-nutridas, existe grande possibilidade de diarreia persistente (TZIPORI e WARD, 2002).

Cryptosporidium parvum é de interesse particular em Saúde Pública, pois apresenta baixa dose infectante (voluntários humanos apresentaram ID₅₀ de 9 a 1024 oocistos, segundo Okhuysen, 1999), pode persistir por longos períodos no ambiente, é de difícil desinfecção em estações de tratamento de água por ser altamente resistente à desinfecção por cloro e tem sido implicado como a causa de vários surtos de origem hídrica (FAYER, 2004; SEARCY et al., 2005).

Estudos moleculares indicam que a proporção de infecções por *C. parvum* em humanos é maior nas áreas rurais do que nas urbanas (CACCIÒ et al., 2005). Embora as razões para essas diferenças não sejam conhecidas, a criação intensiva de gado, juntamente com a alimentação de grandes números de

bezerros suscetíveis podem, pelo menos parcialmente, explicar a distribuição de *C. parvum* derivado de gado em humanos (CACCIÒ et al., 2005).

Baseado na detecção de oocistos em amostras fecais, a prevalência da infecção humana em países africanos (2,6 – 21,3%), na América Central e América do Sul (3,2 – 31,5%), países asiáticos (1,3 – 13,1%) e outros países do Pacífico e áreas caribenhas é maior do que a encontrada na Europa (0,1 – 14,1%) ou América do Norte (0,3 – 4,3%), segundo Fayer (2004).

2.2. Helmintos

2.2.1. *Ascaris* sp.

O helminto *Ascaris lumbricoides* é classificado no Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Ascaridida, Superfamília Ascaridoidea e Família Ascarididae (CROMPTON, 2001). Segundo Crompton (2001), *Ascaris lumbricoides* é o helminto mais prevalente quando comparado a outros vermes intestinais como *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Trichuris trichiura*, afetando cerca de 1,4 bilhão de pessoas no mundo todo, a maioria nos países em desenvolvimento nos quais há falta de água potável e saneamento inexistente ou precário. Outra espécie de grande destaque é *Ascaris suum* que afeta suínos e é responsável por perdas econômicas devido aos danos causados nos órgãos internos e tecidos desses animais (LOREILLE e BOUCHET, 2003). Ainda existem divergências quanto ao número de espécies que o gênero *Ascaris* compreende. Alguns autores consideram válidas 13 espécies e outros 16, sendo que *Ascaris lumbricoides* é encontrado em primatas, cães e suínos (CROMPTON, 2001).

O ciclo de vida desse parasito é direto, ou seja, não há hospedeiros intermediários envolvidos (LOREILLE e BOUCHET, 2003). A infecção por *A. lumbricoides* ocorre pela ingestão do ovo que contém larva infectante (CROMPTON, 2001). Os ovos de *Ascaris* são recobertos por uma espessa camada de 3–4µm, composta de quatro subcamadas: uma interior que contém lipoproteína, uma mais fina que contém quitina e proteína, uma camada lipoprotéica e vitelínica e uma externa com ácido mucopolissacarídeo e proteína uterina (WHARTON, 1980). Essa camada externa composta de polissacarídeos permite a adesão a plantas ou a materiais em suspensão na água, e pode resultar em novas infecções e no aumento da zona de contaminação (CAPIZZI-BANAS et al., 2002).

A microscopia eletrônica de varredura revelou que a superfície dos ovos de *Ascaris* é dividida em depressões e arestas (CAPIZZI-BANAS e SCHWARTZBROD, 2002). O denso material mucoso secretado pelas células uterinas adere ao ovo e forma gradualmente uma cobertura externa e a sua função ainda é desconhecida, mas estudos revelaram que a característica mucosa tem vantagens como conferir proteção contra a desidratação e solventes, assim como às condições ambientais adversas (CAPIZZI-BANAS e SCHWARTZBROD, 2002). Os ovos de *Ascaris* podem ser inativados em minutos por temperaturas inferiores à 60°C, mas podem sobreviver por mais de um ano a 40°C (BROWNELL e NELSON, 2006). A impermeabilidade dos ovos devido às várias camadas também os protege de uma grande variedade de ácidos e bases fortes, oxidantes, agentes disruptores de proteínas e ácidos que agem na superfície (BARRET, 1976).

Os ovos liberados nas fezes pelo hospedeiro não estão no estágio infectante: eles passam de 18 dias a várias semanas no ambiente até se tornarem embrionados, dependendo das condições ambientais (umidade, temperatura e incidência de luz no solo) (O'LORCAIN e HOLLAND, 2000; CDC, 2006). Após a ingestão dos ovos, as larvas eclodem no duodeno, migram através do fígado, invadem a mucosa intestinal e são transportadas, via circulação sistêmica até os pulmões onde passam por um processo de maturação que leva de 10 a 14 dias (O'LORCAIN e HOLLAND, 2000; CDC, 2006). Em seguida, penetram pelas paredes dos alvéolos, atingem a traquéia através da árvore brônquica e são deglutidas (O'LORCAIN e HOLLAND, 2000; CDC, 2006). Ao atingirem o intestino delgado, as larvas se desenvolvem até a fase adulta. Os vermes adultos podem viver de 1 a 2 anos e as fêmeas são capazes de ovipor cerca de 200.000 ovos por dia que são liberados nas fezes em estágio não infectante (O'LORCAIN e HOLLAND, 2000; CDC, 2006).

A ascariíose apresenta diversos sintomas, dentre eles, debilidade física e mental, incluindo deterioração cognitiva e social, alta suscetibilidade a infecções, queda de resposta positiva às vacinas e desnutrição o que pode prejudicar o crescimento de milhões de crianças afetadas, principalmente nos países em desenvolvimento (CROMPTON, 2001; BROWNELL e NELSON, 2006). Os sintomas associados à migração do helminto pelos pulmões incluem pneumonia, asma, tosse, dispnéia e febre. Já a presença de jovens e adultos no intestino delgado pode causar distensão abdominal, dor abdominal, cólica, náuseas, vômitos, anorexia e prurido anal. A migração ou agregação dos adultos no intestino causa obstrução intestinal, invasão do duto biliar (podendo produzir

abscessos no fígado), apendicite aguda, pancreatite aguda, peritonite e até mesmo, obstrução do trato respiratório, levando ao risco de morte pela diminuição da ingestão de alimentos (O'LORCAIN e HOLLAND, 2000).

Os ovos de *Ascaris* são amplamente utilizados em vários estudos com o objetivo de verificar a eficiência de processos de higienização do esgoto ou lodo de esgoto uma vez que apresentam resistência às condições ambientais adversas, tais como variações extremas de pH, temperatura e desinfetantes químicos como cloro (SHAMA e AL-ADAWI, 2002; CAPIZZI-BANAS et al., 2004).

2.2.2. *Toxocara* sp.

As espécies do gênero *Toxocara* são classificadas dentro do Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Ascaridida, Superfamília Ascaridoidea e Família Ascarididae (COOMBS e CROMPTON, 1991). As espécies de maior importância para a Saúde Pública são *T. canis* e *T. cati* que têm como hospedeiros definitivos o cão e o gato domésticos, respectivamente nos quais os vermes adultos vivem na luz do intestino delgado (DESPOMMIER, 2003).

Toxocara canis é o helminto mais frequentemente associado à larva *migrans* visceral, uma doença causada pela migração da larva desse nematódeo através de tecidos extra-intestinais em humanos (OGE e OGE, 2000).

A infecção humana ocorre pela ingestão acidental de ovos embrionados presentes no solo. Entretanto, como o homem não é um hospedeiro habitual, o ciclo de vida deste helminto não se completa no ser humano (OGE e OGE, 2000; DESPOMMIER, 2003). A infecção via transplacentária, comum em cães e gatos, ocorre quando o feto adquire a infecção no útero da mãe prenhe infectada

(DESPOMMIER, 2003). A larva eclode após a ingestão do ovo, mas os estádios juvenis iniciais falham ao tentar se desenvolver em adultos: ao invés disso, as larvas perambulam pelo corpo, durante meses ou até mesmo vários anos, causando destruição em qualquer tecido que eventualmente entrem (DESPOMMIER, 2003).

Existem duas síndromes relacionadas à migração da larva de *Toxocara* em humanos: a larva *migrans* visceral (LMV) que inclui doenças associadas aos principais órgãos e a larva *migrans* ocular (LMO), na qual os efeitos patológicos no hospedeiro estão restritos aos olhos e nervo óptico (DESPOMMIER, 2003; HABLUETZEL et al., 2003).

Os sintomas clínicos são mais freqüentemente observados em crianças do que em adultos (HABLUETZEL et al., 2003). Entre as crianças, o grupo de idade mais afetado pela síndrome da larva *migrans* é de 1 a 3 anos (HABLUETZEL et al., 2003). Elas se tomam infectadas acidentalmente especialmente quando brincam em caixas de areias contaminadas com ovos (DESPOMMIER, 2003). Os principais sintomas são febre, aumento e necrose do fígado, asma e aumento dos níveis de imunoglobulinas como IgE (DESPOMMIER, 2003).

A larva *migrans* ocular usualmente ocorre em crianças de 5 a 10 anos e apresenta tipicamente danos unilaterais na visão o que é freqüentemente acompanhado de estrabismo (DESPOMMIER, 2003). A consequência mais séria dessa infecção é a invasão da retina levando a formação de granuloma, o que ocorre tipicamente periféricamente ou no pólo posterior (DESPOMMIER, 2003).

T. canis e *T. cati* são parasitos comuns da maioria de cães e gatos domésticos e peridomésticos, particularmente os mais jovens (DESPOMMIER,

2003). Até mesmo os filhotes vendidos em lojas de animais podem abrigar esses helmintos, pois podem ter sido infectados via transplacentária (DESPOMMIER, 2003). Um cão infectado com vermes adultos de *Toxocara canis* elimina milhares de ovos por dia nas fezes (HABLUETZEL et al., 2003). Como esse ascarídeo é um parasito intestinal comum em cães, em uma situação urbana típica, onde relativamente um número pequeno de cães tem acesso às áreas verdes para as necessidades fisiológicas, a contaminação com os ovos em áreas públicas em muitas cidades é alta (HABLUETZEL et al., 2003).

2.3. Epidemiologia Ambiental

2.3.1. Dispersão ambiental de espécies de *Giardia* e *Cryptosporidium*

Muitos fatores podem afetar a dispersão ambiental e conseqüentemente a transmissão de *Giardia* e *Cryptosporidium* para humanos (CARRARO et al., 2000). A persistência desses patógenos no ambiente aquático, sua resistência aos desinfetantes químicos convencionais e a infectividade faz com que sejam patógenos críticos para o processo de tratamento de água a partir de fontes superficiais e para águas recreacionais (MEDEMA e SCHIJVEN, 2001).

O grande número de possibilidades de poluição de fontes de água tem um importante papel na circulação desses protozoários (CARRARO et al., 2000). Poluição pode ser definida como a introdução no ambiente de substâncias humanas, materiais ou energia que causam perigos à saúde humana, danos aos recursos ambientais e sistemas ecológicos, destruição de estruturas ou que interfira no uso legítimo do ambiente (HAMER, 2003). A maioria das situações de disposição de resíduos envolve algum tipo de poluição (HAMER, 2003).

A poluição direta deriva da presença da população humana por meio da descarga de esgotos municipais, contaminação fecal direta, infiltração de tanques sépticos e a partir de atividades como a criação intensiva de gado, disposição de esterco de animais, liberação acidental de esterco e aplicação de esterco em solos destinados à agricultura (CARRARO et al., 2000). A contribuição animal na dispersão desses parasitos é determinada pelo gado infectado, pelos animais selvagens e por animais de estimação domésticos infectados (CARRARO et al., 2000).

A poluição indireta pode ocorrer pelo escoamento de solos contaminados destinados à agricultura ou não, para as fontes de água (CARRARO et al., 2000). Outra fonte de contaminação indireta dos corpos d'água é a aplicação de lodo de esgoto contaminado em solos destinados à agricultura (UDEH et al., 2003). A aplicação de lodo de esgoto em solos é considerada uma alternativa aos métodos tradicionais de disposição desse resíduo devido ao seu baixo custo e ao potencial de solução de disposição em longo prazo (UDEH et al., 2003). Existe também a alternativa de uso do efluente ou afluente de esgoto para irrigar culturas de alimentos usados para consumo direto ou indireto. Entretanto, pode oferecer risco potencial à saúde humana pela presença de patógenos como *Giardia*, *Cryptosporidium* e helmintos, entre outros, assim como contaminar o solo e possíveis reservatórios d'água (AHMAMID et al., 1999).

Tanto no caso da aplicação do lodo de esgoto quanto de esterco em solos destinados à agricultura, há o risco do escoamento por fluxo terrestre que ocorre quando a chuva é incapaz de infiltrar na superfície do solo e corre sobre ele, normalmente em pequenos canais (TYRREL e QUINTON, 2003). Esse é o

principal meio pelo qual as partículas são transportadas do solo para as águas superficiais. O transporte de partículas pode ter efeitos danosos na qualidade da água como o aumento da concentração dessas no leito do rio e aumento da turbidez. Também é reconhecido que os patógenos podem ser transportados pelo fluxo terrestre e essa é uma causa significativa da contaminação das águas superficiais (TYRREL e QUINTON, 2003).

2.3.2. Gênero *Giardia*

Giardiose é a doença de veiculação hídrica mais freqüentemente diagnosticada e, juntamente com *Cryptosporidium*, é uma das principais preocupações em Saúde Pública em relação à contaminação de corpos d'água tanto em nações desenvolvidas quanto naquelas em desenvolvimento (HOQUE et al., 2002).

Vários surtos de giardiose foram identificados nos últimos 20 anos causados por veiculação hídrica. Esses surtos têm ocorrido como resultado de uma variedade de condições, incluindo o uso de água superficial não tratada, água contaminada nos sistemas de distribuição e deficiências no tratamento (FINCH e BELOSEVIC, 2002).

É importante destacar a dispersão e inesperados altos níveis de infecção de *Giardia* no gado, especialmente em bezerros (THOMPSON, 2000; THOMPSON, 2004). A infecção nesses animais parece ser mais prevalente do que o imaginado, e levanta questionamentos sobre a importância clínica e significado em Saúde Pública (THOMPSON, 2000; THOMPSON, 2004). O padrão de infecção é similar entre o gado de corte e o gado leiteiro com cistos aparecendo nas fezes em

aproximadamente quatro semanas de idade (THOMPSON, 2004). O gado tem as maiores intensidades de liberação de cistos - de 10^5 a 10^6 cistos por grama de fezes entre 4 e 12 semanas de idade, fato que pode comprometer a criação assim como aumentar os níveis de contaminação ambiental (RALSTON et al., 2003).

Estudos demonstram que, dependendo da região, *G. duodenalis* é o parasito entérico mais comum em cães e gatos domésticos (BUGG et al., 1999; McGLADE et al., 2003). Entretanto, é sugerido que as taxas de prevalência de *Giardia* em animais de estimação são geralmente subestimadas devido à baixa sensibilidade dos métodos convencionais, o fato do parasito poder estar presente em níveis sub-clínicos e à natureza intermitente da eliminação de cistos (McGLADE et al., 2003).

2.3.3. Gênero *Cryptosporidium*

Os oocistos de *C. parvum* são liberados em grandes quantidades pelos animais e gado infectado (10^{10} durante infecções agudas ou crônicas) e menos a partir de indivíduos infectados assintomáticos e outras espécies de mamíferos (TZIPORI e WARD, 2002).

C. parvum está provavelmente presente em todo gado doméstico do mundo. As infecções assintomáticas e a eliminação prolongada de oocistos pelo gado adulto são reconhecidas como uma das principais fontes contínuas de contaminação ambiental, e certamente a fonte a partir da qual os jovens bezerros entram em contato (TZIPORI e WARD, 2002). Como os oocistos são eliminados para o ambiente por meio das fezes do gado infectado, acredita-se que o solo

sirva como uma rota de transmissão do animal para as fontes de água (BARWICK et al., 2003).

Infecções em cães, gatos e cavalos são reportadas e devem ser consideradas como fontes potenciais de infecção para humanos, principalmente por serem responsáveis pela produção de oocistos em grandes quantidades, assim como a disseminação ambiental (TZIPORI e WARD, 2002). Animais silvestres, que são comumente infectados com *Cryptosporidium* também contribuem para a contaminação ambiental e transmissão da doença (TZIPORI e WARD, 2002).

Diversos surtos de criptosporidiose foram bem documentados nos Estados Unidos desde 1985 (ROSE, 1997). O surto de Milwaukee (Wisconsin) em 1993 foi o de maior proporção, pois atingiu 400.000 pessoas e causou a morte de mais de 100 (FOX e LYTLE, 1996; ROSE, 1997). Vários desses surtos tiveram como causa uma potencial contaminação dos corpos d'água por esgoto de origem doméstica (ROSE, 1997). Segundo levantamento realizado por Oliveira (2005), de 1984 a 2002, 69 surtos de criptosporidiose causados pela veiculação hídrica foram relatados nos Estados Unidos afetando cerca de 436.232 pessoas.

Estudos verificaram a sobrevivência dos oocistos em solo, principalmente devido à prática cada vez mais comum da aplicação de lodo de esgoto em solos destinados à agricultura e também em culturas irrigadas com água de reuso do sistema de tratamento de esgoto (ARMON et al., 2002; UDEH et al., 2003). Os oocistos de *Cryptosporidium* podem migrar mais de 90 cm de profundidade no solo, o que pode possibilitar a contaminação de lençóis freáticos durante longos períodos de irrigação ou devido à erosão (ARMON et al., 2002). Udeh et al. (2003)

verificaram que a inativação dos oocistos é lenta durante os primeiros 45 dias após a aplicação do lodo no solo; nos 45 dias seguintes, há um aumento e a taxa de inativação chega a 25%. Entre os fatores responsáveis pela inativação, estão a dessecação e a temperatura elevada (UDEH et al., 2003).

As doenças de veiculação hídrica ocasionadas por agentes de transmissão fecal-oral, como o *Cryptosporidium* não são influenciadas somente pelo clima (NATH et al., 1999). A incidência da infecção nas populações humana e animal e a eliminação de oocistos em algumas bacias hidrográficas também são fatores que contribuem para essa doença de veiculação hídrica (ROSE et al., 2002). O tipo de manejo dos resíduos animais e o tratamento de esgoto, assim como o tipo de disposição vai influenciar a probabilidade dos oocistos atingirem o ambiente (ROSE et al., 2002).

A correlação entre o fluxo do rio e a concentração de oocistos sugere que os solos em áreas tratadas com resíduos como o lodo de esgoto, são reservatórios de oocistos (WALKER et al., 1998).

2.3.4. Presença de *Giardia* e *Cryptosporidium* no solo

Questões que envolvem o transporte no ambiente, assim como a sobrevivência desses parasitos, foram pouco estudadas devido à falta de informação de fatores ambientais em micro-escala e propriedades biológicas fundamentais que afetam o transporte de cistos e oocistos assim como sua sobrevivência (ANGUSH e GHIORSE, 1997).

De acordo com Santamaria e Toranzos (2003), existe uma preocupação sobre o aumento de doenças transmitidas via solo para a população humana

devido ao sucesso das práticas de aplicação de lodo de esgoto e esterco em solos destinados à agricultura. Segundo tais autores, essa prática pode favorecer a entrada de concentrações consideráveis de patógenos entéricos no solo devido às grandes quantidades aplicadas desses resíduos.

A preocupação em relação à Saúde Pública é devida ao fato de que ainda não está bem elucidada a sobrevivência de tais parasitos no solo; as doses infectantes são baixas, o que implica em um grande risco especialmente para crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos; e a presença de algumas bactérias não pode prever a presença de outros patógenos (SANTAMARIA e TORANZOS, 2003). Esses autores afirmam também que o movimento de microrganismos no solo é dependente do seu estado de saturação de água: a movimentação é mais rápida sob condições de saturação, mas somente por poucos centímetros, pois os microrganismos estão em contato com as partículas do solo, o que promove a adsorção. Quando o solo está saturado, todos os poros são preenchidos pela água, permitindo aos microrganismos passarem através do solo (SANTAMARIA e TORANZOS, 2003).

Santamaria e Toranzos (2003) destacam que as chuvas podem ocasionar uma dispersão maior dos patógenos pelo escoamento de lugares que receberam aplicação de lodo de esgoto ou esterco ou por percolação pelo solo, fatores importantes que afetam o movimento dos microrganismos no solo.

2.3.5. Helmintos

O solo é a principal fonte de transmissão de helmintos para humanos e animais (CIARMELA et al., 2002).

A infecção humana com as quatro espécies mais comuns de helmintos, coletivamente conhecidas como helmintos transmitidos pelo solo ou geohelmintos, é amplamente distribuída no mundo (CROMPTON, 2001). As estimativas freqüentemente publicadas indicam que cerca de 1,4 bilhão de pessoas estão infectadas por *Ascaris lumbricoides*; 1,2 bilhões por *Ancylostoma duodenale* e 1 bilhão, por *Necator americanus* ou *Trichuris trichiura* (CROMPTON, 1999).

Muitos indivíduos abrigam mais de um helminto das espécies citadas anteriormente, na maior parte de suas vidas (CROMPTON, 2001). As infecções são principalmente encontradas em comunidades pobres, onde inexistem água potável e saneamento básico e são requeridos recursos para promover a educação sanitária e suporte para cuidados à saúde (CROMPTON, 2001).

A aplicação de lodo de esgoto em solos destinados à agricultura e em pastagens pode levar à contaminação ambiental por ovos de helmintos que são fortemente resistentes às condições ambientais adversas e aos desinfetantes comumente usados em estações de tratamento de água ou esgoto (BAKER et al., 2002; SHAMMA e AL-ADAWI, 2002).

Os ovos de *Ascaris* são usados na maioria dos estudos que trabalham com a inativação devido ao fato de serem altamente resistentes aos produtos químicos, como cloro, e também aos estresses físicos, como variações extremas de pH e temperatura (SHAMMA e AL-ADAWI, 2002). Sendo assim, a inibição do desenvolvimento desses ovos ao estágio larval no processo de embrionamento, é utilizado para indicar sucesso no processo de desinfecção de lodo de esgoto (SHAMMA e AL-ADAWI, 2002).

O estudo de Habluetzel et al. (2003) verificou a prevalência de *Toxocara canis* em cães e a contaminação ambiental em Merche, na Itália. Os resultados mostraram uma prevalência de 33,6% nos 295 cães examinados. Tais autores também verificaram amostras de solo em áreas rurais nas quais encontraram positividade de 42,3% a 58,8%; em parques públicos 24% das amostras (n = 34) estavam positivas para ovos de *T. canis*.

Segundo as regulamentações da Agência Ambiental Norte Americana (USEPA – United States Environmental Protection Agency, 1999), o limite de detecção de ovos de helmintos em lodo de esgoto aplicado em solos destinados à agricultura é de 1 ovo em 4 gramas.

2.4. Lodo de esgoto

2.4.1. Composição e tratamento de esgoto

A composição dos esgotos apresenta uma variação em função do local de origem, se de área tipicamente residencial ou industrial, da época do ano (estações secas ou chuvosas) e do processo de tratamento utilizado pela estação de tratamento de esgoto (ETE) (MELO e MARQUES, 2000). Cerca de 99,99% do esgoto doméstico é constituído por água. Durante o processo de tratamento, de uma maneira geral, ocorre a separação das frações sólidas e líquidas. A fração sólida que contém componentes orgânicos e inorgânicos é submetida, posteriormente, a um processo de digestão e desidratação (MELO e MARQUES, 2000).

O principal objetivo do tratamento de esgoto é a estabilização, pela aceleração da degradação, produzindo resíduos finais incapazes de mudanças

futuras, ou seja, completamente mineralizados ou capazes de fazer parte dos ciclos biogeoquímicos elementares no ambiente, sem causar distorção em nenhum ciclo em relação ao outro (HAMER, 2003).

O tratamento de esgoto envolve três tipos de processos: físico, químico e biológico. O processo físico tem por finalidade remover materiais em suspensão no esgoto, como sólidos grosseiros, decantáveis e flutuantes; tal processo geralmente é empregado na entrada do esgoto bruto na estação de tratamento por meio de grades que desempenham a função de impedir a sua entrada. Os processos químicos são aqueles em que há a adição de produtos químicos, como, por exemplo, para auxiliar a decantação. Os processos mais utilizados são: floculação, precipitação química, oxidação, cloração e neutralização ou correção do pH (JORDÃO e PESSOA, 1975).

Os principais processos biológicos de tratamento de esgoto incluem a oxidação biológica por meio do tratamento por lodos ativados e a digestão do lodo que pode ser aeróbia ou anaeróbia (JORDÃO e PESSOA, 1975).

Durante o tratamento de esgoto pelo processo de lodo ativado, uma das tecnologias de tratamento mais difundida, cistos e oocistos são sedimentados no esgoto bruto, mas essa concentração está diretamente relacionada com a incidência das parasitoses na comunidade (GERBA e SMITH, 2005; GERNAEY et al., 1998). Nesse processo, o esgoto é misturado com uma suspensão concentrada de biomassa (o lodo ativado) responsável pela degradação dos poluentes. Quando o processo de degradação chega ao final, os flocos de lodo são separados do esgoto, em um decantador. O efluente é descartado em águas superficiais enquanto a suspensão concentrada de lodo é continuamente retirada

do fundo do decantador. A maior parte da suspensão de lodo concentrado é reciclada e misturada novamente com o esgoto na entrada da Estação de Tratamento. O excesso de lodo produzido devido ao crescimento bacteriano durante o processo de degradação é normalmente descartado como uma fração do fluxo de lodo concentrado retirado do fundo do decantador e tratado separadamente; é conhecido como lodo de esgoto (GERNAEY et al., 1998).

Os processos de higienização do lodo envolvem duas fases: a destruição ou inativação irreversível de todos os patógenos presentes e, a prevenção de subsequente novo crescimento desses (HAMER, 2003).

A estabilização do lodo de esgoto é obtida com tratamentos que reduzem o conteúdo de matéria orgânica (digestão aeróbia ou anaeróbia) ou pelo bloqueio da habilidade de fermentação de determinadas bactérias, por meio de adição de cal, processo conhecido como caleação (HUYARD et al., 2000). Dentre os processos de higienização do lodo de esgoto para uso na agricultura, a caleação tem significativa importância pelo seu baixo custo, facilidade operacional e eficiência, além de agregar valor ao lodo de esgoto caracterizando-o como corretivo da acidez dos solos. Entretanto, há limitação de disposição de tal resíduo devido ao elevado pH do produto final (ANDREOLI e CARNEIRO, 2002; BETTIOL e CAMARGO, 2000). No caso da eficiência de remoção de patógenos, segundo Mignotte-Cadiergues et al. (2001), a adição de cal ao lodo de esgoto modifica a temperatura, pH e umidade que, em condições extremas em tempos prolongados, pode causar a inativação de patógenos. Tais autores verificaram, em condições experimentais, que a concentração de ovos de helmintos no lodo sólido foi reduzida em até sete vezes da sua concentração inicial nas primeiras 24 horas e

pH de 12,5, em 7 dias e pH de 12,0 em 14 dias e pH de 11,5 quando adicionada cal ao lodo de esgoto. Entretanto, deve-se levar em consideração que a adição de cal modifica o pH do solo e pode alterar suas características, podendo auxiliar ou não na cultura de interesse para o produtor.

Outro processo de higienização do lodo de esgoto é a compostagem. Trata-se de um processo de degradação aeróbia na qual a matéria orgânica se decompõe e/ou transforma sob a ação de microrganismos em condições de umidade (TSUTYA, 2000; HAMER, 2003). Uma das tecnologias de compostagem é o sistema de leiras revolvidas, considerada a mais simples de ser implantada e operada além de apresentar o menor custo de instalação (TSUTYA, 2000). Nesse sistema, o resíduo é disposto em longas leiras de seção triangular, geralmente de 4,0 a 5,0 m de base e 1,5 a 2,0 m de altura. Normalmente as leiras são colocadas em áreas descobertas e a aeração se faz pela convecção e difusão natural do ar na massa do composto e pelo revolvimento periódico realizado com pá carregadeira ou outro equipamento específico (TSUTYA, 2000).

Se o resíduo estiver bem equilibrado, nos primeiros 2 a 4 dias de compostagem, a temperatura deve passar de 55°C e estabilizar-se em 60°C. A fase termófila tem duração variável, de acordo com as características dos substratos, podendo durar de 40 a 60 dias (TSUTYA, 2000). Há ainda a necessidade posterior de 60 dias para a fase de maturação. Pela norma norte-americana, a temperatura nesse processo deve ser superior a 55°C, durante pelo menos 15 dias, com revolvimento mecânico da leira por 5 dias (LASARIDI et al., 2000). O declínio da temperatura é geralmente considerado como um indicador da conclusão do processo e da estabilidade do produto, por ser um reflexo da

atividade dos microrganismos envolvidos no processo (LASARIDI et al., 2000). Entretanto, a queda da temperatura ou falta de insolação suficiente também podem causar morte térmica dos organismos, deficiência de oxigênio, morte prematura e falta de espaços livres de oxigênio na leira (LASARIDI et al., 2000).

A contaminação humana com patógenos pode ocorrer pelo contato direto com o lodo de esgoto, pela ingestão de água ou alimentos contaminados com tal resíduo ou por meio do contato com vetores e, possivelmente, por meio de aerossóis originados da aplicação nos solos destinados à agricultura (O'CONNOR et al., 2005).

Como uma consequência do aumento da consciência e preocupação com o ambiente, o tratamento de esgoto é amplamente adotado fazendo com que outro problema seja agravado: o manejo e a disposição de grandes quantidades de lodo de esgoto (LASARIDI et al., 2000). O reuso do lodo de esgoto pode ser limitado devido à grande quantidade de microrganismos parasitas de origem fecal, especialmente se for considerado que esses organismos quando removidos, independentemente do processo empregado, são concentrados em várias ordens de magnitude no resíduo final (GERBA e SMITH, 2005). Assim, alguns patógenos podem estar presentes no efluente final, o que pode possibilitar a contaminação de águas recreacionais e fontes usadas para abastecimento e consumo humano (ROSE et al., 1997).

As alternativas propostas para a disposição do lodo de esgoto, como a disposição em aterros sanitários, amplamente utilizada no Brasil, apresenta alto custo de manutenção; o despejo em oceanos, rios e lagos é uma prática proibida nos Estados Unidos desde 1993 e, na Europa, desde 1999 e também em outros

países; a incineração, apesar de prática, não é economicamente viável por gerar gases poluentes à atmosfera uma vez que tal resíduo pode conter níquel, cádmio, chumbo e cromo, metais altamente tóxicos e também por compostos orgânicos persistentes (SILVA et al., 2001; LONG, 2001). Além dessas, existem também alternativas como o reuso industrial para a fabricação de tijolos, cerâmica e produção de cimento e conversão do lodo em óleo combustível (BETTIOL e CAMARGO, 2000).

O potencial do uso do lodo de esgoto é como fertilizante e/ou condicionador de solo devido ao elevado teor de matéria orgânica e de nutrientes de interesse em nutrição de plantas, especialmente o nitrogênio, além de outros como o fósforo, ferro, cálcio e magnésio (ANDREOLI e CARNEIRO, 2002; LONG, 2001). Entretanto, há o risco potencial de transmissão de doenças bacterianas, virais e parasitárias através da rota homem-lodo-solo-plantação-homem que constitui um dos grandes problemas associados com a disposição do lodo em solos destinados à agricultura. Devido à sua capacidade de formar estruturas de resistência em condições adversas (cistos, oocistos e ovos), os parasitos representam um sério problema de saúde para a população em geral (JIMÉNEZ et al., 2002).

A disposição do esgoto em solos destinados à agricultura pode trazer riscos à saúde, pois os parasitos podem ser transmitidos aos alimentos a partir do solo. Nas áreas de pastagens, o uso do lodo de esgoto como fertilizante pode induzir a transmissão zoonótica de *Giardia* e *Cryptosporidium* e durante as chuvas, (oo)cistos podem atingir as águas superficiais e subterrâneas. A baixa dose infectante desses parasitos também sugere riscos para a saúde de trabalhadores

expostos ao esgoto (RIMHANEN-FINNE et al., 2004) (Anexo I). No Brasil, a norma 375 (2006) do CONAMA proibiu a aplicação de lodo de esgoto em pastagens.

2.4.2. Classificação do Lodo

Segundo a Resolução 375 do Conselho Nacional de Meio Ambiente, o lodo de esgoto pode ser classificado da seguinte maneira:

- Classe A: indicado para grandes culturas mecanizadas e sem contato primário, como milho, feijão e soja. O limite máximo permitido para ovos viáveis de helmintos é de menos de 0,25 ovos/g de sólidos totais; para coliformes termotolerantes o valor máximo é de 10^3 NMP/ g de sólidos totais. A resolução ainda prevê a ausência de *Salmonella* (em 10g de sólidos totais) e vírus em quantidades inferiores a 0,25 UFP /g sólidos totais.

- Classe B: indicado para espécies florestais e frutíferas, sendo que, para as últimas, a aplicação deve ser feita no sistema de covas. O limite máximo permitido para ovos viáveis de helmintos é de menos de 10 ovos/g de sólidos totais. É prevista a presença de coliformes termotolerantes (10^6 NMP/g sólidos totais) e ovos viáveis de helmintos (< 10 ovos/g sólidos totais).

Os controles impostos nas práticas de aplicação do lodo de esgoto geralmente têm o objetivo de proteger a Saúde Pública e o ambiente, mas também devem levar em conta fatores como disponibilidade de tecnologias de controle, a relação custo – benefício, objetivos públicos, aceitação da sociedade e as realidades políticas. Tradicionalmente o odor é considerado primariamente uma questão de aborrecimento e os efeitos dos odores na Saúde Pública estão agora recebendo mais atenção dos pesquisadores. Projeções futuras indicam que, com

a expansão da população, haverá maior produção municipal de dejetos, assim como resíduos decorrentes da produção de alimentos (O'CONNOR et al., 2005).

2.5. Metodologias de detecção

Gerba e Smith (2005) ressaltaram a importância da padronização e validação dos métodos para a análise da ocorrência de *Giardia* e *Cryptosporidium* em amostras ambientais. Entretanto, o maior problema em detectar e enumerar esses parasitos nesse tipo de resíduo é o alto custo das tecnologias atuais de detecção, o que pode explicar as raras análises (LEMARCHAND e LEBARON, 2003).

Para a avaliação de risco bem sucedida existe a necessidade de dados mais conclusivos sobre a dose infectante, assim como a sobrevivência e transporte desses parasitos, especificamente durante a aplicação do lodo de esgoto no solo (O'CONNOR et al., 2005) e toma-se necessário ressaltar que insuficiente experiência está disponível para a condução de avaliação de risco, até o momento.

As técnicas tradicionalmente desenvolvidas para a enumeração de cistos e oocistos em amostras de água geralmente não são aplicáveis para a enumeração desses em amostras de esgoto ou de fezes animais devido à grande quantidade de partículas presentes nesses tipos de amostras, assim como, de lipídios (DAVIES et al., 2003; McCUIN e CLANCY, 2005). A eficiência das técnicas de enumeração de protozoários em amostras de esgoto, solo e fezes, é dependente de uma recuperação adequada em função da separação dos organismos-alvos a partir das partículas presentes nas matrizes (DAVIES et al., 2003). Os métodos de

visualização e identificação dos parasitos podem ser arbitrariamente classificados dentro de três categorias: - morfologia geral, - coloração química ou por imunofluorescência e, - testes bioquímicos ou moleculares (ZARLENGA e TROUT, 2004).

2.5.1. Métodos para a detecção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em esgoto bruto (Afluente) e esgoto tratado (Efluente)

Bukhari et al. (1997) verificaram a ocorrência de cistos e oocistos em amostras de afluentes e efluentes em estações de tratamento de esgoto na Inglaterra. Os métodos utilizados por esses autores combinaram etapas de flutuação em solução saturada de sacarose (gr. sp.=1,18) com clarificação em éter etílico. Os resultados desse estudo mostraram que os oocistos foram detectados em concentrações menores e menos freqüentemente quando comparados aos cistos, cujas concentrações foram mais altas e também mais prevalentes tanto para as amostras de afluente, quanto para efluente. Não foram realizados experimentos para verificar a eficiência de recuperação a partir de amostras artificialmente contaminadas.

No Reino Unido, Robertson et al. (2000) propuseram cinco procedimentos de concentração e purificação para cistos e oocistos em amostras de esgoto procedentes de plantas de tratamento. No primeiro deles é realizada a filtração da amostra de efluente em filtro com porosidade nominal de 1 µm seguida de flutuação em solução saturada de sacarose. No segundo método, as amostras são submetidas à centrífugo-concentração seguida de flutuação em solução saturada de sacarose. Na terceira técnica, inicialmente realiza a centrífugo-concentração, e

posterior clarificação em éter etílico. No quarto procedimento há a combinação de flutuação em solução saturada de sacarose com a clarificação em éter etílico. No último, as amostras são submetidas apenas a um processo simples de centrífugo-concentração, sem procedimentos de purificação ou clarificação. O método que apresentou melhor eficiência de recuperação em experimentos feitos com o emprego de amostras artificialmente contaminadas foi o de centrífugo-concentração simples no qual a variação da eficiência de recuperação foi de 78,0% a 81,0% para amostras de efluente e de 79,0% a 85,0% em amostras de afluente em relação aos cistos de *Giardia*; para os oocistos de *Cryptosporidium*, a recuperação foi de 89,0% para amostras de efluente e de 81,0 a 85,0% em amostras de afluente. O segundo método que resultou em melhor recuperação foi o que combinou a flutuação em solução saturada de sacarose com a clarificação em éter. As eficiências de recuperação variaram de 48,0% a 52,0% para cistos em amostras de efluente, 49,0% em afluente; para oocistos foi de 44,0% a 61,0% em amostras de efluente e de 32,0% a 33,0% em afluente.

Redlinger et al. (2002) analisaram o esgoto bruto doméstico de três comunidades que vivem na fronteira do México com os Estados Unidos da América, com o objetivo de realizar um inquérito parasitológico sobre a prevalência de *Giardia* e *Cryptosporidium*. Nesse estudo foram coletados de 100 a 200g do esgoto bruto e uma alíquota de 11g foi retirada e homogeneizada durante 20 segundos com água destilada; para a análise de cistos e oocistos foram retirados 10 μ L dessa mistura final para a visualização por meio de reação de imunofluorescência direta. De uma maneira geral, o estudo verificou a presença de 81,6% das amostras positivas para *Giardia* e 70,4% para *Cryptosporidium*, mas

não foram realizados experimentos em amostras artificialmente contaminadas para verificar a eficiência de recuperação do método aplicado.

Clancy e McCuin (2003) submeteram amostras de 0,25 a 1 L de esgoto bruto e efluente primário ao Método 1622 (USEPA, 2001) inicialmente desenvolvido para a detecção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água. Nesse estudo, os autores substituíram a etapa de filtração inicial pela centrífugo-concentração e utilizaram um controle interno contendo cistos e oocistos gama irradiados e marcados com o fluorocromo Texas Red (ColorSeed®) o qual permite a enumeração dessas formas parasitológicas adicionadas à amostra pela visualização em distintos comprimentos de ondas. Os oocistos foram posteriormente capturados pelo método de separação imunomagnética na presença de 0,75g de "kaolin" para auxílio na remoção das partículas. A eficiência de recuperação para esgoto bruto foi de 32,6% e para efluente primário de 38,8%.

O método utilizado por McCuin e Clancy (2005), para a concentração dos oocistos em esgoto bruto e efluente primário, foi a centrífugo-concentração com solução de eluição contendo Tween 80. No caso das amostras de efluente secundário e terciário foi utilizado o filtro da Envirocheck que consiste em um pequeno filtro com uma taxa de filtração de 2L por minuto. Nesse caso, as amostras analisadas foram de 10L. As amostras de lodo de esgoto foram submetidas à flutuação em solução saturada (gr. sp.=1,10) para remoção de partículas e, em seguida, processadas com separação imunomagnética (IMS) ou diretamente submetidas ao processo de IMS; foram utilizados de dois a cinco gramas de lodo de esgoto. Os autores também adotaram o método da separação

imunomagnética para a detecção dos oocistos nos outros tipos de amostras de efluente e compararam dois kits comerciais: Dynal® e Aureon®. As eficiências de recuperação verificadas por McCuin e Clancy (2005) para amostras de esgoto bruto variaram de 2,7% a 31,8% para oocistos com uso do kit Dynal. Para o kit Aureon, as variações foram de 1,9% a 17,3%. Em amostras de efluente primário, para o kit Dynal, a variação foi de 30,9% a 42,7% e não foram realizados experimentos para o kit Aureon. Para amostras de efluente secundário a variação da eficiência de recuperação foi de 21,9% a 53,0% para o kit Dynal e de 8,8% a 10,4% para o kit Aureon. As amostras de efluente terciário apresentaram médias de eficiências de recuperação de 67,8% para o kit Dynal e 41,2% para o kit Aureon.

Dos métodos propostos em todos esses estudos, o de Robertson et al. (2000) apresentou as melhores eficiências de recuperação para amostras de afluente e efluente. Além de serem métodos simples de realizar, possuem baixos custos e seriam de fácil implantação na rotina de laboratórios de estações de tratamento de esgoto, especialmente em países em desenvolvimento. As amostras advindas das diversas etapas do tratamento de esgoto apresentam grande quantidade de partículas que interferem na detecção dos cistos e oocistos, por isso, faz-se necessário a regulamentação e implantação de métodos que removam ao máximo tais sujidades e garantam uma eficiência de recuperação adequada.

2.5.2. Métodos para a detecção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em lodo de esgoto

Thiriat et al. (1997) sugeriram dois métodos para a detecção de cistos de *Giardia* em amostras de lodo de esgoto. O primeiro constituía-se de uma fase de centrifugação de 5g do lodo com 200mL de água destilada e posterior visualização. O segundo envolvia três fases: filtração, cromatografia em gel (procedimento que separa proteínas com base no seu tamanho) e verificação da quantificação e “viabilidade” por meio de corante vital. As médias de concentração de cistos de *Giardia* por quilo de amostra de lodo úmido variaram de $0,9 \times 10^6$ a $8,7 \times 10^6$ para os dois métodos considerados juntamente e eles não apresentaram diferenças significativas em relação à recuperação.

No estudo de Massanet-Nicolau (2003) foi utilizado um método que combinou as etapas de sedimentação (durante 60 minutos) e de flutuação em solução saturada de sacarose em amostras de lodo de esgoto e, posteriormente, separação imunomagnética para a recuperação de cistos e oocistos. As eficiências de recuperação associadas à sedimentação variaram de 38,9% a 58,5% enquanto as associadas à flutuação em solução saturada de sacarose, de 1,3% a 5,4%.

Iacovski et al. (2004) verificaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de lodo de esgoto por meio da separação imunomagnética seguida de reação de imunofluorescência indireta. Foram utilizadas alíquotas de 1g, 2g e 3g de lodo de esgoto que receberam 12 mL de tampão fosfato, soro de albumina bovina 1%, dodecil sulfato de sódio a 0,1% e azida de sódio a 0,05% e, em seguida, o controle interno foi adicionado. As

amostras foram então vigorosamente agitadas e deixadas sedimentar espontaneamente durante 10, 20, 30 e 40 minutos, respectivamente, para estabelecer o tempo ótimo de sedimentação dos oocistos. As amostras de 1g de lodo resultaram em melhor eficiência de recuperação (46,85%) e os autores ressaltam que isso pode ter ocorrido devido à menor quantidade de partículas quando comparado às outras massas analisadas no trabalho (2g e 3g). O tempo que acarretou melhor eficiência de recuperação foi 20 minutos (43,04%) em relação aos outros períodos (7,19%, 4,38% e 6,86% para 10, 30 e 40 minutos respectivamente). Nesse estudo, a eficiência média de recuperação do método de IMS juntamente com a imunofluorescência indireta foi de 39,96%.

Rimhanen-Finne et al. (2004) compararam a presença de bactérias com a de cistos e oocistos em amostras de lodo de esgoto. O procedimento utilizado para concentração dessas formas de resistência foi a amostragem de 450mg de lodo e disposição em uma lâmina com o auxílio de um cotonete de algodão embebido em água destilada; em seguida, a amostra foi fixada com acetona e deixada secar em temperatura ambiente. Os cistos e oocistos foram detectados por meio de reação de imunofluorescência direta. Foram analisadas 38 amostras com 70 dias de exposição ao sol e dessas, cistos estavam presentes em 44,0% e oocistos em 37,5%. Uma desvantagem desse método é o obscurecimento de cistos e oocistos na lâmina uma vez que não foi realizado um procedimento prévio de concentração ou clarificação.

Montemayor et al. (2005) verificaram a presença de oocistos em amostras de esgoto bruto e tratado na Espanha. A concentração de tais formas de resistência foi feita por um procedimento que combinou uma etapa inicial de

filtração através de peneira (porosidade nominal de 30µm) para remover as partículas maiores, seguida de sonicação da amostras por três minutos com solução de eluição contendo Tween 80 e TRIS e subsequente centrifugação (1500 x g por 10 minutos). O sedimento final foi submetido ao método de separação imunomagnética. A eficiência de recuperação relatada nesse estudo foi de 60,0%.

McCuin e Clancy (2005) sugerem também o uso da separação imunomagnética com controle interno para o lodo de esgoto. As eficiências de recuperação foram de 21,3% a 52,1% e apenas o kit Dynal foi utilizado diretamente. Quando empregado procedimento de flutuação com solução saturada, as eficiências de recuperação variaram de 25,9% a 64,8% e a eficiência de recuperação obtida em uma amostra com 10,0% do total de sólidos foi de 43,9%, quando utilizados 5g de amostra.

Sumarizando, o uso de separação imunomagnética resultou em maiores taxas de recuperação e grande variação. Entretanto, é importante considerar os diferentes tipos de amostras analisadas nos estudos citados e o grande teor de partículas presentes nas amostras derivadas de esgoto, o que constituiu um fator crítico de interferência nos procedimentos de detecção e visualização de cistos e oocistos. A separação imunomagnética é uma tecnologia de alto custo, proibitiva para a maioria dos países em desenvolvimento que são os que mais carecem e necessitam destas análises microbiológicas de forma rotineira.

2.5.3. Métodos para a detecção de helmintos

Nos países em desenvolvimento existe um interesse crescente em diminuir a mortalidade, especialmente a infantil (OROPEZA et al., 2001). Isso tem levado

os governos e as autoridades responsáveis pela saúde e proteção ambiental a adotar regulamentos e padrões para controlar os agentes responsáveis por causar doenças gastrointestinais, uma das maiores preocupações dos países em desenvolvimento (OROPEZA et al., 2001; WHO, 1996).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) publicou em 1992 (versão revisada em 1999 e em 2003), regulamentações para o manejo do lodo de esgoto nas quais se encontra a recomendação de um teste para detectar, enumerar e determinar a viabilidade de ovos de helmintos em amostras de esgoto ou lodo de esgoto. Foi proposto o volume inicial de 1L que é submetido a passos de homogeneização com água destilada, sedimentação, retirada do sobrenadante, centrifugação (10 minutos a 1.000 x g), flutuação em solução saturada de sulfato de magnésio (gr. sp.=1,20), peneiração, ressuspensão dos sólidos em solução 0,1 N de ácido sulfúrico e contagem final das alíquotas em câmara de Sedgwick-Rafter. O teste de viabilidade proposto é a incubação do sedimento final em água destilada a 26°C durante três a quatro semanas.

No caso do México, o governo estabeleceu em 1996 a Norma Oficial Mexicana (NOM-001-ECOL, 1996) que especifica limites máximos de detecção de coliformes fecais e helmintos, entre outros parâmetros, em amostras de água e esgoto (OROPEZA et al., 2001). Em relação aos helmintos, essa norma prevê critérios para a viabilidade dos ovos, a presença ou ausência de estruturas larvais após um período de incubação de 40 dias (OROPEZA et al., 2001). O método proposto pela NOM é baseado na concentração natural por sedimentação combinado ao uso de uma solução bifásica, seguido de extração com flutuação em solução saturada (VICTORICA e GALVÁN, 2003). É indicado para ser aplicado

em lodo de esgoto, esgoto bruto e tratado, com uma eficiência de recuperação reportada de 90,0%, quando utilizadas amostras contaminadas artificialmente. A viabilidade não foi incluída na descrição inicial desse procedimento o qual foi baseado no da USEPA de 1992.

Técnicas atuais para a detecção de helmintos em amostras de esgoto e lodo de esgoto têm, tipicamente, duas etapas: concentração dos ovos e separação deles do material particulado presente na amostra e, contagem e determinação da viabilidade dos ovos por microscopia direta (NELSON e DARBY, 2001). A maioria das técnicas inclui a sedimentação, a filtração através de uma ou mais peneiras, flutuação em solução saturada e a extração para separar os ovos de outros materiais e partículas presentes na amostra para que sejam mais facilmente visualizados sob o microscópio (NELSON e DARBY, 2001).

Gaspard et al. (1997) analisaram 99 amostras de três tipos de amostras ambientais (lodo de esgoto urbano, sedimento de lagoas de sedimentação e resíduos de compostagem) para a presença de ovos de helmintos. O protocolo desse trabalho foi composto de uma etapa inicial de desagregação dos ovos de helmintos da matéria orgânica com o auxílio de reagentes químicos; a segunda etapa foi a extração dos ovos por flutuação em solução saturada de sulfato de zinco e, finalmente, quantificação em câmara de Sedwig Rafter. Das amostras analisadas, 25,0% estavam positivas para *Ascaris* e 43,0%, para *Toxocara*. Os resultados ainda indicaram uma concentração de 130 ovos por 100g de matéria seca, de uma maneira geral para os três tipos de amostras analisadas.

Gaspard e Schwartzbrod (2003) verificaram a distribuição dos ovos de helmintos em amostras de lodo que receberam diferentes tipos de tratamento

antes da disposição em solo destinados à agricultura. Os autores realizaram o estudo em duas Estações de Tratamento de Esgoto. Primeiramente, observaram o lodo que passou por tratamento biológico (digestão anaeróbica e aeração prolongada) e, posteriormente, avaliaram a etapa de desidratação do lodo (centrifugação e filtração). O método utilizado para a análise da presença dos ovos foi o de flutuação em sulfato de zinco com gravidade específica de 1,3 ao invés de 1,2 como proposto pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. As concentrações dos ovos de helmintos foram avaliadas em curtos períodos de tempo (entre 5 minutos e 7 horas) e para períodos maiores que 24 horas (de 7 a 28 dias). Os resultados desse estudo mostraram que houve maior homogeneidade em períodos menores que 7 horas. Nas amostras colhidas no período de 24 horas, o fluxo dos parasitos foi estável. Os autores concluíram o trabalho com a recomendação de que a colheita das amostras seja feita com uma freqüência de 3 a 6 meses, adaptando-se as características dos métodos de amostragem às características de cada estação de tratamento.

Victorica e Galván (2003) compararam dois métodos quantitativos para a presença de ovos de helmintos juntamente com técnicas de detecção de atividade fisiológica ou viabilidade em amostras de esgoto bruto e tratado. Essas duas técnicas propostas também foram comparadas com a da Norma Oficial Mexicana (NOM, 1996). A primeira metodologia foi baseada em uma etapa de concentração seguida de recuperação com flutuação em solução saturada de sulfato de zinco ($d=1,2$) ou sulfato de magnésio. A etapa final foi composta por uma concentração e filtração em membrana (8 μm de poro); os ovos concentrados foram corados com corantes vitais. Esse método foi aplicado para amostras de esgoto bruto e a

eficiência de recuperação foi de 54,0%. A segunda metodologia foi baseada em uma etapa de concentração usando membrana filtrante seguida de fase de recuperação por flutuação em solução saturada e, finalmente, concentração em membrana filtrante novamente e coloração com corante vital. Esse procedimento foi aplicado para esgoto tratado e a eficiência de recuperação foi de 77,0% com limite de detecção de 1 ovo/L. Quando utilizado o método da NOM (1996), a eficiência de recuperação foi de 90,0% tanto para amostras de esgoto bruto, quanto para tratado. Os autores ressaltam apenas o longo tempo para realizar o método, quando comparado aos outros propostos no mesmo estudo e a grande manipulação da amostra, que deve ser cuidadosa para evitar perdas.

Os métodos apresentados, de uma maneira geral, combinam etapas de desagregação dos ovos das partículas presentes na amostra e, posteriormente, a recuperação dos mesmos mediante centrifugo-concentração e flutuação em solução saturada, apresentando eficiências de recuperação de até 90,0%. Os procedimentos já regulamentados por agências ambientais, como o da USEPA nos Estados Unidos e a Norma Oficial Mexicana, demonstram que é possível a implantação desses na rotina diária de estações de tratamento para o acompanhamento da qualidade dos afluentes e efluentes.

2.5.3.1. O uso de corantes vitais na determinação da viabilidade de ovos de helmintos

Segundo Victorica e Galván (2003), a avaliação da viabilidade de ovos de helmintos *in vitro* apresenta desvantagens como o longo tempo necessário para a sua verificação, o que pode limitar a implantação do procedimento na rotina de

estações de tratamento. A regulamentação da USEPA não prevê a verificação da viabilidade de ovos de helmintos mediante o uso de corantes vitais, assim como o procedimento da Norma Oficial Mexicana (1996).

Estudos têm descrito o uso de corantes vitais para a determinação da viabilidade uma vez que são baseados nas mudanças de permeabilidade sofridas pelas camadas do ovo, considerando-se que ovos viáveis são impermeáveis a determinados tipos de corantes vitais e os não viáveis, apresentam permeabilidade (VICTORICA e GALVÁN, 2003).

Victorica e Galván (2003) avaliaram oito corantes vitais para determinar o potencial infectante de ovos de *Ascaris*: Azul Trypan, vermelho do Congo, Eosina Y, Hematoxilina, Verde Metila, Safranina O, Azul de Metileno e I-KI (Iodo – Iodeto de potássio; controle negativo uma vez que não é corante vital). As análises estatísticas demonstraram que o Azul Trypan foi o melhor entre os corantes usados por ter originado resultados mais claros e uniformes, inclusive em relação ao controle (feito com a incubação dos ovos a 25°C com agitação intermitente). Os autores sugerem que o procedimento com uso do corante vital é igualmente confiável ao *in vitro* convencional na determinação da viabilidade dos ovos de *Ascaris*, entretanto, segundo Altman et al. (1993), em estudo realizado tendo por modelo células de mamíferos e o corante vital Azul Trypan, existe a necessidade de que o exame microscópico seja feito prontamente ao final do procedimento, em um período máximo de 3 a 5 minutos, para que não sejam produzidos resultados com superestimação ou subestimação da viabilidade das células observadas.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

Objetivo geral:

- Verificar a ocorrência de cistos de *Giardia* spp., de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de ovos de helmintos da família Ascarididae em amostras de lodo de esgoto, provenientes da Estação de Tratamento de Esgoto (E.T.E.) Samambaia, Campinas, S.P.

Objetivos específicos:

- Investigar a aplicabilidade das metodologias de concentração de cistos e oocistos, às amostras de lodo de esgoto, dispostas em leiras.
- Confirmar se existe correlação entre a eventual presença de cistos de *Giardia*, oocistos de *Cryptosporidium* e de ovos de *Ascaris* nas amostras de lodo de esgoto.
- Verificar se os cistos de *Giardia*, eventualmente presentes no lodo, apresentavam danos morfológicos após 45 dias e 90 dias de tratamento (exposição à luz solar) mediante visualização por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Efetuar a investigação da viabilidade dos ovos de *Ascaris* sp. presentes nas amostras, mediante o uso do corante vital Azul Trypan.

4. JUSTIFICATIVA

No Brasil, existe uma disparidade acentuada entre a distribuição da população e o desenvolvimento das várias unidades federativas (IBGE, 2000). Entretanto, com o crescimento e expansão dos grandes centros urbanos e o desenvolvimento de regiões como o Nordeste, combinados com uma maior conscientização sobre a preservação ambiental, torna-se possível prever um aumento considerável, nos próximos anos, de novas estações de tratamento de esgoto (E.T.Es) e, como consequência, na produção de lodo de esgoto.

O volume diário do lodo de esgoto excedente gerado pelas E.T.Es constitui, um grave problema em relação à sua disposição. Como exemplo, tem-se a E.T.E. Samambaia (Campinas, S.P.) com um volume gerado diário de cinco toneladas de lodo de esgoto que é levado até a Companhia de Saneamento de Jundiaí (C.S.J.) onde passa por um processo de desinfecção por meio da irradiação solar durante noventa dias (sistema de leiras revolvidas). A C.S.J., por sua vez, tem uma produção de 200 toneladas de lodo de esgoto diária que também passam pelo mesmo tipo de tratamento de desinfecção.

Esse resíduo excedente necessita de um destino adequado principalmente para que os mananciais de água não sejam contaminados e a saúde ambiental seja preservada. A alternativa de disposição em solos utilizados para a agricultura tem-se mostrado a opção mais econômica. Entretanto, torna-se necessário do ponto de vista da Saúde Pública, avaliar o risco da aplicação desse resíduo na agricultura. Para isto, faz-se necessária uma metodologia, com o menor custo possível, eficiente e que possa ser facilmente reproduzida de modo a permitir que a detecção de organismos como *Giardia* e *Cryptosporidium* seja realizada de uma

maneira adequada pelas próprias estações de tratamento de esgoto. Segundo Gerba e Smith (2005), é essencial que os métodos para a análise de organismos de interesse em Saúde Pública sejam padronizados e validados o mais rápido possível.

A alta taxa de sobrevivência desses patógenos, a ubiquidade em amostras de esgoto e a alta prevalência são fatores que ressaltam a importância do estudo sobre a ocorrência de ovos de *Ascaris* sp. em amostras de lodo de esgoto (CAMPOS et al., 2002). Outro ponto que deve ser elucidado é o papel do *Ascaris* sp. como um possível organismo indicador para a presença de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* devido à maior facilidade de verificação de ovos em relação aos cistos e oocistos e sua resistência ambiental.

A avaliação de riscos associados à aplicação do lodo de esgoto, em solos destinados à agricultura, é baseada em estudos em escala experimental, onde as condições podem ser controladas e recebem influência da falta de casos documentados de doenças relacionadas à aplicação, especialmente nos trabalhadores das E.T.Es (O'CONNOR, et al., 2005). Os resultados desses estudos controlados com frequência não podem ser extrapolados para as condições reais. Assim, esforços devem ser direcionados para o desempenho de estudos em escala real, o que foi recomendado pela USEPA (2003) como uma necessidade atual (O'CONNOR, et al., 2005).

Os controles impostos para a prática da aplicação do lodo de esgoto geralmente têm o objetivo de proteger a saúde pública e o ambiente, mas deve-se levar em conta fatores como a disponibilidade de tecnologias de controle, a

relação custo-eficácia, aceitação pública, assim como as realidades políticas (O'CONNOR, et al., 2005).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local de coleta

As amostras de lodo de esgoto foram colhidas na empresa Operсан, em Jundiaí, S.P. Essa empresa trata o lodo de esgoto gerado pela Companhia de Saneamento de Jundiaí (C.S.J.) e de duas Estações de Tratamento de Esgoto (E.T.E.) de Campinas: a Samambaia e a Santa Rosa.

A C.S.J. é responsável pelo tratamento de todo o esgoto doméstico e industrial da cidade de Jundiaí, com aproximadamente 350 mil habitantes e produz cerca de 200 toneladas de lodo de esgoto por dia.

No trabalho, foram colhidas somente amostras advindas da E.T.E. Samambaia, pois havia sido verificada a ocorrência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de lodo ativado em estudo realizado anteriormente por Bonatti e Franco (2003). A E.T.E. Samambaia está situada no bairro Tamoios, na região leste de Campinas, divisa com o município de Valinhos. A vazão média da estação é cerca de 98 L/s, sendo responsável pelo tratamento do esgoto doméstico de aproximadamente 40.000 pessoas (SANASA, 2003). O processo de tratamento utilizado é o de lodos ativados e o efluente final é liberado no Córrego Samambaia que, juntamente com o Ribeirão Pinheiro (Valinhos), desembocam no Rio Atibaia. A descarga desse efluente ocorre 2.000 metros a montante do ponto de captação de água do Rio Atibaia para a cidade de Campinas, outro fato que justifica a escolha de se estudar o lodo originário dessa estação de tratamento.

O lodo da E.T.E. Samambaia é transportado até a Operсан e disposto em leiras (camadas de lodo de esgoto dispostas com uma base de aproximadamente

4m e altura de 1,5m com comprimento variável) e fica exposto à incidência de luz solar por 90 dias aproximadamente (TSUTIYA et al., 2001). Durante a primeira semana, não há revolvimento da leira devido à alta densidade do material; após esse período, até ao final dos 90 dias, o lodo é revolvido três vezes por semana para que todas as camadas sejam igualmente expostas à luz. Nesse estudo, as leiras analisadas foram dispostas em áreas descobertas, sendo que a convecção do ar foi feita de modo natural.

As Figuras 1 e 2 mostram o aspecto da leira quando de sua disposição no solo e após 90 dias de exposição à luz solar. É possível observar o aspecto úmido do lodo de esgoto no início do tratamento, contrário ao observado no final do processo, quando o resíduo está pronto para a disposição em solos destinados à agricultura.



Figura 1. Leira no início da exposição ao sol.



Figura 2. Leira ao final do período de 90 dias de exposição ao sol.

As coletas das amostras de lodo de esgoto foram realizadas de modo a se obter uma amostra composta. Assim, foi colhida uma porção da parte superior, uma da mediana e uma da parte inferior da leira, até ser atingida a massa de 500g. As amostras foram colhidas dos dois extremos e do meio da leira.

5.2. Periodicidade

As amostras de lodo de esgoto foram colhidas em três tempos distintos: a primeira, no dia da disposição do lodo na leira (t_0), a segunda, após 45 dias de exposição ao sol (t_{45}) e a terceira, após 90 dias (t_{90}). No período de 12 meses, quatro leiras foram monitoradas, consecutivamente, totalizando 12 amostras, sendo que, em cada uma, foi feito um teste visando avaliar a sensibilidade da metodologia em questão (Controle Positivo – item 5.7).

Concomitantemente à coleta de cada amostra foi realizado o controle positivo, ou seja, o processamento de uma amostra contaminada artificialmente com uma quantidade conhecida de cistos e oocistos. O cronograma das coletas foi realizado conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Cronograma das coletas de amostras de lodo de esgoto durante 90 dias e pareamento com as amostras artificialmente contaminadas.

| | Momento da colheita da amostra | | |
|--|--------------------------------|----------|----------|
| | t_0 | t_{45} | t_{90} |
| Leira 1 (Janeiro a Abril/ 2005) | AB | AB | AB |
| | AC | AC | AC |
| Leira 2 (Abril a Julho/ 2005) | AB | AB | AB |
| | AC | AC | AC |
| Leira 3 (Julho a Outubro/ 2005) | AB | AB | AB |
| | AC | AC | AC |
| Leira 4 (Outubro/2005 a Janeiro/2006) | AB | AB | AB |
| | AC | AC | AC |

t_0 – Coleta da amostra no momento da disposição do lodo na leira;
 t_{45} – Coleta da amostra após 45 dias da disposição do lodo na leira;
 t_{90} – Coleta da amostra após 90 dias da disposição do lodo na leira;
 AB – Amostra bruta;
 AC – Amostra contaminada artificialmente.

5.3. Obtenção das amostras

As amostras foram colhidas em frascos plásticos com o auxílio de uma pá de jardim. Ambos foram previamente descontaminados e lavados com solução de eluição contendo Tween 80 a 0,01% em água destilada e TRIS 50 mM (Tris hidróxi metilaminometano ou 2-amina 2-hidroximetil 1,3-propanodiol). Em seguida,

as amostras foram levadas ao laboratório em recipiente com temperatura de 4°C. A massa de lodo de esgoto colhida foi de aproximadamente 500 g.

5.4. Análise Parasitológica

Cada amostra foi separada em duas alíquotas sendo uma delas submetida à avaliação dos cistos e oocistos eventuais e naturalmente presentes e, a outra, contaminada artificialmente (Controle Positivo - item 5.7). Elas foram processadas simultaneamente com os seguintes procedimentos:

5.4.1. Procedimento 1: Homogeneização da amostra de lodo de esgoto com solução de eluição.

Esse procedimento foi realizado de acordo com Redlinger et al. (2002) com modificação em relação à solução de eluição na qual se acrescentou o TRIS, um sal que auxilia a dispersão das partículas da amostra (UDEH, 2003):

Após homogeneização, uma alíquota de 11 g da amostra de lodo de esgoto foi colocada em um becker previamente descontaminado com solução de eluição. Em seguida, foram adicionados 99 mL de Tween 80 a 0,01% em água destilada e Tris 50 mM e, a seguir, procedeu-se à agitação manual vigorosa com bastão de vidro durante 2 minutos. Após esse passo, uma alíquota de 5 µL da solução resultante foi analisada pela reação de imunofluorescência direta (IFA).

5.4.2. Procedimento 2: Centrifugo – concentração seguida de clarificação com éter.

Esse procedimento foi realizado de acordo com Davies et al. (2003) com modificações. Neste protocolo, uma alíquota de 0,3g da amostra foi submetida ao processo de centrifugação com solução de eluição. Em um tubo de centrifuga de 15 ml, foram colocados 0,3g da amostra, completados com 5 ml de solução de eluição (Tween 80 – 0,01%, diluição 1:3 e Tris 50 mM) e agitado em vórtex (Marca Phoenix® Modelo AP 56) durante dois minutos. Em seguida, o conteúdo do tubo foi peneirado em tela plástica de 1mm² de poro e o volume resultante colocado em um tubo limpo. Este foi completado até 15 mL com solução de eluição e centrifugado a 1610 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado até o volume de 5mL e o sedimento, ressuspensão em vórtex durante dois minutos. O volume do tubo foi completado com solução de eluição e novamente centrifugado a 1610 x g durante 10 minutos. Ao sedimento resultante, foram adicionados 5 mL de éter previamente refrigerado. Em seguida, o tubo foi tampado com rolha plástica e agitado vigorosa e manualmente por 30 segundos. Após esse passo, o volume do tubo foi completado com água destilada e novamente centrifugado a 1610 x g. O sedimento final foi ressuspensão até 1 mL com água destilada em vórtex e, transferido para um tubo de microcentrifugação. Posteriormente, uma alíquota de 5 µL desse sedimento foi analisada por reação de imunofluorescência direta após homogeneização em agitador de tubos, durante dois minutos.

A partir da terceira amostra da segunda leira, o sedimento final desse procedimento passou a ser diluído em água MilliQ (1:1) com o objetivo de facilitar a visualização e enumeração dos cistos e oocistos. O cálculo final de (oo)cistos

por grama e da eficiência de recuperação foram corrigidos de acordo com o fator de diluição (Quantificação de cistos e oocistos nas amostras- item 5.6).

5.5. Enumeração e visualização de cistos e oocistos

Para todos os procedimentos empregados, alíquotas de 5 μ l do sedimento final de cada uma das técnicas em questão foram colocadas em lâminas de reação de imunofluorescência direta (RID); após secagem em temperatura ambiente, foram fixadas com metanol (5 min.), para a realização de Reação de Imunofluorescência Direta (IFA). O kit utilizado foi o da *Merifluor (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio)*, validado pela E.P.A. (Environmental Protection Agency, U.S.A.) para análises ambientais. O microscópio de imunofluorescência utilizado possui um filtro de excitação 450-490 nm e um filtro barreira de 520 nm.

A enumeração de cistos e oocistos foi feita nos poços das lâminas de imunofluorescência para os dois procedimentos empregados na purificação da amostras de lodo de esgoto.

Os critérios de positividade considerados para as amostra foram: o tamanho e o formato similares aos cistos (8 – 14 μ m) e oocistos (4 – 6 μ m) presentes na amostra controle; a presença de sutura nos oocistos; axonemas nos cistos, núcleos em ambos e o grau e intensidade de fluorescência (tonalidade verde - maça brilhante) predominante na parede de cistos e oocistos, como descrito por Rose et al. (1989).

Considerando a dificuldade encontrada durante a execução do projeto de Iniciação Científica apoiado pela FAPESP (BONATTI e FRANCO, 2003), previamente ao início desse estudo, estipulou-se que no caso das amostras de lodo de esgoto onde houvesse dúvida durante a leitura por epifluorescência, essa seria submetida à confirmação com o emprego do kit Cellabs (Crypto/Giardia-Cel I. F. Test, PTY LTD, Austrália). Entretanto, devido ao alto custo desse material, optou-se por não usá-lo em todas as amostras processadas.

Da mesma maneira realizada com o kit Merifluor, alíquotas de 5 μ l dos sedimentos finais foram analisadas mediante o uso de kit Cellabs de imunofluorescência. Essa decisão foi fundamentada no trabalho de Santos et al. (2004) que compararam o uso do kit Cellabs com o Merifluor e concluíram que "embora não tenha sido verificada diferença estatística significativa na visualização dos resultados, a fluorescência para *Cryptosporidium* foi melhor quando utilizado o kit Cellabs".

5.6. Quantificação de cistos e oocistos nas amostras

Para o cálculo do número de cistos e oocistos por grama foi considerado o número de oocistos visualizados no poço da lâmina de imunofluorescência, a massa de amostra utilizada para a realização de cada procedimento e o volume de sedimento colocado no poço da lâmina (μ L). Foi utilizada a seguinte equação:

$$X = \frac{n}{KxA \times 10^{-3}} \quad (a)$$

X = concentração de cistos ou oocistos/g

n = número de cistos ou oocistos visualizados

K = 5 (volume de sedimento examinado = 5 µL)

A = massa usada de amostra (0,3 g)

10^{-3} = fator de correção para 1 mL (volume do sedimento final obtido)

5.7. Amostras artificialmente contaminadas (Controle positivo)

Paralelamente às amostras brutas processadas, alíquotas do lodo de esgoto foram artificialmente contaminadas, em volumes similares aos examinados neste estudo, a partir de suspensões purificadas contendo uma quantidade conhecida de cistos e oocistos e, em seguida, submetidas aos mesmos procedimentos apresentados anteriormente (item 5.4 - Análise Parasitológica).

Para determinar a densidade de cistos e oocistos a ser utilizada nos experimentos-controle positivo, foi realizada a enumeração prévia de cistos e oocistos diretamente no poço da lâmina de imunofluorescência e posterior diluição em 1mL de PBS estéril a partir da suspensão "controle positivo" do kit *Merifluor* contendo cistos e oocistos em solução de formalina 10%. Esta enumeração foi feita por dois observadores, de maneira independente, sem que tivessem conhecimento prévio do valor obtido, nos poços da lâmina de imunofluorescência, para o experimento de contaminação artificial. Foi levado em consideração o valor médio das leituras. A concentração média dos inóculos a serem usados nas

amostras artificialmente contaminadas seguiu um padrão pré-determinado de ordem de grandeza: 10^4 para cistos e 10^3 para oocistos.

A eficiência de recuperação (Y) de cistos e oocistos foi calculada da seguinte maneira:

$$Y = \frac{r \times 100}{i} \quad (b)$$

Y = eficiência de recuperação (%)

r = número de cistos ou oocistos recuperados (debitado o número de cistos e oocistos encontrados nas amostras brutas).

i = número total de cistos ou oocistos esperados em 5 μ L

5.8. Avaliação de danos morfológicos mediante emprego de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os sedimentos finais das amostras da última leira analisada, processadas pelo procedimento 2, foram, posteriormente, centrifugados e acondicionados em glutaraldeído 2,5% para visualização mediante microscopia eletrônica de varredura, com a finalidade de avaliar a possível ocorrência de dano morfológico aos parasitos devido à exposição solar em função da disposição em leiras.

5.8.1. Amostras contaminadas artificialmente (Controle positivo)

Com a finalidade de fazer comparações morfológicas e de efetuar a avaliação de dano aos parasitos, realizaram-se ensaios empregando a

contaminação artificial de amostras de esgoto com cistos de *Giardia* recentemente armazenados e purificados (controle-positivo) no Laboratório de Protozoologia, Departamento de Parasitologia, UNICAMP. Para tanto, os cistos purificados foram inoculados em amostras de efluente de esgoto de origem hospitalar (Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas) nas quais se comprovou a ausência para *Giardia* mediante teste de imunofluorescência direta no qual foram visualizados os três poços da lâmina e, posteriormente, realizada a média aritmética de tal visualização. Os cistos ficaram em contato com a amostra durante 24 horas após a contaminação da mesma. Ao final desse período, foi efetuado o procedimento de centrifugo – concentração (1500 x g; 15 minutos) seguida de clarificação em éter. O sedimento final foi ressuspenso em água destilada e colocado em tubo de microcentrifugação. Em seguida, foi centrifugado (1500 x g; 15 minutos), o sobrenadante desprezado, e volume do tubo, completado com glutaraldeído a 2,5% e, posteriormente submetido à microscopia eletrônica de varredura, conforme descrito em item posterior (5.8.3).

5.8.2. Purificação de cistos de *Giardia*

Esse procedimento foi realizado de acordo com Smith e Smith (1989), mas introduzindo-se modificações nos volumes que compõem o gradiente de sacarose. Fezes humanas previamente determinadas positivas foram diluídas em água destilada em uma proporção de 1:10. Em seguida, a solução foi peneirada em malha com poro de 50 µm e posteriormente lavada com Tween 20 na concentração de 0,2% w/v. A suspensão fecal peneirada e lavada (2 mL) foi então

misturada cuidadosamente com gradiente de sacarose nas seguintes proporções: 2 ml de solução de sacarose a 1,02 g/mL; 5 ml a 1,06 g/mL e 2 ml de 1,18 g/mL. Em seguida, procedeu-se à centrifugação a 400 x g durante 10 minutos. A porção central resultante da centrifugação (na densidade de 1,06 g/mL) foi removida e diluída uma vez em água destilada. Novamente, a solução foi submetida à centrifugação (400 x g durante 10 minutos).

Finalmente, foram procedidas três lavagens em solução tampão fosfato estéril e, a suspensão final foi armazenada a 4°C com antibióticos (Gentamicina 0,1mg/ml; Streptomicina 0,1mg/ml; Penicilina 100U/ml e antifúngico fungizona 0,5 mg/mL), conforme protocolo descrito por Smith e Smith (1989).

5.8.3. Procedimento para visualização por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Esse procedimento foi realizado segundo Widmer et al. (2002). Foram preparadas laminulas com o polímero poli-L-lisina que auxilia na adesão das amostras à placa. A poli-L-lisina foi deixada em contato com a laminula durante 1 hora antes do início do procedimento.

Uma alíquota de 10 µL da amostra pré-fixada em glutaraldeído 2,5% (colocada na laminula) foi lavada em solução tampão fosfato (PBS estéril) por três vezes durante 10 minutos, em uma placa de relógio.

Em seguida, foi feita pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% (OsO_4) por uma hora, em temperatura ambiente, protegido da luz e em capela. Após esse período, a alíquota foi lavada em solução tampão fosfato por cerca de 10 minutos.

A etapa seguinte foi a desidratação em série de etanol em concentrações crescentes: 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, este último, realizado três vezes. Cada etapa durou 10 minutos. A alíquota foi acondicionada em câmara de ponto crítico com dióxido de carbono e posteriormente colocada no suporte porta amostra ("Stub") com cola grafite e finalmente coberta com uma camada fina de ouro. Em seguida, os "stubs" foram levados ao microscópio eletrônico de varredura do Departamento de Biologia Celular da Unicamp, para análise microscópica.

5.9. Outros métodos

5.9.1. Detecção de ovos de *Ascaris* e de outros helmintos

Em relação à detecção dos ovos de *Ascaris*, foi realizado o procedimento descrito na Norma Oficial Mexicana (NOM) de 1996, com modificações, nos volumes e massas iniciais, conforme esquematizado (Figura 3):

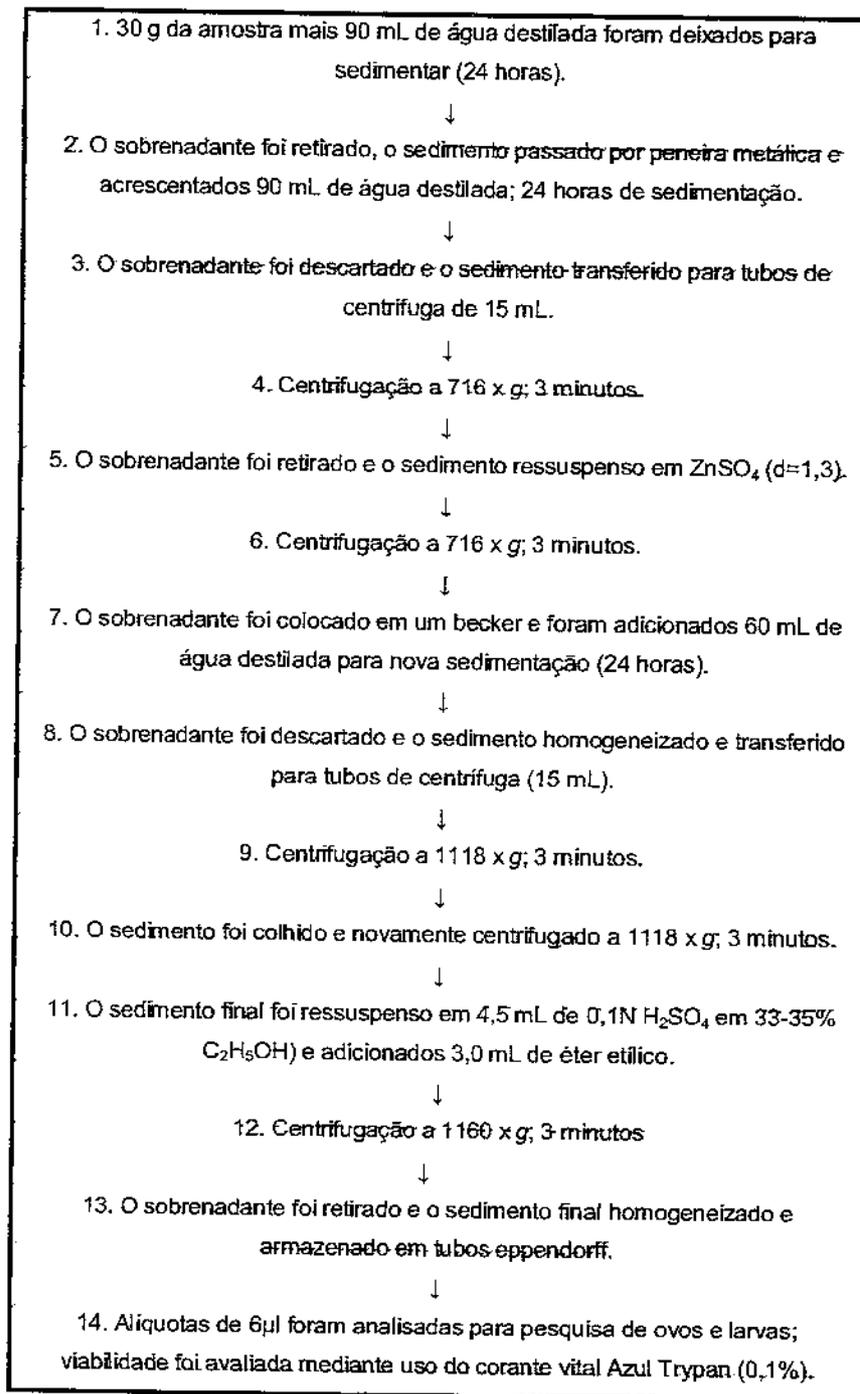


Figura 3. Adaptação da Norma Oficial Mexicana (NOM-001-ECOL-1996) para a análise quantitativa de ovos de helmintos em lodo de esgoto.

5.9.2. Viabilidade dos ovos de helmintos

A viabilidade dos ovos de helmintos foi avaliada mediante emprego de corante vital (Azul Trypan), segundo Victorica e Galván (2003). Uma alíquota de 6 μ L do sedimento final do procedimento descrito no item anterior (5.9.1) foi colocada em uma lâmina juntamente com 6 μ L do corante vital Azul Trypan a 0,1%. O critério utilizado para ovos viáveis foi "a não inclusão do corante vital"; os ovos considerados não viáveis foram aqueles nos quais houve a incorporação do corante vital. A visualização das lâminas foi feita entre 3 e 5 minutos após a confecção da preparação, segundo Altman et al. (1993).

5.9.3. Determinação dos valores de pH

Para a medida do pH, retirou-se 10g da amostra de lodo de esgoto e adicionou-se 40mL de água Milli Q. Essa suspensão foi homogeneizada com o auxílio de um imã no agitador durante 15 minutos e, em seguida, o pH foi medido com auxílio de um peagômetro (Modelo Q-400A, Quimis) previamente calibrado (CANTUSIO NETO, 2005).

5.10. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi feita utilizando-se o teste *t* de Student para a comparação entre os métodos empregados na purificação das amostras com o objetivo de verificar a ocorrência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*, assim como para a comparação entre as eficiências de recuperação das técnicas utilizadas (ZAR, 1999).

Para se analisar a possível existência de correlação entre as presenças de (oo)cistos e ovos, foi utilizado o teste de correlação de Pearson com nível de significância de 5% e um posterior teste *t* de Student com o objetivo de verificar a significância do valor do coeficiente de correlação encontrado (ZAR, 1999).

6. RESULTADOS

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

No período de estudo (de janeiro de 2005 a janeiro de 2006), de um total de 12 amostras colhidas em quatro leiras, quando empregado o procedimento de homogeneização com solução de eluição (HSE), cistos de *Giardia* foram encontrados nas seguintes amostras, na leira 2 (t_0), leira 3 (t_0 e t_{45}) e leira 4 (t_{90}), totalizando 4 amostras positivas (33,3%) (Tabelas 3, 4, 5 e 6). Quando utilizado o procedimento de centrifugo-concentração seguido de clarificação com éter (CC/CE), obteve-se o seguinte resultado em relação às amostras positivas para cistos de *Giardia*: leira 2 (t_0 e t_{45}), leira 3 (t_0 e t_{45}) e leira 4 (t_{45}), em um total de 5 amostras positivas (41,6%) (Tabelas 3, 4, 5 e 6). Apesar do método empregado, cistos de *Giardia* foram encontrados em seis amostras (50,0%), em diferentes tempos de exposição à luz solar.

Quando consideradas as amostras brutas, os testes *t* de Student ($H_0: \mu_{HSE} \leq \mu_{CE}$; $H_a: \mu_{HSE} > \mu_{CE}$) realizados, indicaram para cistos de *Giardia*, que a média de recuperação no procedimento de homogeneização em solução de eluição com TRIS (HSE) foi maior comparativamente ao protocolo de clarificação com éter (CC/CE) (para $t_{0,05(1), 22} = 1,717$) (ZAR, 1999).

Para oocistos de *Cryptosporidium*, apenas a amostra relativa ao t_{45} da leira 2 foi positiva (8,3%), quando empregado o procedimento de homogeneização com solução de eluição (HSE) (Tabelas 3, 4, 5 e 6). Não foram observados oocistos mediante o emprego do procedimento de centrifugo-concentração seguido de clarificação com éter (CC/CE) (Tabelas 3, 4, 5 e 6).

Em relação à detecção de oocistos, não houve diferença significativa entre os métodos HSE e CC/CE, pois apenas uma amostra foi positiva mediante emprego do primeiro procedimento.

A concentração média de cistos por grama de lodo de esgoto para o procedimento HSE de um total de 4 amostras positivas, foi de 600 cistos/g (variou de 0 a 4800 cistos/g). Para a técnica CC/CE, a média foi de 250 cistos/g, de um total de 5 amostras positivas (variou de 0 a 600 cistos/g). No caso dos oocistos, apenas uma amostra foi positiva, com uma concentração de 600 oocistos/g mediante emprego de HSE. Para CC/CE, oocistos não foram visualizados nas diversas amostras analisadas (Tabelas 7 e 8). A segunda amostra da leira 2 teve alíquotas examinadas com o kit Cellabs devido às dúvidas que surgiram durante a visualização dos oocistos com o kit Merifluor.

Quando realizada a comparação entre os diferentes tempos de colheita das amostras, não foi possível verificar um padrão de aumento ou de diminuição da concentração de cistos de *Giardia* por grama de lodo de esgoto ao longo de período de um ano, para as quatro leiras analisadas (Tabelas 7 e 8).

6.2. Amostras artificialmente contaminadas (Controle Positivo)

Para cistos de *Giardia*, mediante emprego do método HSE, a eficiência de recuperação variou de 0 a 70,8% (média de 8,1%); quando utilizado o procedimento CC/CE, a eficiência de recuperação variou de 0 a 50,0% (média de 19,2%) (Tabelas 3, 4, 5 e 6).

Quando considerado o tempo de disposição da leira, a média de recuperação no t_0 para HSE foi de 6,8%; no t_{45} foi de 0 e no t_{90} , de 17,7%. No

caso de CC/CE, as médias da eficiência de recuperação para os respectivos tempos de coleta foram: t_0 foi de 22,3%, t_{45} foi de 21,6% e para t_{90} , de 13,6% (Tabela 9).

As eficiências de recuperação dos métodos propostos também foram comparadas por meio do teste t de Student. Para cistos de *Giardia*, o teste indicou que a média da eficiência de recuperação do procedimento de clarificação com éter (CC/CE), foi maior comparativamente ao do protocolo de homogeneização em solução de eluição com TRIS (HSE) (para $t_{0,05(1), 22} = 1,717$) (ZAR, 1999).

No caso dos oocistos de *Cryptosporidium*, mediante emprego da técnica HSE, a eficiência de recuperação variou de 0 a 9,2% (média de 1,6%); quando utilizado o procedimento CC/CE, a eficiência de recuperação variou de 0 a 26,4% (média de 4,2%) (Tabelas 3, 4, 5 e 6) (Figura 4). A média de recuperação no t_0 para HSE foi de 2,3%; no t_{45} foi de 2,3% e no t_{90} , de 0. No caso de CC/CE, as médias da eficiência de recuperação para os respectivos tempos de coleta foram: t_0 , 2,0%; t_{45} , de 10,4% e para t_{90} , de 0,6% (Tabela 10).

Para oocistos de *Cryptosporidium*, o teste também indicou que a média da eficiência de recuperação do procedimento de clarificação com éter (CC/CE), foi maior comparativamente ao do protocolo de homogeneização em solução de eluição com TRIS (HSE) (para $t_{0,05(1), 22} = 1,717$) (ZAR, 1999).

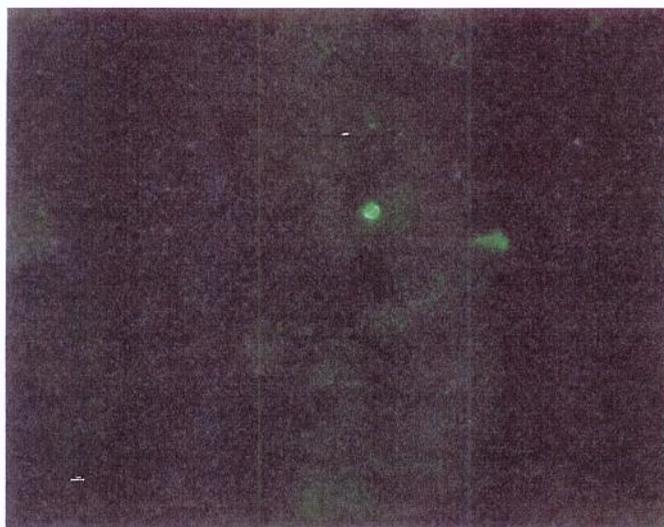


Figura 4. Oocisto de *Cryptosporidium* presente na amostra artificialmente contaminada da leira 4 (t_{90}), mediante emprego do método CC/CE e visualização por RID (400X).

6.3. Purificação de cistos de *Giardia* para semeadura em amostra de efluente hospitalar

A quantidade de cistos inoculados nas amostras destinadas ao controle da Microscopia Eletrônica de Varredura foi de $9,2 \times 10^4$ (Figura 3). Ao final do procedimento de purificação, foi observado que a maioria dos cistos presentes na suspensão purificada atendia aos critérios morfológicos requeridos (formato, cor e intensidade da fluorescência, visíveis em mais de 50% dos cistos presentes na suspensão) (Figura 5).

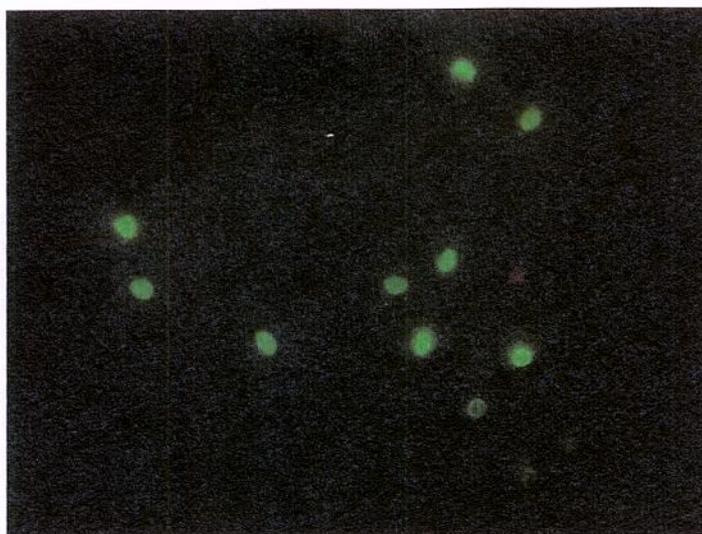


Figura 5. Cistos de *Giardia* presentes no inóculo purificado com o objetivo de contaminar artificialmente amostra de efluente hospitalar que serviu como controle para o procedimento de microscopia eletrônica de varredura. Visualização por RID (400X).

6.4. Avaliação de danos morfológicos mediante evidência direta visual com emprego de Microscopia Eletrônica de Varredura

Previamente, quando o mesmo material submetido a MEV, foi observado com microscopia de epifluorescência e reação de imunofluorescência direta, foram visualizadas alterações na fluorescência dos cistos que apresentavam uma diminuição da intensidade da fluorescência, exibindo um aspecto apagado, não brilhante.

Em relação à microscopia eletrônica de varredura realizada com as amostras da Leira 4 e tendo por referência a amostra controle (efluente hospitalar contaminada artificialmente com a suspensão purificada de cistos de *Giardia*), sugere-se que após 45 dias de exposição ao sol, os cistos ainda possam manter seu potencial infectante. Isso se deve às mínimas alterações morfológicas observadas, que se resumiram apenas à presença de alguns sulcos e

deformações na parede, não sendo observados danos como poros, vacuolização ou rompimento da integridade da parede do cisto (Figura 6 a e b).

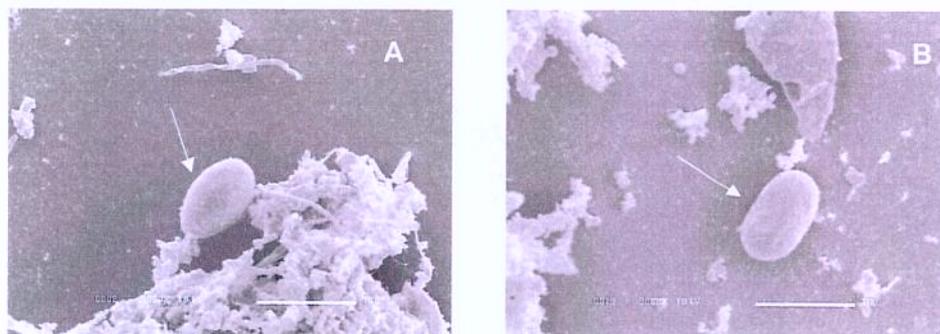


Figura 6. Cistos de *Giardia* visualizados com Microscopia Eletrônica de Varredura: **A.** amostra controle (efluente hospitalar contaminado artificialmente) (3000X). **B.** leira 4, amostra t_{45} com emprego do método CC/CE (3000X).

6.5. Outros Métodos

6.5.1. Detecção de ovos de *Ascaris* sp. e de outros helmintos

Em relação à detecção de ovos de *Ascaris* sp., duas amostras foram positivas ($n=2/12$; 16,6%), estando os ovos viáveis mediante o teste com Azul Trypan (Figura 7 a e b) (Tabela 11): leira 2 (t_{45}) e leira 3 (t_{90}). Também foi possível observar ovos de *Toxocara* em cinco amostras ($n=5/12$; 41,6%) sendo que em uma não houve incorporação do corante e, por esse motivo, os ovos foram considerados como viáveis (Figura 8 a e b); nas outras quatro amostras, os ovos incorporaram o corante, sendo, portanto, considerados não viáveis (Tabela 11).

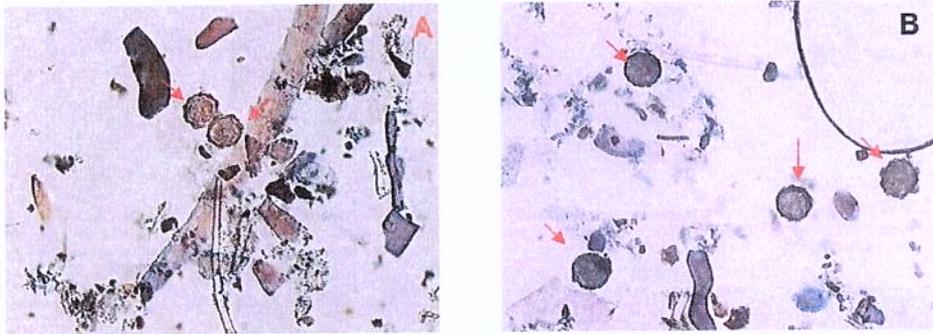


Figura 7. A. Ovos de *Ascaris* sp. viáveis encontrados na leira 4, amostra t_{90} (não incorporaram o corante vital Azul Trypan). **B.** Ovos de *Ascaris* sp. encontrados na leira 4, amostra t_{90} (incorporaram o corante vital Azul Trypan) (250X).

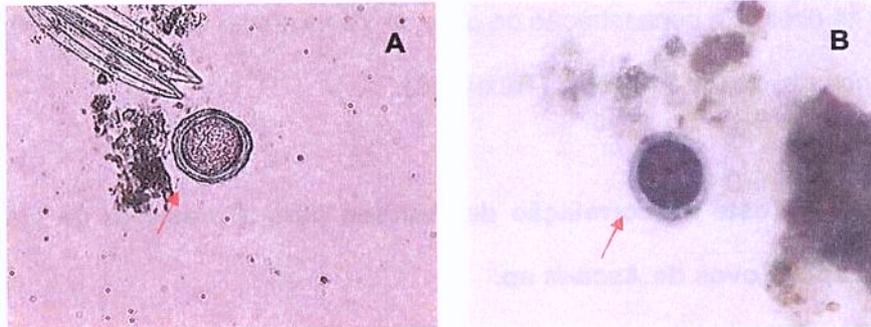


Figura 8. A e B: Ovos de *Toxocara* sp. não viáveis encontrados na leira 1, amostra t_{90} (incorporaram o corante vital Azul Trypan) (480 X).

Ovos similares à *Trichuris* foram visualizados em apenas uma amostra e não apresentaram viabilidade mediante o teste com o Azul Trypan (Figura 9). Em três amostras foi possível observar larvas ou adultos de nematódeos que não foram classificados (Tabela 11).

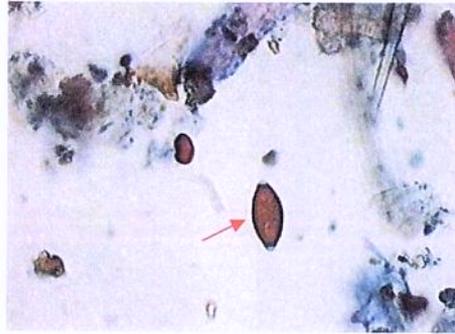


Figura 9. Ovo similar à *Trichuris* sp. não viável encontrado na leira 4, amostra t_0 (que não incorporou o corante vital Azul Trypan) (250X).

A concentração dos ovos de *Ascaris* sp. por grama de lodo de esgoto variou de 0 a 11 ovos/g; a concentração de ovos de *Toxocara* sp variou de 0 a 22 ovos/g e de *Trichuris*, de 0 a 11 ovos/g (Tabela 12).

6.5.2. Teste de correlação de Pearson para a presença de cistos de *Giardia* spp. e ovos de *Ascaris* sp.

Foi efetuado o teste de correlação de Pearson para verificar a possibilidade de existência de correlação entre a presença de ovos de *Ascaris* e de cistos de *Giardia*. O teste mostrou que há uma correlação negativa moderada ($r = -0,4$), considerando os ovos de *Ascaris* como a variável independente. O teste t de Student mostrou que tal valor não é significativo estatisticamente ($H_0: r = 0$; $H_a: r \neq 0$ para $t_{0,05(2), 22} = 2,074$) (ZAR, 1999). Não foi verificada a correlação no caso das presenças dos ovos de *Ascaris* e oocistos de *Cryptosporidium* porque no caso desse protozoário, somente uma amostra foi positiva.

6.5.3.Determinação dos valores de pH

Os valores dos pHs das amostras analisadas são mostrados na Tabela 13.

A variação foi de 5,25 a 8,44 nos diferentes tempos de amostragem das leiras.

Tabela 3. Quantidade de (oo)cistos/grama de lodo de esgoto encontrada mediante os procedimentos de Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrifugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nas amostras brutas e eficiências de recuperação dos experimentos controle (%) para as amostras da Leira 1.

| Técnica | | Amostra | | |
|-----------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | t ₀ ^a | t ₄₅ ^b | t ₉₀ ^c |
| HSE (AB) | <i>Giardia</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 0 | 0 | 0 |
| Controle (%) | <i>Giardia</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 0 | 0 | 0 |
| CC/CE (AB) | <i>Giardia</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 0 | 0 | 0 |
| Controle (%) | <i>Giardia</i> | 40,6 | 4,3 | 29,5 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 5,2 | 0,8 | 0 |

^a t₀: Amostra colhida no momento da disposição na leira (04/01/2005).

^b t₄₅: Amostra colhida após 45 dias de exposição ao sol (17/02/2005).

^c t₉₀: Amostra colhida após 90 dias de exposição ao sol (04/04/2005).

AB: Amostra bruta.

Tabela 4. Quantidade de (oo)cistos/grama de lodo de esgoto encontrada mediante os procedimentos de Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrífugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nas amostras brutas e eficiências de recuperação dos experimentos controle (%) para as amostras da **Leira 2**.

| Técnica | | Amostra | | |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | t ₀ ^a | t ₄₅ ^b | t ₉₀ ^c |
| HSE (AB) | <i>Giardia</i> | 1200 | 0 | 0 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 0 | 600 | 0 |
| Controle (%) | <i>Giardia</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 0 | 1,4 | 0 |
| CC/CE (AB) | <i>Giardia</i> | 600 | 600 | 0 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 0 | 0 | 0 |
| Controle (%) | <i>Giardia</i> | 40 | 8,5 | 9,6 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 2,9 | 26,4 | 1,8 |

^a t₀: Amostra colhida no momento da disposição na leira (09/04/2005).

^b t₄₅: Amostra colhida após 45 dias de exposição ao sol (23/05/2005).

^c t₉₀: Amostra colhida após 90 dias de exposição ao sol (05/07/2005).

AB: Amostra bruta.

Tabela 5. Quantidade de (oo)cistos/grama de lodo de esgoto encontrada mediante os procedimentos de Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrifugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nas amostras brutas e eficiências de recuperação dos experimentos controle (%) para as amostras da Leira 3.

| Técnica | | Amostra | | |
|-----------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | t ₀ ^a | t ₄₅ ^b | t ₉₀ ^c |
| HSE (AB) | <i>Giardia</i> | 600 | 4800 | 0 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 0 | 0 | 0 |
| Controle (%) | <i>Giardia</i> | 19,4 | 0 | 70,8 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 5,6 | 9,2 | 0 |
| CC/CE (AB) | <i>Giardia</i> | 600 | 600 | 0 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 0 | 0 | 0 |
| Controle (%) | <i>Giardia</i> | 4,8 | 50,0 | 7,8 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 0 | 13,8 | 0 |

^a t₀: Amostra colhida no momento da disposição na leira (19/07/2005).

^b t₄₅: Amostra colhida após 45 dias de exposição ao sol (30/08/2005).

^c t₉₀: Amostra colhida após 90 dias de exposição ao sol (11/10/2005).

AB: Amostra bruta.

Tabela 6. Quantidade de (oo)cistos/grama de lodo de esgoto encontrada mediante os procedimentos de Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrifugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nas amostras brutas e eficiências de recuperação dos experimentos controle (%) para as amostras da Leira 4.

| Técnica | | Amostra | | |
|-----------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | t ₀ ^a | t ₄₅ ^b | t ₉₀ ^c |
| HSE (AB) | <i>Giardia</i> | 0 | 0 | 600 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 0 | 0 | 0 |
| Controle (%) | <i>Giardia</i> | 7,8 | 0 | 0 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 3,9 | 0 | 0 |
| CC/CE (AB) | <i>Giardia</i> | 0 | 600 | 0 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 0 | 0 | 0 |
| Controle (%) | <i>Giardia</i> | 3,9 | 23,6 | 7,8 |
| | <i>Cryptosporidium</i> | 0 | 0,6 | 0,6 |

^a t₀: Amostra colhida no momento da disposição na leira (17/10/2005).

^b t₄₅: Amostra colhida após 45 dias de exposição ao sol (28/11/2005).

^c t₉₀: Amostra colhida após 90 dias de exposição ao sol (10/01/2006).

AB: Amostra bruta.

Tabela 7. Concentração de cistos de *Giardia* por grama de lodo de esgoto, média e desvio padrão (DP) para ambos os procedimentos utilizados para amostras brutas: Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrifugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nos diferentes tempos de coleta (t_0 , t_{45} e t_{90}).

| | | Leira 1 | Leira 2 | Leira 3 | Leira 4 | Médias | DP |
|-------|-----------------------|---------|---------|---------|---------|--------|-------|
| HSE | ^a t_0 | 0 | 1200 | 600 | 0 | 450 | 574,4 |
| | ^b t_{45} | 0 | 0 | 4800 | 0 | 1200 | 2400 |
| | ^c t_{90} | 0 | 0 | 0 | 600 | 150 | 300 |
| | Média | 0 | 400 | 1800 | 200 | 600 | |
| | DP | 0 | 692,8 | 2615,3 | 346,4 | 816,4 | |
| CC/CE | t_0 | 0 | 600 | 600 | 0 | 300 | 346,4 |
| | t_{45} | 0 | 600 | 600 | 600 | 450 | 300 |
| | t_{90} | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Média | 0 | 400 | 400 | 200 | 250 | |
| | DP | 0 | 346,4 | 346,4 | 346,4 | 308,9 | |

^a t_0 : Amostra colhida no momento da disposição na leira.

^b t_{45} : Amostra colhida após 45 dias de exposição ao sol.

^c t_{90} : Amostra colhida após 90 dias de exposição ao sol.

Tabela 8. Concentração de oocistos de *Cryptosporidium* por grama de lodo de esgoto, média e desvio padrão (DP) para ambos os procedimentos utilizados para amostras brutas: Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrifugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nos diferentes tempos de coleta (t_0 , t_{45} e t_{90}).

| | | Leira 1 | Leira 2 | Leira 3 | Leira 4 | Médias | DP |
|-------|-----------------------|---------|---------|---------|---------|--------|-----|
| HSE | ^a t_0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ^b t_{45} | 0 | 600 | 0 | 0 | 150 | 300 |
| | ^c t_{90} | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Média | 0 | 200 | 0 | 0 | 50 | |
| | DP | 0 | 346,4 | 0 | 0 | 173,2 | |
| CC/CE | t_0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | t_{45} | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | t_{90} | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Média | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | DP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

^a t_0 : Amostra colhida no momento da disposição na leira.

^b t_{45} : Amostra colhida após 45 dias de exposição ao sol.

^c t_{90} : Amostra colhida após 90 dias de exposição ao sol.

Tabela 9. Eficiências de recuperação de cistos de *Giardia*, média e desvio padrão (DP) para ambos os procedimentos utilizados nas amostras artificialmente contaminadas: Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrifugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nos diferentes tempos de coleta (t_0 , t_{45} e t_{90}).

| | | Leira 1 | Leira 2 | Leira 3 | Leira 4 | Médias | DP |
|-------|-----------------------|---------|---------|---------|---------|--------|------|
| HSE | ^a t_0 | 0 | 0 | 19,4 | 7,8 | 6,8 | 9,1 |
| | ^b t_{45} | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ^c t_{90} | 0 | 0 | 70,8 | 0 | 17,7 | 35,4 |
| | Média | 0 | 0 | 30,0 | 2,6 | 8,16 | |
| | DP | 0 | 0 | 36,5 | 4,5 | 18,5 | |
| CC/CE | t_0 | 40,6 | 40,0 | 4,8 | 3,9 | 22,3 | 20,7 |
| | t_{45} | 4,3 | 8,5 | 50,0 | 23,6 | 21,6 | 20,6 |
| | t_{90} | 29,5 | 9,6 | 7,8 | 7,8 | 13,6 | 10,5 |
| | Média | 24,8 | 19,3 | 20,8 | 11,7 | 19,2 | |
| | DP | 18,6 | 17,8 | 25,2 | 10,4 | 16,7 | |

^a t_0 : Amostra colhida no momento da disposição na leira.

^b t_{45} : Amostra colhida após 45 dias de exposição ao sol.

^c t_{90} : Amostra colhida após 90 dias de exposição ao sol.

Tabela 10. Eficiências de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium*, média e desvio padrão (DP) para ambos os procedimentos utilizados nas amostras artificialmente contaminadas: Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) e Centrifugo-Concentração seguida de Clarificação em Éter (CC/CE) nos diferentes tempos de coleta (t_0 , t_{45} e t_{90}).

| | | Leira 1 | Leira 2 | Leira 3 | Leira 4 | Médias | DP |
|-------|-----------------------|---------|---------|---------|---------|--------|------|
| HSE | ^a t_0 | 0 | 0 | 5,6 | 3,9 | 2,3 | 2,4 |
| | ^b t_{45} | 0 | 1,4 | 9,2 | 0 | 2,3 | 3,8 |
| | ^c t_{90} | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Média | 0 | 0,4 | 4,9 | 1,3 | 1,6 | |
| | DP | 0 | 0,8 | 4,6 | 2,5 | 2,7 | |
| CC/CE | t_0 | 5,2 | 2,9 | 0 | 0 | 2,0 | 2,5 |
| | t_{45} | 0,8 | 26,4 | 13,8 | 0,6 | 10,4 | 12,3 |
| | t_{90} | 0 | 1,8 | 0 | 0,6 | 0,6 | 0,8 |
| | Média | 2 | 10,3 | 4,6 | 0,4 | 4,3 | |
| | DP | 2,8 | 13,8 | 7,9 | 0,3 | 7,9 | |

^a t_0 : Amostra colhida no momento da disposição na leira.

^b t_{45} : Amostra colhida após 45 dias de exposição ao sol.

^c t_{90} : Amostra colhida após 90 dias de exposição ao sol.

Tabela 11. Ocorrência de ovos e larvas de helmintos em amostras de lodo de esgoto mediante procedimento da Norma Oficial Mexicana (NOM, 1996) empregado nas amostras das leiras e verificação da viabilidade de ovos empregando coloração por Azul Trypan.

| Leira | Amostra | Ovos | | | Larvas ou adultos de nematódeos não classificados |
|-------|------------------------------|-------------------|---------------------|----------------------|---|
| | | <i>Ascaris</i> sp | <i>Toxocara</i> spp | <i>Trichuris</i> spp | |
| 1 | ^a t ₀ | A | A | A | A |
| | ^b t ₄₅ | A | A | A | A |
| | ^c t ₉₀ | A | P■ | A | A |
| 2 | t ₀ | A | A | A | A |
| | t ₄₅ | P▲ | P■ | A | A |
| | t ₉₀ | A | P▲ | A | P■ |
| 3 | t ₀ | A | A | A | A |
| | t ₄₅ | A | A | A | A |
| | t ₉₀ | A | A | A | P■ |
| 4 | t ₀ | A | A | P■ | A |
| | t ₄₅ | A | P■ | A | A |
| | t ₉₀ | P▲ | P■ | A | P■ |

^a t₀: Amostra colhida no momento da disposição na leira.

^b t₄₅: Amostra colhida após 45 dias de exposição ao sol.

^c t₉₀: Amostra colhida após 90 dias de exposição ao sol.

A: Ausente.

P: Presente.

▲: Viável.

■: Não – viável.

Tabela 12. Concentração de ovos de helmintos por grama de lodo esgoto encontrados mediante procedimento da Norma Oficial Mexicana (NOM, 1996) e verificação da viabilidade dos ovos por coloração com Azul Trypan.

| Leira | Amostra | Ovos | | |
|-------|------------------------------|----------------|-----------------|------------------|
| | | <i>Ascaris</i> | <i>Toxocara</i> | <i>Trichuris</i> |
| 1 | ^a t ₀ | 0 | 0 | 0 |
| | ^b t ₄₅ | 0 | 0 | 0 |
| | ^c t ₉₀ | 0 | 22,2 | 0 |
| 2 | t ₀ | 0 | 0 | 0 |
| | t ₄₅ | 11,1 | 11,1 | 0 |
| | t ₉₀ | 0 | 11,1 | 0 |
| 3 | t ₀ | 0 | 0 | 0 |
| | t ₄₅ | 0 | 0 | 0 |
| | t ₉₀ | 0 | 0 | 0 |
| 4 | t ₀ | 0 | 0 | 11,1 |
| | t ₄₅ | 0 | 22,2 | 0 |
| | t ₉₀ | 11,1 | 11,1 | 0 |

^a t₀: Amostra colhida no momento da disposição na leira.

^b t₄₅: Amostra colhida após 45 dias de exposição ao sol.

^c t₉₀: Amostra colhida após 90 dias de exposição ao sol.

Tabela 13. Valores dos pH medidos para as amostras de lodo de esgoto para as três leiras.

| | Leira 1 | Leira 2 | Leira 3 | Leira 4 |
|------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| ^a t ₀ | ND | 7,92 | 8,18 | 8,14 |
| ^b t ₄₅ | ND | 7,56 | 8,44 | 7,84 |
| ^c t ₉₀ | 6,7 | 5,25 | 6,73 | 5,57 |

ND: Valor não determinado.

^a t₀: Amostra colhida no momento da disposição na leira.^b t₄₅: Amostra colhida após 45 dias de exposição ao sol.^c t₉₀: Amostra colhida após 90 dias de exposição ao sol.

7. DISCUSSÃO

7.1. Visão geral sobre o lodo de esgoto

O desenvolvimento do tratamento de esgoto foi dirigido pela necessidade de reduzir a contaminação ambiental trazida pelo despejo não controlado de dejetos humanos, animais e industriais em rios e outros corpos d'água (GODFREE e FARRELL, 2005). O principal objetivo de várias formas de tratamento foi, e ainda permanece sendo, a remoção de sólidos mais grosseiros e diminuição do efeito poluidor por meio da redução da fração orgânica assimilável do esgoto sedimentado (GODFREE e FARRELL, 2005).

Segundo Além Sobrinho (2001), considerando-se que a geração de lodo por habitante seja de 160 a 190g por dia (com 25% de sólidos), estima-se que uma cidade de 250.000 habitantes possa produzir diariamente em torno de 40 a 50 toneladas de lodo de esgoto. Dados da USEPA (1997) estimam que as mais de 16000 estações de tratamento de esgoto dos Estados Unidos tratam 150 bilhões de litros por dia. Sendo assim, o lodo de esgoto resultante do tratamento é gerado em grandes quantidades, tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento.

O destino do lodo de esgoto para uso como fertilizante na agricultura é um elemento do manejo dos recursos hídricos que constitui uma opção inovadora e alternativa (BAHRI, 1999). O'Connor et al. (2005) ressaltam que além de soluções para a disposição do lodo de esgoto, é necessário que seja garantida a sua utilização de maneira sustentável. Estudos demonstraram que tal prática aumenta a disponibilidade de nutrientes para as plantas, melhora a produtividade agrícola, porém, requer proteção para a saúde pública, animal e recursos hídricos,

desenvolvimento de tecnologias apropriadas para o tratamento do esgoto e dos resíduos gerados, manutenção da qualidade do ecossistema, além de aceitação pública (BAHRI, 1999; O'CONNOR et al., 2005).

É importante considerar que as reações dos resíduos aplicados ao solo dependem mais das características inerentes do mesmo, com suas reações biogeoquímicas básicas do que propriamente do resíduo em si (O'CONNOR et al., 2005). Por isso, é interessante ter um foco maior nestas reações fundamentais que ocorrem no solo do que nos resíduos específicos, o que pode garantir uma futura aplicação sustentável do lodo de esgoto no solo (O'CONNOR et al., 2005).

Em relação aos nutrientes presentes nesse resíduo, é importante verificar que apesar de alguns serem de muito valor para as plantas, podem ocorrer interações danosas, como, por exemplo, entre cálcio e magnésio (presentes em altas concentrações) a qual afeta a solubilidade de fósforo; altas concentrações de zinco e cobre também podem causar toxicidade para plantas e animais (O'CONNOR et al., 2005). Os metais devem constituir também uma preocupação na aplicação do lodo no solo, pois alguns podem causar diferença na solubilidade de elementos e capacidade de adsorção do solo com alteração do pH, tais como níquel, cobre, zinco, cádmio, chumbo, mercúrio, molibdênio e selênio (O'CONNOR et al., 2005).

Os compostos orgânicos são tradicionalmente os mais persistentes no ambiente e tóxicos para humanos e animais. Recentemente, sua presença tem sido investigada no lodo de esgoto devido ao risco potencial à saúde que pode causar em longo prazo, por isso, são necessários estudos para verificar a

influência de tais contaminantes no perfil geoquímico do solo (O'CONNOR et al., 2005).

Microrganismos patogênicos presentes no lodo de esgoto constituem outra preocupação com a aplicação desse resíduo em solos destinados à agricultura. Eles ganham entrada no esgoto de uma comunidade a partir de hospitais, residências, escolas, postos de saúde e são concentrados em várias ordens de grandeza no lodo de esgoto (O'CONNOR et al., 2005). Os dejetos de origem animal ou esterco podem conter microrganismos zoonóticos (aqueles que podem causar doenças tanto em animais quanto em humanos) e entram no esgoto a partir de fazendas, deposição e acúmulo das fezes de animais e descarga de abatedouros (O'CONNOR et al., 2005). Humanos podem entrar em contato com patógenos quando têm acesso direto ao lodo de esgoto ou esterco, pela ingestão de água e alimentos contaminados, por meio de indivíduos ou vetores que tenham tido contato prévio com o resíduo ou via bioaerosol originado a partir da aplicação do resíduo no solo (GERBA e SMITH, 2005).

As regulamentações da USEPA (1999) para o lodo de esgoto usado em solos destinados à agricultura ou áreas de reflorestamento incluem restrições de acesso para reduzir o potencial de exposição humana. Além disso, está regulamentada uma frequência de monitoramento para lodo de esgoto Classe A e Classe B que deve ser seguida durante o ano e depende da quantidade de lodo de esgoto aplicada no solo, sendo que o mínimo é de uma vez por ano. Existe uma tendência crescente de que o processamento do lodo seja feito para que se torne Classe A (resíduo virtualmente livre de patógenos), o que pode acarretar mudanças em muitas E.T.E.s nos Estados Unidos, como, por exemplo, a

adaptação de digestores para atingir temperatura adequada na inativação de patógenos (GODFREE e FARRELL, 2005).

No Reino Unido, a indústria de água segue as regulamentações que combinam o nível de tratamento do lodo com a cultura onde será aplicado (GODFREE e FARRELL, 2005). O Departamento de Meio Ambiente, Alimentos e Assuntos Rurais do Reino Unido pretende revisar as regulamentações e códigos de prática para levar em consideração os tipos de culturas e os níveis mínimos aceitáveis para tratamento de qualquer tipo de lodo que será aplicado àquela cultura determinada (GODFREE e FARRELL, 2005).

No Brasil, a resolução 375 do CONAMA (2006) estabelece limites mais restritivos que as normas da USEPA para substâncias inorgânicas (níquel, chumbo, zinco, cobre, bário, entre outros) e agentes patogênicos tais como os coliformes termotolerantes ($< 10^3$ NMP/g sólidos totais), ovos viáveis de helmintos ($< 0,25$ ovos/g sólidos totais), ausência de *Salmonella* (em 10g de sólidos totais) e vírus ($< 0,25$ UFP /g sólidos totais) no lodo de esgoto classe A. Para o lodo de esgoto classe B, é prevista a presença de coliformes termotolerantes (10^6 NMP/g sólidos totais) e ovos viáveis de helmintos (< 10 ovos/g sólidos totais).

Gerba e Smith (2005) ressaltam que a concentração de patógenos no esgoto e no lodo de esgoto está diretamente relacionada com a incidência de infecções entéricas dentro da comunidade. Muita atenção é dada à presença de ovos de helmintos em efluentes finais, efluentes usados para irrigação ou lodo de esgoto pelo fato de sua resistência às condições ambientais adversas, o que não tem acontecido em relação à *Giardia* e *Cryptosporidium*. Tais protozoários patogênicos também apresentam resistência às condições ambientais adversas,

assim como aos desinfetantes comumente usados durante o tratamento de água ou de esgoto, além de dose infectante muito baixa. Quintero – Betancourt et al. (2003) relataram a presença de oocistos infectantes de *Cryptosporidium* em amostras de efluente terciário tratado, fato que tem levado a uma preocupação maior para o estabelecimento de padrões para a detecção desse protozoário em águas de reuso (usadas para irrigação ou outras finalidades). Há o risco potencial de cistos e oocistos presentes no lodo atingirem os corpos d'água se o terreno onde tal resíduo for aplicado tiver um declive acentuado e corpos d'água próximos.

Não existem até o momento, nas regulamentações estabelecidas pela USEPA ou pela OMS, recomendações para a avaliação de cistos e oocistos de protozoários patogênicos em resíduos derivados do tratamento de esgoto que são aplicados em solos destinados à agricultura (GERBA e SMITH, 2005). É importante ressaltar que os indicadores bacteriológicos convencionais de qualidade da água não se correlacionam necessariamente com a presença e concentração de oocistos de *Cryptosporidium* (BONADONNA et al. 2002).

7.2. Ocorrência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* nas amostras de lodo de esgoto

Diversos trabalhos verificaram a ocorrência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de diferentes etapas do processo de tratamento de esgoto (CLANCY e MCCUIN, 2003; DIAS JÚNIOR, 1999; FARIAS et al., 2001; JOLIS et al., 1999; ROBERTSON et al., 2000; SANTOS et al., 2004). Porém, dados sobre a qualidade microbiológica do lodo de esgoto são escassos nos

países em desenvolvimento (JIMÉNEZ et al., 2002). Vários motivos contribuem para este fato, entre eles, a existência de problemas relativos à falta de uma metodologia padronizada e validada para a recuperação destes protozoários em esgoto (CLANCY e MCCUIN, 2003). Outro fator que deve ser levado em consideração é a grande variabilidade dos resultados obtidos no que concerne à concentração dessas formas de resistência (CLANCY & MCCUIN, 2003), devido às dificuldades metodológicas em função da complexidade desse tipo de amostra.

Dados de estudos conduzidos nos Estados Unidos por meio de um projeto da WERF (Water Environment Research Foundation) revelam que a presença de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de lodo de esgoto foi maior comparativamente a de ovos de *Ascaris*. Entretanto, existem poucas informações sobre a presença de tais protozoários patogênicos nesse tipo de resíduo, em nível mundial (BEAN e BRABANTS, 2006).

No Brasil, são raros os trabalhos que ressaltam a importância de uma avaliação parasitológica do lodo em relação aos protozoários patogênicos em questão, apesar do crescente interesse em relação à utilização desse resíduo em solos agrícolas. Paulino et al. (2001) verificaram a ocorrência de cistos de protozoários como *Giardia* e *Entamoeba coli*, além de ter relatado também a ocorrência de ovos de helmintos em lodo de esgoto. Iacovsky et al. (2004) verificaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de lodo de esgoto com o emprego da técnica de separação imunomagnética. Um dos motivos para essa escassez de dados pode ser o fato de que as normas validadas até agora pela CETESB e outros órgãos ambientais não endereçam a questão da importância da presença de protozoários em tal resíduo.

Outro fator que deve ser levado em consideração é que a maioria das pesquisas, em nível mundial, é conduzida em escala piloto, na qual as condições ambientais são controladas (O'CONNOR et al., 2005). Tais estudos são muito efetivos na investigação da influência de fatores individuais. Entretanto, os resultados não podem ser extrapolados para as condições reais, o que foi destacado por O'Connor et al. (2005).

O presente estudo foi conduzido em escala real com o objetivo de verificar a ocorrência de cistos, oocistos e ovos em condições ambientais naturais, tais como variações de pH, de temperatura e umidade. O'Connor et al. (2005) atentaram para a necessidade de elucidar várias questões tais como dose mínima infectante, sobrevivência em condições adversas e transporte, quando cistos e oocistos estão presentes no solo, em estudos em escala real.

Lemarchand e Lebaron (2003) relataram que 52,0% de amostras de lodo ativado de efluente foram positivas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* em estudo realizado na França, apesar do país não ter relato de surtos de criptosporidiose. Rimhanen-Finne et al. (2004) coletaram amostras de lodo de esgoto que passaram por vários tipos de tratamento antes da aplicação em solo destinado à agricultura. Das amostras que passaram apenas pelo tratamento de exposição à luz solar durante 10 semanas, 37,5 % foram positivas para oocistos e 44,0% para cistos, o que corrobora a prevalência observada no presente estudo, no caso de *Giardia* (50,0% das amostras foram positivas). No Brasil, Iacovsky et al. (2004) verificaram a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de lodo de esgoto e reportaram positividade em

74,07% das amostras com emprego de purificação com separação imunomagnética.

No caso de oocistos, a positividade de amostras nesse estudo (8,3%) foi menor do que a reportada nos estudos anteriormente citados. Essa menor ocorrência pode ser explicada por vários fatores, entre eles, a prevalência da parasitose na comunidade em questão ou pelas próprias características da matriz do lodo estudado.

É pouco provável que a presença de (oo)cistos nas amostras de lodo de esgoto seja devida à contaminação posterior por meio da deposição de fezes de outros animais, na leira, como as aves (considerando que o lodo estava exposto em área sem proteção) ou cães (muitas vezes vistos na área de disposição do lodo, durante o momento da colheita), devido à alta concentração de cistos detectados nas amostras positivas e, o volume da leira. Ressalte-se que, em trabalho anterior, conduzido na E.T.E. Santa Rosa, também foi encontrada uma alta concentração de cistos de *Giardia* em amostras de lodo ativado, de onde se origina o lodo de esgoto (Santos et al., 2004).

Outro fator que pode explicar a diferença entre os resultados obtidos quando comparados aos estudos anteriormente citados, é a grande variabilidade de técnicas empregadas e delineamentos experimentais, o que dificulta tal comparação. A diferença de localidades geográficas também deve ser levada em consideração, pois as prevalências das parasitoses diferem nas diversas comunidades.

A concentração de cistos de *Giardia* encontrada nesse estudo (0 a 4800 cistos/g, a despeito do método empregado) corrobora o que foi verificado por Hu

et al. (1996) em amostras de lodo de esgoto (500 a 7000 cistos/g) durante o processo de compostagem em estações de tratamento de esgoto da Austrália. Outros autores também verificaram altas concentrações de cistos por grama de lodo de esgoto ou em efluentes finais. Thiriat et al. (1997) verificaram variação de 900 a 8700 cistos/g de lodo de esgoto úmido, em estudo realizado na França. Lemarchand e Lebaron (2003) verificaram uma concentração de 0,4 a 209,2 oocistos/L em amostras de lodo ativado de efluente em estudo realizado na França. Jiménez et al. (2002), no México, observaram concentrações mínimas de 130 e máximas de 4200 cistos/g em amostras de lodo de esgoto. No Brasil, o estudo de Paulino et al. (2001) que verificou cistos de *Giardia lamblia* numa concentração de 14 cistos/L em amostras de lodo de esgoto colhidas em estações de tratamento de esgoto em Curitiba, Paraná.

Bonatti e Franco (2003) verificaram concentrações de *Giardia* que variaram de 0 a $4,8 \times 10^5$ cistos/L em amostras de lodo ativado proveniente da E.T.E. Samambaia; a concentração de oocistos variou de 0 a $4,0 \times 10^4$ oocistos/L. Tais resultados demonstram a grande concentração dessas formas de resistência, especialmente cistos de *Giardia*, o que pode explicar as concentrações encontradas no presente estudo uma vez que tais amostras foram advindas da mesma estação de tratamento (Anexo II).

É importante ressaltar que a concentração de tais formas de resistência no esgoto é diretamente influenciada pela prevalência das parasitoses causadas pelos protozoários patogênicos na comunidade. Entretanto, não somente por indivíduos sintomáticos, mas também por aqueles assintomáticos (ROBERTSON et al., 2006). Segundo Franco (1996), em estudo realizado com crianças de idade

entre 2 e 42 meses que freqüentavam creches na cidade de Campinas, S.P., a prevalência de *Giardia duodenalis* foi 10,09%. De acordo com Oda et al. (2005), aproximadamente 20,0% a 30,0% dos habitantes dos países em desenvolvimento na Ásia e na África estão infectados por *Giardia*.

Rimhanen-Finne et al. (2004) ressaltaram que o conhecimento sobre a presença de *Giardia* e *Cryptosporidium* em amostras de lodo de esgoto é limitado. Também enfatizaram a importância do constante revolvimento das leiras e da monitoração da temperatura com o objetivo de atingir a temperatura ideal para a inativação dos patógenos em toda a sua extensão.

Segundo Zarlenga e Trout (2004), em amostras ambientais, a presença é mais freqüentemente o fator crítico e não a infectividade uma vez que a primeira indica um risco potencial à saúde humana e é de extrema importância para a Saúde Pública. Por sua vez as condições do ambiente, como umidade, insolação, temperatura e pH podem auxiliar na inativação de cistos, oocistos e ovos expostos aos extremos dessas condições, ao longo do tempo.

Cistos são mais facilmente detectados que oocistos – isso pode ser devido ao seu maior tamanho e ao fato dos oocistos serem facilmente obscurecidos pela grande quantidade de partículas existentes em amostras de esgoto bruto, lodo ativado e lodo de esgoto (CARRARO et al., 2000).

Quando comparada a concentração de cistos ao longo do tempo, não foi possível observar um padrão de decréscimo ou aumento. Alguns fatores poderiam ter influenciado no decorrer da exposição do lodo ao sol como a perda de água do material, o aumento de resíduos mais grosseiros com o passar do tempo, e a conseqüente maior compactação das partículas da matriz. No caso deste estudo,

foram observados danos morfológicos mínimos como comprovado durante as observações realizadas quando da leitura das preparações em microscopia de fluorescência e eletrônica que, em conjunto, não revelaram alterações significativas do grau/intensidade da fluorescência ou da integridade da parede dos cistos, respectivamente.

A visualização dos cistos e oocistos mediante emprego da reação de imunofluorescência direta se constituiu numa das principais etapas do presente estudo. A técnica de coloração fluorescente utilizando anticorpos monoclonais para a marcação é uma ferramenta que confere vantagens significativas para a detecção de parasitos (ZARLENGA e TROUT, 2004) como o fato de que os anticorpos são direcionados para os antígenos superficiais da parede destes organismos. Entretanto, ainda assim persistem dificuldades decorrentes da presença de sujidades e outros organismos. Zarlenga e Trout (2004) ressaltam que os anticorpos monoclonais geralmente são preferíveis aos policlonais por reduzirem as reações cruzadas com organismos que não são alvos e por formarem complexos "parasito-anticorpo" mais estáveis e previsíveis (ZARLENGA e TROUT, 2004).

De fato, neste estudo, a leitura das preparações constituiu uma etapa trabalhosa em função da presença de grande quantidade de partículas, inerentes à matriz amostral, as quais, muitas vezes, se confundiam com cistos e oocistos pelo fato de apresentarem fluorescência e tamanho, semelhantes às formas verdadeiras. Diante desta dificuldade, optou-se, neste estudo e nos casos em que houvesse dúvida, pelo uso do kit Cellabs que segundo Santos et al. (2004), permite melhor visualização dos oocistos.

7.3. A remoção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* durante o tratamento de esgoto

De acordo com o seu destino final, o tratamento de esgoto deve reduzir o número de microrganismos a um nível aceitável o qual pode se diferenciar de acordo com o seu destino final, como, por exemplo, corpos d'água usados para abastecimento de água potável, atividades recreacionais, irrigação e aquicultura, entre outros (PAYMENT et al., 2001). Dados acumulados, ao longo dos últimos vinte anos, mostram que existem importantes riscos potenciais à saúde, relacionados com a contaminação fecal das águas que nem sempre são associados a um surto de veiculação hídrica, mas geralmente, endêmicos e por esse motivo, dificilmente detectados (PAYMENT et al., 2001).

Quantidades variáveis de oocistos são encontradas em efluentes tratados. Geralmente as estações de tratamento que utilizam filtração em areia juntamente com o processo de lodo de esgoto ativado, têm mostrado menores níveis de oocistos nos efluentes finais do que aquelas que usam apenas o tratamento por lodos ativados (BONADONNA et al. 2002).

Vários estudos reportam a redução da concentração de cistos e oocistos durante o tratamento de esgoto: Villacorta-Martinez de Maturana et al. (1992) reportaram que o tratamento com lodo de esgoto ativado (com três horas de aeração e 40 minutos de sedimentação) promoveu a remoção de 80,0% a 84,0% de oocistos. Stadterman et al. (1995) avaliaram a eficiência de remoção de oocistos em um processo contínuo de tratamento por lodo ativado também com três horas de aeração e atingiram 98,6% de remoção total.

Bukhari et al. (1997), em estudo realizado na Inglaterra, verificaram a presença de cistos numa concentração que variou de 10 a 13600 cistos/L em amostras de afluente e de 10 a 720 cistos/L em amostras de efluente. No caso da concentração de oocistos, esses autores verificaram variação de 10 a 170 oocistos/L em amostras de afluente e de 10 a 60 oocistos/L em efluente, o que mostra uma redução da concentração de tais formas de resistência ao longo do processo de tratamento. Chauret et al. (1999) verificaram redução da concentração de cistos (de $8,25 \times 10^3$ no esgoto bruto para $3,29 \times 10^2$ no efluente final) e oocistos (de $4,77 \times 10^3$ no esgoto bruto para 52 no efluente final) em uma estação de tratamento de esgoto em Ottawa, Canadá. Payment et al. (2001) reportaram a remoção de 76% dos cistos e 27% dos oocistos em estação de tratamento de esgoto em Montreal, Canadá.

A remoção de diferentes organismos patogênicos depende do tamanho, da capacidade de adsorção ou adesão, da densidade e da velocidade de sedimentação destas estruturas. Sabe-se que a taxa de sedimentação do ovo de um helminto é de cerca de 1 metro/hora, enquanto que para protozoários como a *Giardia*, essa taxa é de 1 metro/5 horas, o que permite, portanto, a presença desses em grande quantidade nos efluentes líquidos (UDEH, 2003).

O lodo de esgoto derivado do tratamento pelo sistema de lodo ativado pode, portanto, conter grande quantidade de patógenos, o que ressalta a importância de um tratamento adequado, assim como a necessidade do desenvolvimento de técnicas apropriadas para a pesquisa de patógenos como *Giardia*, *Cryptosporidium* e *Ascaris*.

7.4. Comparação entre os métodos empregados (HSE e CC/CE) e eficiências de recuperação obtidas

Nas amostras naturais, o teste *t* de Student mostrou que a média de concentração de cistos de *Giardia* para o método de homogeneização em solução de eluição (HSE) foi melhor quando comparada à média da técnica de centrífugo - concentração seguida de clarificação em éter (CC/CE). Entretanto, em relação aos resultados dos experimentos de contaminação artificial das amostras, a CC/CE apresentou melhores eficiências de recuperação quando comparadas às obtidas mediante emprego da homogeneização em solução de eluição.

Com a finalidade de explicar tais achados, é importante considerar os aspectos de cada procedimento. HSE é um método fácil, rápido de ser executado e envolve a manipulação mínima da amostra, mas resulta em maior dificuldade de detecção dos (oo)cistos devido ao grande volume formado quando da adição do lodo de esgoto com a solução de eluição. No caso de CC/CE, existem várias etapas de centrífugo-concentração e purificação, as quais podem gerar perda de organismos. Entretanto, o volume usado é menor, o que pode facilitar a concentração e detecção de tais formas de resistência, sobretudo na etapa de visualização.

Outro fator que deve ser ressaltado é a concentração média dos inóculos, estipulada em 10^4 para cistos e 10^3 para oocistos, no caso desse estudo. Este valor foi determinado em função da presença de cistos e oocistos presentes em amostras de lodo de esgoto, considerados os trabalhos anteriormente realizados.

Deve-se considerar também o limite de detecção de cada técnica. Bukhari e Smith (1995) mostraram que a purificação usando éter, ao invés de flutuação em

sacarose ou em sulfato de zinco, foi preferível nos estudos epidemiológicos quando a enumeração e infectividade de oocistos de *Cryptosporidium* foram requeridas. Robertson et al. (2000) ao estudarem técnicas baseadas em procedimentos da Parasitologia Clínica, reportaram as melhores eficiências de recuperação para a centrífugo-concentração com solução de eluição.

No caso desse estudo, os resultados discrepantes quando consideradas as amostras naturais e aquelas referentes aos experimentos-controle (artificialmente contaminadas) podem ser explicados pelo fato de que as últimas permaneciam em contato com o inóculo durante duas horas previamente ao processamento laboratorial o que pode ter acarretado a adesão dos (oo)cistos inoculados às partículas, presentes em grandes quantidades neste tipo de amostra, e sua não liberação no líquido eluente.

Massanet-Nicolau (2003) ressaltou que se o tempo de contato for prolongado entre (oo)cistos e as amostras de lodo de esgoto, pode haver uma aderência maior às partículas, resultando em menor eficiência de recuperação. Em seu estudo, as amostras ficaram em contato com o inóculo durante apenas uma hora. Medema et al. (1998) observaram que a adesão pode ocorrer rapidamente, dentro das primeiras cinco horas do experimento.

A condição do inóculo também pode ter influenciado nos resultados uma vez que os cistos e oocistos não foram submetidos ao stress ambiental como as formas verificadas nas amostras brutas. Sendo assim, suas características superficiais podem ter contribuído para que houvesse uma adesão maior às partículas, no caso do método HSE e, uma concentração mais eficiente no procedimento CC/CE.

O oocisto de *Cryptosporidium* tem baixa hidrofobicidade e essa pode ser aumentada por suspensões de alta condutividade, podendo influenciar na tendência de adesão em superfícies hidrofóbicas. Os autores também ressaltam que o entendimento do fenômeno de adsorção envolve a avaliação da hidrofobicidade e das características eletrostáticas superficiais do parasito. A hidrofobicidade é um parâmetro que, quando correlacionado com as características químicas e a estrutura do parasito, tem uma influência significativa nos mecanismos de adesão do oocisto assim como sua associação às partículas suspensas (DROZD e SCHWARTZBROD, 1996).

Dai et al. (2004) verificaram a adesão de cistos e oocistos em quatro materiais de diferentes cargas superficiais e hidrofobicidade. Em relação aos cistos, os dados do estudo sugerem que a hidrofobicidade é mais importante que a carga superficial para a adesão em superfícies sólidas. Capizzi-Banas et al. (2002) também verificaram um caráter hidrofóbico ao comparar a adesão dos cistos à partículas (microesferas) hidrofílicas e hidrofóbicas. Para oocistos, Dai-et al. (2004) reportaram que, ao contrário dos cistos, a adesão é governada principalmente pela carga superficial.

O fato de apenas uma amostra ter sido positiva para *Cryptosporidium* pode ser explicado pelas características superficiais do oocisto. Segundo Searcy et al. (2005), os oocistos são colóides biológicos esféricos com uma superfície composta de uma complexa matriz de glicoproteínas. Têm uma carga superficial negativa sob condições ambientais típicas, provavelmente devido à presença de grupos carboxilato, carboxílico e fosfato em sua superfície. Tanto as forças estéricas quanto as eletrostáticas podem ter ação na associação do oocisto com

partículas suspensas. Devido ao fato dos oocistos serem carregados negativamente, as forças eletrostáticas repulsivas aumentaram assim que a carga das partículas inorgânicas se tornou mais negativa. Isso impede a adesão dos oocistos ao sedimento e diminui a remoção desses por sedimentação (SEARCY et al., 2005).

Butkus et al. (2003) ressaltam que existem divergências em relação às características superficiais dos oocistos de *Cryptosporidium* o que pode levar à não extrapolação dos dados para a escala real. Além disso, tais autores reportaram que nem sempre a carga superficial pode ser alterada com a lavagem dos oocistos em água destilada, sugerindo que a estabilidade dos oocistos numa coluna d'água pode depender também das ligações tipo ponte de hidrogênio ou estabilização estérica.

Um método padrão para detecção dos protozoários em questão deve ser relativamente simples, robusto, reproduzível, rápido, confiável e realista (COOK et al., 2006). Os resultados do presente estudo demonstram que a reprodutibilidade das técnicas escolhidas é um ponto crítico. Cook et al. (2006) ressaltam que durante a padronização de uma técnica, é importante buscar o conhecimento das interferências que reduzem a recuperação ou que aumentem a variabilidade, com o intuito posterior de otimização. Por este motivo, no caso deste estudo, foi agregado à solução de eluição o sal TRIS.

Outros fatores que podem afetar tanto a presença de cistos e oocistos nas amostras brutas quanto às eficiências de recuperação são o pH e as forças iônicas do meio, as quais são elevadas no esgoto (DROZD e SCHWARTZBROD, 1996). Dados os primeiros resultados do experimento controle da primeira leira,

para Homogeneização em Solução de Etuição (HSE) terem sido negativos (Tabela 3), optou-se por fazer a medida do pH e, observou-se uma ampla variação em tais valores (de 5,25 até 8,44) o que também pode explicar a variabilidade dos resultados dos experimentos controle. Com base em análises multivariadas realizadas, Bonadonna et al. (2002) encontraram uma correlação significativa entre os níveis de oocistos de *Cryptosporidium* e pH: a concentração de oocistos no efluente foi maior quando registrado um pH menor. No presente estudo, oocistos foram visualizados em uma única amostra a qual apresentou pH de 5,25 (terceira amostra da segunda leira). Pode-se inferir a partir do estudo de Cook et al. (2006), realizado com hortaliças e pequenos frutos conhecidos como "berries", que as condições de recuperação de oocistos são melhores quando o pH é baixo e a composição da matriz físico-química tem grande influência nesse fato. Os autores registraram as maiores eficiências de recuperação para oocistos ($85,4 \pm 14,0$) quando o pH foi de 5,5. Cook et al. (2006) ressaltam que fatores como pH e determinados compostos influenciam a estabilidade das ligações antígeno-anticorpo: parátomos do anticorpo podem se ligar aos epítomos do oocisto com baixa afinidade em situações favoráveis como baixas turbidez e concentração de cátions divalentes, mas não conseguem manter a afinidade destas ligações em situações desfavoráveis, ou seja, quando a turbidez é alta, há grande variabilidade do pH e alta concentração de cátions divalentes (COOK et al., 2006). Os cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) também podem influenciar no valor do pH (COOK et al., 2006).

Outro fator que pode influenciar a presença de cistos e oocistos em amostras de lodo de esgoto é a coloração escura característica do lodo mesmo

antes da aplicação no solo. Johnson et al. (1997) verificaram que oocistos sobrevivem por mais tempo no escuro que na luz solar, seguido por outros organismos patogênicos como Poliovírus, *Giardia* e *Salmonella*, em ordem decrescente. Considerando que nas estações de tratamento de esgoto na região de Campinas, o lodo geralmente fica estocado por cerca de 15 dias (antes de ser destinado ao processo de tratamento para resultar no lodo de esgoto para uso agrícola), existe o risco potencial para sobrevivência de, pelo menos, uma parcela dos agentes patogênicos.

7.5. Correlação entre a presença de cistos de *Giardia*, oocistos de *Cryptosporidium* e ovos de *Ascaris* sp.

A ausência de correlação significativa entre a presença de ovos de *Ascaris* e cistos de *Giardia*, corrobora dados do estudo de Bean e Brabants (2006) que teve como objetivo, otimizar métodos para a detecção de parasitos em lodo de esgoto e verificar se *Ascaris* é um indicador apropriado da presença de outros parasitos de tal resíduo a ser aplicado no solo. A ausência de correlação significativa também foi verificada por tais autores no caso dos oocistos de *Cryptosporidium*.

No caso desse estudo, tal fato pode ser explicado pela diferença de composição das paredes das formas de resistência. Os ovos de *Ascaris* apresentam uma camada externa mucosa que permite a aderência em vários tipos de superfície. O cisto de *Giardia* apresenta duas camadas que compõem a parede, uma filamentosa (7-15nm) e uma membranosa sendo que sua porção mais exterior é composta, predominantemente, de galactosamina (CAPIZZI-

BANAS et al., 2002; ERLANDSEN et al., 1996); o oocisto de *Cryptosporidium* apresenta quitina na composição de sua parede (ZUCKERMAN et al., 2000). Essas características podem ter influenciado na hidrofobicidade e afetado a recuperação a partir da matriz do lodo de esgoto.

Outro fator que deve ser levado em consideração é a diferença em relação às condições ambientais que podem levar à inativação. Segundo Kato et al. (2004), em estudo realizado com o objetivo de verificar a inativação de oocistos de *Cryptosporidium* e ovos de *Ascaris suum*, os oocistos mostraram ser mais suscetíveis às condições ambientais adversas: 95% dos ovos estavam “viáveis” após 120 dias de incubação em solo, enquanto que, entre 60 e 120 dias, a “viabilidade” de oocistos foi de 39,4%. Tais autores destacam que o maior nível de sobrevivência de ovos no solo ressalta a necessidade da desinfecção do lodo de esgoto antes da aplicação no solo.

A sedimentação também pode ser determinante para a inativação dessas formas de resistência. Para o ovo de um helminto é de cerca de 1 metro/hora; para protozoários como a *Giardia*, de 1 metro/5 horas (UDEH, 2003) e também o maior tamanho do ovo em relação aos (oo)cistos, o que facilita a visualização, especialmente nas amostras de lodo de esgoto.

7.6. Fatores que influenciam na inativação de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*

A temperatura é considerada um parâmetro importante na inativação de patógenos (CHRISTENSEN et al., 2002). Fayer (1994) verificou o efeito de altas temperaturas na infectividade de oocistos em água e relatou que a perda dessa

ocorre quando a água contaminada alcança 72,4°C ou mais durante 1 minuto ou 62,4° C durante 2 minutos em um ciclo de calor de 5 minutos. O fato de que no caso das leiras estudadas, o revolvimento somente foi feito a partir da segunda semana de disposição no solo e, a partir daí, com uma periodicidade de 2 a 3 dias, pode explicar as poucas alterações morfológicas documentadas nas preparações por M.E., ou seja, a relação tempo/temperatura no interior das leiras não tenha sido adequada para a inativação dos cistos. No entanto, este é um aspecto que deve ser melhor estudado.

Whitmore e Robertson (1995) reportaram que 10% dos oocistos estavam "viáveis" após 18 dias num lodo digerido anaerobicamente em temperatura mesofílica (35°C) e que os oocistos poderiam sobreviver por, pelo menos, 30 dias em lodo tratado disposto no solo. Tais resultados requerem investigações futuras sobre o risco da aplicação do lodo de esgoto contaminado com *Cryptosporidium*. Além disso, é importante ressaltar que, para uma avaliação correta da infectividade de cistos e oocistos, deve-se utilizar métodos mais precisos como o cultivo celular ou infectividade animal, ao invés do uso de corantes "vitais" que podem ser incorporados por cistos ou oocistos ditos "não viáveis", mas que tem a possibilidade de conter apenas alguns danos na parede ou camadas exteriores e não no seu material genético (CLANCY et al., 2000).

Outro fator importante é o fato de que oocistos de *Cryptosporidium* podem ter sua infectividade verificada por meio de cultivo celular e infectividade animal, enquanto que os cistos, apenas pelo segundo procedimento (CLANCY et al., 2000). Para amostras de lodo de esgoto, tal procedimento ainda não foi padronizado. Entretanto, podem existir dificuldades no tratamento da amostra

tanto para os experimentos de infectividade animal como de cultivo celular devido à grande quantidade de partículas e patógenos existentes em material oriundo de lodo de esgoto tomando necessária a sua sanitização prévia aos experimentos de infecção.

Fayer e Nerad (1996) verificaram a “viabilidade” de oocistos em baixas temperaturas: 168 horas, em 5°C e -10°C; 24 horas, em -15°C; 5 horas, em -20°C. Os autores concluíram que não se pode assumir que a água congelada esteja livre da presença de oocistos infectantes ou que eles não sobrevivam se estiverem em cubos de gelo no compartimento congelador de refrigeradores domésticos. Fujino et al. (2002) em estudo conduzido sobre o efeito do calor sobre os oocistos de *Cryptosporidium*, verificaram que eles perderam a infectividade quando aquecidos a 55°C durante 30 segundos, 60°C por 15 segundos e 70°C durante 5 segundos. Segundo Tsutya (2000), no sistema de leiras revolvidas, nos primeiros 2 a 4 dias de compostagem, a temperatura...“deve passar dos 55°C e estabilizar-se em torno de 60°C”. Essa elevação de temperatura é natural devido ao processo de biodegradação da matéria orgânica e promove uma redução dos microrganismos patogênicos presentes no lodo (TSUTYA, 2000), entretanto, a temperatura pode sofrer variações ao longo do dia, não permanecendo constante e, desta forma, cistos e oocistos podem manter a capacidade infectante.

Hamer (2003) ressalta também que, teoricamente, qualquer temperatura acima de 45 °C é descrita como termofílica em determinadas ocasiões e pode inativar os patógenos. Entretanto, somente temperaturas entre 60 °C e 72 °C podem ser consideradas potencialmente efetivas para a maioria dos patógenos, presumindo-se tempos de exposição apropriados.

Segundo Udeh et al. (2003), uma das fontes de oocistos em águas superficiais é a aplicação de lodo contaminado no solo, pois existe a possibilidade de formas infectantes sobreviverem às condições ambientais e retomarem a cadeia alimentar humana via água potável. É necessário ressaltar que o gado exposto ao solo fertilizado com lodo pode se infectar se tais formas de resistência permanecerem infectantes (UDEH et al., 2003). Estes autores mostraram que os oocistos podem sobreviver ao estresse ambiental do solo por mais de dois meses, sendo que a média de inativação é maior no período de 46 a 60 dias e sugerem também que os oocistos possam permanecer infectantes em ambientes úmidos por mais de seis meses. Segundo Oliveira (2006), o lodo de esgoto pode ser disponibilizado no solo com apenas 45 dias de exposição à luz solar, possibilitando potencial contaminação do solo, corpos d'água, animais ou seres humanos expostos ao lodo. Os resultados deste estudo empregando a MEV como ferramenta para avaliação de dano morfológico, sugerem que os cistos de *Giardia* podem manter sua capacidade infectante, mesmo após 45 dias de exposição à luz solar na leira, como evidenciado mediante mínimas alterações presentes nas estruturas examinadas. Este resultado tem sérias implicações em Saúde Pública.

No presente estudo não foi utilizado o corante vital DAPI (4,6 – diamidino – 2 – fenilindole) para a confirmação do encontro das formas de cistos e oocistos, pois, segundo Chauret et al. (1999), este proporciona o aumento da fluorescência de fundo, especialmente em amostras de lodo de esgoto, dificultando a detecção de cistos e oocistos.

7.7. Danos morfológicos visualizados em cistos de *Giardia* mediante emprego da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

No caso da MEV, os danos observados em relação à *Giardia* (encontrado em condições naturais na amostra t₄₅), sugerem que o protozoário é bastante resistente às condições ambientais adversas considerando-se que não foram observados poros ou rompimento da integridade da parede do cisto, mesmo após 45 dias de exposição da leira (Figura 4 a e b). A comprovação da infectividade poderia ser feita somente mediante teste de infectividade animal. Entretanto, devido à complexidade da amostra, a sanitização do inóculo seria uma etapa extremamente dificultosa, o que acabou levando à opção da realização da MEV.

McGuigan et al. (2006) verificaram que a desinfecção por banho solar poderia ser usada para a inativação de cistos de *Giardia muris* e oocistos de *Cryptosporidium parvum*. Os (oo)cistos foram expostos a uma simulação de irradiação solar de 830 W m⁻² em diferentes tempos de exposição numa temperatura constante de 40°C. Os testes de infectividade foram realizados com camundongos CD-1. Os cistos de *Giardia muris* perderam a capacidade infectante após 4 horas de exposição enquanto que 7,5% dos oocistos ainda apresentavam tal capacidade após seis horas em condições similares. O estudo também verificou mudanças morfológicas ocorridas em oocistos durante a exposição ao banho solar e mostrou a deterioração da parede após 10 horas com o uso de MEV. Os autores chamam a atenção para o fato de que, em muitas partes do mundo, não é realista a condição de que existam 10 horas ininterruptas de sol. Entretanto, em países tropicais como o Brasil, essa condição pode ser verificada, especialmente nos dias de verão. Contudo, a possível manutenção da

infectividade, sugerida nesse estudo em função das mínimas alterações morfológicas flagradas em relação aos cistos de *Giardia*, após 45 dias de exposição à luz solar, em condições naturais, é um fator complexo que necessita de mais estudos. Fatores podem influenciar a manutenção ou não da infectividade, como a frequência de revolvimento das leiras que pode auxiliar ou não na exposição dos (oo)cistos à luz solar.

A quantidade de amônia é outro fator que deve ser levado em consideração, pois ocorre naturalmente no ambiente especialmente em materiais como o lodo de esgoto ou esterco (JENKINS et al., 1998). Jenkins et al. (1998) verificaram, em condições de laboratório, a influência da amônia na inativação de oocistos e reportaram que, mesmo nas menores doses aplicadas de uma solução comercial de amônia (0,007 M), houve um decréscimo significativo na “viabilidade” dos oocistos após 24 horas de exposição, a 24°C mediante emprego de corante vital. Entretanto, é necessário verificar a viabilidade dos oocistos mediante teste de infectividade animal ou cultivo celular, métodos que devem ser melhor estudados em pesquisas futuras.

Widmer et al. (2002) reportaram que os danos estruturais visualizados mediante emprego de MEV em cistos expostos ao tratamento com ozônio podem estar correlacionados com a perda da infectividade. Nesse caso, foram verificadas nas preparações, rompimento da integridade da parede do cisto (não observado no caso do presente estudo).

7.8. Ocorrência de ovos de helmintos em esgoto

A transmissão de helmintos parasitos depende de parâmetros físicos, químicos e biológicos que devem coincidir no ambiente para permitir o desenvolvimento da larva e a transmissão para o hospedeiro específico. O solo é a principal fonte de muitos helmintos parasitas para humanos e animais (CIARMELA et al., 2002). O uso do lodo de esgoto em solos destinados à agricultura pode ser uma fonte potencial de contaminação por ovos de helmintos, pois requerem baixa dose infectante, têm distribuição cosmopolita, são altamente resistentes às condições ambientais adversas e aos processos de tratamento de esgoto (ARAKI et al., 2000; CAPIZZI – BANAS et al., 2004).

Durante as últimas duas décadas, foram desenvolvidos diferentes procedimentos para a detecção de ovos de helmintos em amostras de lodo de esgoto. Entretanto, nenhum protocolo é universalmente aceito para uso geral (BOWMAN et al., 2003). Muitos desses foram adaptações feitas de métodos empregados na Parasitologia Clínica, portanto, utilizava-se uma pequena quantidade de material.

A Norma Oficial Mexicana (NOM), em vigor desde janeiro de 1997, estabelece limite de ovos de helmintos que pode estar presente em águas e resíduos de esgoto. Entretanto, não prevê a avaliação da viabilidade de tais ovos, o que é fundamental para o estudo da epidemiologia das infecções parasitárias (VICTORICA e GALVÁN, 2003). Victorica e Galván (2003) avaliaram a eficiência de recuperação da NOM e obtiveram 90% para ovos de helmintos em amostras de afluente, efluente e lodo. Oropeza et al. (2001) também utilizaram o mesmo procedimento para a recuperação de ovos de helmintos em amostras de lodo

durante diferentes tratamentos por digestão anaeróbica e a eficiência de recuperação variou de 35% a 70%.

A USEPA promulgou em 1999 regulamentações para controle de patógenos e atração de vetores em lodo de esgoto. Nesse documento, há a sugestão de um método para a detecção, enumeração e determinação da viabilidade de ovos de helmintos em lodo de esgoto que compreende as seguintes etapas: sedimentação, centrífugo-concentração, flutuação em solução saturada de sulfato de magnésio (gr. sp.=1,2) e clarificação com solução álcool-ácido. A proposta para a verificação da viabilidade dos ovos é a incubação a 26°C em estufa durante três ou quatro semanas. A USEPA definiu que o limite detectável é de 1 ovo viável de helminto por 4g de lodo de esgoto (peso seco) (CAPIZZI – BANAS et al., 2004).

Neste estudo, optou-se por não utilizar-se o método descrito pela USEPA (1999), pois a verificação da viabilidade recomendada incluía a incubação do sedimento final durante três ou quatro semanas enquanto que o método da NOM não contemplava tal etapa, que é de importância fundamental na epidemiologia de infecções parasitárias (VICTORICA e GALVÁN, 2003). Sendo assim, optou-se pela verificação alternativa mediante o emprego do corante vital Azul Trypan devido à facilidade e rapidez na realização do teste. Outro fator que levou a essa escolha foi o estudo de Nelson e Darby (2001) no qual verificaram o efeito dos reagentes comumente usados no procedimento recomendado pela USEPA na viabilidade de ovos de *Ascaris suum* em condições de laboratório. Os resultados mostraram que, nas condições de exposições máximas, os tratamentos que empregaram o uso da solução álcool-ácida causaram um decréscimo da

viabilidade dos ovos e quando tal solução foi combinada com o éter etílico, houve um efeito sinérgico que provocou uma diminuição ainda maior da viabilidade.

No Brasil, Paulino et al. (2001) verificaram a presença de ovos de helmintos em amostras de lodo de esgoto mediante emprego de uma técnica que apresentava etapas de sedimentação, centrifugo-concentração, flutuação em solução saturada de sulfato de zinco e clarificação com solução álcool-ácido e éter etílico. Também, foi realizada a verificação da viabilidade dos ovos de helmintos. Para isso, empregou-se a técnica de incubação do sedimento final do processamento em estufa a 28°C durante quatro semanas. Os resultados mostraram a presença de ovos de *Ascaris* com maior prevalência, seguida de *Toxocara* e *Trichuris*. Rocha et al. (2003) estudaram o lodo de esgoto como adubo no cultivo de couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala*, grupo Georgia) e as análises parasitológicas, realizadas com o método de Hoffman, Pons e Janer (1934) indicaram a presença de 80,0% de amostras positivas para *Ascaris*.

No presente estudo a concentração de ovos de helmintos variou de 0 a 22,2 ovos por grama de lodo de esgoto sendo que seis amostras (50,0%) foram positivas para pelo menos um dos helmintos (*Ascaris*, *Toxocara* ou *Trichuris*). Segundo levantamento realizado por Jiménez et al. (2002), a concentração de ovos de *Ascaris* presentes no lodo de esgoto no México variou de 66 a 136 ovos por grama de lodo de esgoto; nos Estados Unidos, essa variação foi de 1,4 a 9,7 ovos por grama de lodo de esgoto.

Capizzi-Banas et al. (2002) sugerem que as propriedades da superfície dos ovos de *Ascaris* são modificadas durante a postura, fazendo com que a cobertura externa se torne hidrofóbica. Os autores observaram que os ovos recuperados

após a dissecação (antes da postura) possuíam uma cobertura externa, mas essa camada não apresentava a estrutura mamelonada, característica dos ovos de *Ascaris*, a qual ainda estava sendo formada. As propriedades de superfície diferem de acordo com o tipo de ovo, mostrando que a presença de uma camada externa que tenha atingido a maturidade é importante em relação às propriedades de adesão (CAPIZZI – BANAS et al., 2002). Tais propriedades podem ter afetado negativamente a recuperação dos ovos de *Ascaris* nas amostras de lodo de esgoto uma vez que apenas duas amostras foram positivas para esse helminto.

Foram observados ovos de *Ascaris* viáveis mediante emprego do corante vital Azul Trypan, o que mostra o risco potencial de contaminação do lodo de esgoto mesmo após 45 dias de exposição à luz solar. Jiménez et al. (2002) verificaram a viabilidade de ovos de *Ascaris* em amostras de lodo de esgoto, no México, mediante emprego de técnica de purificação com etapas de lavagens, filtração, flutuação em solução saturada e centrifugo-concentração e posterior incubação, por 20 dias a 26°C em ácido sulfúrico (0,05 mol/L). Segundo os autores, ovos de *Ascaris* foram encontrados, com maior freqüência, quando comparado a outros helmintos sendo que 90,0% deles estavam viáveis. É pouco provável que no caso desse estudo, a viabilidade tenha sido subestimada uma vez que foi feita a pronta visualização dos ovos após a coloração com Azul Trypan (de 3 a 5 minutos), segundo Altman et al. (1993).

A ocorrência de doenças causadas por vírus, protozoários e helmintos patogênicos mostra que as bactérias indicadoras tradicionais são inadequadas como os únicos indicadores para a segurança da disposição do lodo, devido a

grande resistência aos vários processos tradicionais de remoção e/ou destruição (JIMÉNEZ et al., 2002), assim como os protozoários e helmintos.

O uso de ovos de helmintos (como um indicador) para o monitoramento de presença de organismos patogênicos em lodo de esgoto é fundamentado na premissa de que apresentam alta taxa de sobrevivência (anos) em relação às bactérias (meses) e protozoários (meses), além de resistência a processos de cloração e altas temperaturas (BOWMAN et al., 2003; SHAMA e AL-ADAWI (2002).

Em suma, os resultados obtidos nesse estudo, que comprovam a presença de cistos de *Giardia*, oocistos de *Cryptosporidium* e ovos de *Ascaris* em lodo de esgoto sugerem que algumas formas de resistência desses parasitos (cistos de *Giardia* e ovos de *Ascaris*) ainda possam permanecer "viáveis", mesmo após 45 dias de exposição à luz solar natural. Tal fato tem fortes implicações em Saúde Pública no que concerne ao uso do lodo de esgoto como fertilizante e sua aplicação no solo. Além disso, trata-se do primeiro trabalho no Brasil que emprega, na detecção de cistos e oocistos, a reação de imunofluorescência direta em amostras de lodo de esgoto. É importante ressaltar que a legislação vigente no Brasil, não prevê a verificação da ocorrência de cistos e oocistos em amostras de lodo de esgoto.

Considerando-se os resultados das análises morfológicas que sugerem alta resistência de cistos de *Giardia*, é possível inferir que o revolvimento periódico do lodo de esgoto na leira é um fator crítico na inativação desse protozoário.

8. CONCLUSÕES

Os resultados alcançados nessa pesquisa permitem concluir que:

1. *Giardia* foi mais prevalente que *Cryptosporidium* nas amostras de lodo de esgoto da Estação de Tratamento de Esgoto Samambaia, Campinas, SP, Brasil.

2. A concentração de cistos de *Giardia* (0 – 4800 cistos/g) verificada foi maior que a de oocistos de *Cryptosporidium* (600 oocistos/g).

3. A aplicabilidade dos métodos analisados em relação à recuperação de cistos e oocistos apresentou diferenças entre as amostras naturais e artificialmente contaminadas: para as primeiras, a Homogeneização em Solução de Eluição (HSE) foi melhor que a Centrífugo-concentração seguida de clarificação em éter (CC/CE); para o segundo tipo de amostras, CC/CE foi melhor que HSE. Tais resultados representam a variabilidade dos métodos testados para amostras de lodo de esgoto.

4. Os fatores que interferiram na recuperação de cistos e oocistos foram: o pH, alto teor de partículas e tempo de contato dos cistos e oocisto inoculados com a amostra antes do processamento no laboratório.

5. Após 45 dias de exposição à luz solar, foram verificados danos morfológicos mínimos nas paredes dos cistos de *Giardia*, como comprovado mediante o uso de microscopia de fluorescência e eletrônica.

6. Foi possível verificar ovos viáveis de *Ascaris* sp com 45 e 90 dias de exposição ao sol.

7. A presença de cistos de *Giardia*, oocistos de *Cryptosporidium* e ovos de helmintos, especialmente *Ascaris* e *Toxocara*, indica risco potencial ao meio ambiente com a disposição do lodo em solos destinados à agricultura. A alta resistência ambiental desses patógenos representa risco potencial à contaminação do solo onde o lodo de esgoto será aplicado e, possivelmente, para lençóis freáticos ou outros corpos d'água.

9. REFERÊNCIAS

AHMAMID, O.; ASMANA, S. e BOUHOUM, K. The effect of waste water reuse in irrigation on the contamination of food crops by *Giardia* cysts and *Ascaris* eggs. **Int. J. of Food Microbiol.** **49**: 19 – 26, 1999.

ALÉM SOBRINHO, P. Tratamento de esgoto e geração de lodo. In: Tsutiya, M. T. et al. p. 7 – 40. 2001.

ALTMAN, S.; RANDERS, L. e RAO, G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. **Biotechnol. Prog.** **9**: 671 – 679, 1993.

ANDREOLI, C.V. e CARNEIRO, C. Avaliação do comportamento vertical de nitrogênio orgânico, nitrogênio amoniacal e pH em leiras de lodo de esgoto caledado. **Sanare - Rev. Téc. da Sanepar**, **18 (18)**: 63-70, 2002.

ANGUSH, L.J. e GHIORSE, W.C. Computer-assisted laser scanning and video microscopy for analysis of *Cryptosporidium parvum* oocysts in soil, sediment and feces. **Appl. Environ. Microbiol.** **63 (2)**: 724 – 733, 1997.

ARAKI, S.; MARTÍN-GOMEZ, S.; BÉCARES, E. ; LUIS-CALABUIG, E. e ROJO-VASQUEZ, F. Effect of high-rate algal ponds on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl. Environ. Microbiol.** **67 (7)**: 3322 – 3324, 2000.

ARMON, R.; GOLD, D.; BRODSKY, M. e ORON, G. Surface and subsurface irrigation with effluents of different qualities and presence of *Cryptosporidium* oocysts in soil and on crops. **Wat. Sci. Tech.** **46 (3)**: 115 – 122, 2002.

BAHRI, A. Agricultural reuse of wastewater and global water management. **Wat. Sci. Tech.** **40 (4 - 5)**: 339 - 346, 1999.

BAKER, G.; MICHALK, D.; WHITBY, W. e O'GRADY, S. Influence of sewage waste on the abundance of earthworms in pastures in south-eastern Australia. **Eur.J. of Soil Biol.** **38**: 223 – 237, 2002.

BARRET, J. Studies on the induction of permeability in *Ascaris lumbricoides* eggs. **Parasitology** **73**: 109 - 121, 1976.

BARWICK, R.S.; MOHAMMED, H.O.; WHITE, M.E. e BRYANT, R.B. Prevalence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. on dairy farms in southeastern New York state. **Prev. Vet. Med.** **59**: 1 – 11, 2003.

BEAN, C.L.; BRABANTS, J.J. e MARGOLIN, A.B. Survey of wastewater solids to assess the prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and *Ascaris lumbricoides*. American Society of Microbiology General Meeting, Orlando, 2001. Disponível em: <<http://cwmi.css.cornell.edu/Sludge/NEreport.pdf>>. Acesso em Novembro de 2006.

BEAN, C.L. e BRABANTS, J.J. Project profile: Controlling human parasites in municipal biosolids. Disponível em: <<http://www.werf.us/research/search/index.cfm?fuseaction=projectinfo&index=492&requesttimeout=600&CFID=61551&CFTOKEN=75589145>>. Acesso em Novembro de 2006.

BIOVIR. Disponível em: <<http://www.biovir.com/Images/pdf019.pdf>>. Acesso em Novembro de 2006.

BONADONNA, L.; BRIANCESCO, R.; OTTAVIANI, O. e VESCHETTI, E. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and correlation with microbial, chemical and physical water variables. **Environ. Monit. and Assessment**. **75**: 241 – 252, 2002.

BONATTI, T.R. e FRANCO, R.M.B. Comparison of two methodologies for detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in activated sludge samples from a sewage treatment plant in the city of Campinas, São Paulo State, Brazil. **Journal of Water and Health**, *in press*.

BONATTI, T.R. e FRANCO, R.M.B. Ocorrência de cisto de *Giardia* spp e oocistos de *Cryptosporidium* spp em amostras de lodo ativado da Estação de Tratamento de Esgoto (E.T.E.) Samambaia na cidade de Campinas, São Paulo: comparação entre duas metodologias para a detecção destes protozoários. Projeto de Iniciação Científica; financiado pela FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP) - processo no. 02/12845-0, 2003.

BOWMAN, D.D.; LITTLE, M.D.; REIMERS, R.S. Precision and accuracy of an assay for detecting *Ascaris* eggs in various biosolid matrices. **Wat. Res.** **37**: 2063-2072, 2003.

BROWNELL, S.A. e NELSON, K.L. Inactivation of single-celled *Ascaris suum* eggs by low-pressure UV radiation. **Appl. Environ. Microbiol.** **72** (3): 2178 – 2184, 2006.

BUGG, R.J.; ROBERTSON, I.D.; ELLIOT, A.D. e THOMPSON, R.C.A. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. **Vet. J.** **157**: 295 – 301, 1999.

BUKHARI, Z. e SMITH, H.V. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. **J. Clin. Microbiol.** **33** (10): 2592 – 2595, 1995.

- BUKHARI, Z.; SMITH, H.V.; SYKES, N.; HUMPHREYS, S.W.; PATON, C.A.; GIRDWOOD, R.W.A. & FRICKER, C.R. – Occurrence of *Cryptosporidium* spp oocysts and *Giardia* spp cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England. **Wat. Sci. Tech.** **35 (11-12)**: 385-390, 1997.
- BUTKUS, M.A.; BAYS, J.T. e LABARE, M.P. Influence of surface characteristics on the stability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl. Environ. Microbiol.** **69 (7)**: 3819 – 3825, 2003.
- CACCIÒ, S.M.; THOMPSON, R.C.A.; McLAUCHLIN, J. e SMITH, H.V. Unraveling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitol.** **21 (9)**: 430 – 437, 2005.
- CAMPOS, M. R.; VALENCIA, L. I. O.; FORTES, B. P. M. D.; BRAGA, R. C. C. e MEDRONHO, R. A. Distribuição espacial da infecção por *Ascaris lumbricoides*. **Rev. Saúde Pública** **36 (1)**: 69 – 74, 2002.
- CANTUSIO NETO, R. OLIVEIRA, F. *Comunicação pessoal*. 2005.
- CAPIZZI-BANAS, S.; DELOGE, M.; REMY, M. e SCHWARTZBROD, J. Liming as an advanced treatment for sludge sanitisation: helminth eggs elimination – *Ascaris* eggs as model. **Wat. Res.** **38**: 3251-3258, 2004.
- CAPIZZI-BANAS, S.; MAUX, M. e SCHWARTZBROD, J. Surface hidrofobicity of *Ascaris* eggs and *Giardia* cysts. **Helminthologia** **39 (4)**: 197 – 204, 2002.
- CARNEIRO, F.F.; CIFUENTES, E.; TELLEZ-ROJO, M.M. e ROMIEU, I. The risk of *Ascaris lumbricoides* infection in children as an environmental health indicator to guide preventive activities in Caparaó and Alto Caparaó, Brazil. **Bull. of the World Health Organization** **80 (1)**: 40 – 46, 2002.
- CARRARO, E.; FEA, E. e GILLI, G. Impact of a wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occurring in a surface water. **Wat. Sci. Tech.** **41 (7)**: 31 - 37, 2000.
- CARRENO, R.A.; MARTIN, D.S. e BARTA, J.R. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidian as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitol. Res.** **85**: 899 – 904, 1999.
- CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Disponível em: <www.cdc.gov>. Acesso em agosto de 2006.
- CHAURET, C.; SPRINGTHORPE, S. e SATTAR, S. Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. **Can. J. Microbiol.** **45**: 257 – 262, 1999.



- CHRISTENSEN, K.K.; CARLSBAEK, M.; KRON, E. Strategies for evaluating the sanitary quality of composting. **J. App. Microbiol.** (6): 1143-1158, 2002.
- CIARMELA, M.L.; MINVIELLE, M.C.; LORI, G. e BASUALDO, J.A. Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. **Vet. Parasitol.** 103: 251 - 257, 2002.
- CLANCY, J.L.; BUKHARI, Z. ; STERLING, C.; MARSHALL, M.; KORICH, D.G.; SCHAEFER III, F.W. e ROSEN, J.S. Cell culture method not yet viable. **J. AWWA**, 92 (4): 4 - 5, 2000.
- CLANCY, J.L. e McCUIN, R.M. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* in wastewaters in the U.S. WQTC Conference, 2003.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Aplicação de lodos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas: critérios para projeto e operação: manual técnico, Norma P 4230.** São Paulo, agosto de 1999.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Instrução técnica no. 31. Irrigação com água de reuso proveniente de esgoto sanitário tratado.** São Paulo, julho de 2005.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução n°. 375.** Brasília, 29 de agosto de 2006.
- COOK, N.; PATON, C.A.; WILKINSON, N.; NICHOLS, R.A.B.; BAKER, K. e SMITH, H.V. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. **Int. J. of Food Microbiol.** 109 (3): 222 – 228, 2006.
- COOMBS, I e CROMPTON, D.W.T. **A guide to human helminths.** Taylor and Francis. Londres, Inglaterra. 1991.
- CORRÊA, R.S. e CORRÊA, A. S. Valoração de biossólidos como fertilizantes e condicionadores de solo. **Sanare - Rev. Téc. da Sanepar**, 16 (16): 49 – 56, 2002. 2001
- CROMPTON, D.W.T. *Ascaris* and ascariasis. **Adv. in Parasitol.** 48: 285 – 375, 2001.
- CROMPTON, D.W.T. How much ascariasis is there in the world? **J. of Parasitol.** 85: 397 – 403, 1999.
- DAÍ, X.; BOLL, J.; HAYES, M.E. e ASTON, D.E. Adhesion of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to solid surfaces: the role of surface charge and hydrophobicity. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, 34: 259 – 263, 2004.

- DAVIES, C.M.; KAUCNER, C.; DEERE, D. e ASHBOLT, N.J. Recovery and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts from animal fecal matrices. **Appl. Environ. Microbiol.** **69** (4): 2842-2847, 2003.
- DESPOMMIER, D. Toxocaríasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. **Clin. Microbiol. Rev.** **16** (2): 265– 272, 2003.
- DIAS JÚNIOR, O. Ocorrência de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em águas superficiais e esgoto no município de Araras – S.P. **Tese de Mestrado, Universidade Presbiteriana Mackenzie, 110 pp, 1999.**
- DROZD, C. e SCHWARTZBROD., J. Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of *Cryptosporidium parvum*. **Appl. Environ. Microbiol.** **62** (4): 1227-1232, 1996.
- ERLANDSEN, S.L.; MACECHKO, P.T.; VAN KEULEN, H. E JARROLL, E.L. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. **J. Euk. Microbiol.** **43** (5): 416 – 429, 1996.
- FARIAS, E.W.C.; GAMBA, R.C. & PELLIZARI, V.H. Detection of *Cryptosporidium* spp. in raw and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** **33**: 41-43, 2002.
- FAYER, R. Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. **Appl. Environ. Microbiol.** **60** (8): 2732-2735, 1994.
- FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Vet. Parasitol.** **126**: 37 – 56, 2004.
- FAYER, R. e NERAD, T. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl. Environ. Microbiol.** **62** (4): 1431 – 1433, 1996.
- FAYER, R.; MORGAN, U. e UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **Int. J. Parasitol.**, **30**: 1305 – 1322, 2000.
- FINCH, G.R. e BELOSEVIC, M. Controlling *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in drinking water by microbial reduction processes. **J. Environ. Eng. Sci.** **1**: 17 – 31, 2002.
- FOX, K.R. e LYTLE, D.A. Milwaukee's crypto outbreak: investigations and recommendations. **J. AWWA** **88** (9): 87 – 94, 1996.

- FRANCO, R.M.B. Infecções parasitárias em creche: estudo em uma area urbana, com ênfase em *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis*. **Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 105 pp, 1996.**
- FRANK, R. The use of biosolids from wastewater treatment plants in agriculture. **Environ. Manage. 9 (4): 165 – 169, 1998.**
- FUJINO, T.; MATSUI, T.; KOBAYASHI, F.; HARUKI, K.; YOSHINO, Y.; KAJIMA, J. e TSUJI, M. The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. **J. Vet. Med. Sci. 64 (3): 199 – 200, 2002.**
- GASPARD, P. e SCHWARTZBROD, J. Parasite contaminations (helminth eggs) in sludge treatment plants: Definition of sampling strategy. **Int. J. Hyg. Health, 206: 117 – 122, 2003.**
- GASPARD, P.; WIART, J. e SCHWARTZBROD, J. Parasitological contamination of urban sludge used for agricultural purposes. **Wast. Manage. Res. 15: 429 – 436, 1997.**
- GERBA, P.C. e SMITH Jr, J.E. Source of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. **J. Environ. Qual. 34: 42 – 48, 2005.**
- GERNAEY, K.; VANDERHASSELT, A.; BOGAERT, H.; VROLLEGHEM, P. e VERSTRAETE, W. Sensors to monitor biological nitrogen removal and activated sludge settling. **J. Microbiol. Methods 32: 193 -204, 1998.**
- GODFREE, A. e FARRELL, J. Processes for managing pathogens. **J. Environ. Qual. 34: 105 – 113, 2005.**
- HABLUETZEL, A.; TRALDI, G.; RUGGIERI, S.; ATTILI, A.R.; SCUPPA, P.; MARCHETTI, R.; MENGHINI, G. e ESPOSITO, F. An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. **Vet. Parasitol. 113: 243 – 242, 2003.**
- HAMER, G. Solid waste treatment and disposal: effects on public health and environmental safety. **Biotechnol. Adv. 22 (1 – 2): 71 – 79, 2003.**
- HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A. e JANER, J.L. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. **J. Publ. Health 9: 281 – 298, 1934.**
- HOQUE, M.E.; HOPE, V.T.; KJELLSTRÖM, T.; SCRAGG, R. e LAY-YEE, R. Risk of giardiasis in Aucklanders: a case – control study. **Int. J. Infect. Dis. 6: 191 – 197, 2002.**
- HU, C.J.; GIBBS, R.A.; MORT, N.R.; HOFSTEDE, H.T.; HO, G.E. e UNKOVICH, I. *Giardia* and its implications for sludge disposal. **Wat. Sci. Tech. 34 (7): 179 – 186, 1996.**

- HUYARD, A.; FERRAN, B. e AUDIC, J-M. The two phase anaerobic digestion process: sludge stabilization and pathogens reduction. **Wat. Sci. Tech.** **42 (9)**: 41 – 47, 2000.
- IACOVSKI, R.B.; BARARDI, C.R.M. e SIMÕES, C.M.O. Detection and enumeration of *Cryptosporidium* sp. oocysts in sewage sludge samples from the city of Florianópolis (Brazil) by using immunomagnetic separation combined with indirect immunofluorescence assay. **Wast. Manag. Res.** **22**: 171 – 176, 2004.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo Demográfico 2000**. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em novembro de 2006.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico**. Disponível em: <www.ibge.gov.br/estatistica/popula.shtm>. Acesso em novembro de 2006.
- JENKINS, M.B.; BOWMAN, D.D. e GHORSE, W.C. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ammonia. **Appl. Environ. Microbiol.** **64 (2)**: 784 - 788, 1998.
- JIMÉNEZ, B.; MAYA, C.; SÁNCHEZ, E.; ROMERO, A.; LIRA, L.; BARRIOS, J. A. Comparison of the quantity and quality of the microbiological content of sludge in countries with low and high content of pathogens. **Wat. Sci. Technol.**, **46 (10)**: 17 – 24, 2002.
- JOLIS, D.; PITT, P. & HIRANO, R. Risk assessment for *Cryptosporidium parvum* in reclaimed water. **Wat. Res.** **33 (13)**: 3051 – 3055, 1999.
- JORDÃO, E.P. e PESSOA, C.A. **Tratamento de esgotos domésticos. Volume I – Concepções clássicas de Tratamento de esgotos**. São Paulo. Edição patrocinada pelo convênio BNH / ABES / CETESB. 1975.
- JOHNSON, D.C.; ENRIQUEZ, C.E.; PEPPER, I.L.; DAVIS, T.L.; GERBA, C.P. & ROSE, J.B. Survival of *Giardia*, *Cryptosporidium*, poliovirus and *Salmonella* in marine waters. **Wat. Sci. Tech.** **35 (11-12)**: 261-268, 1997.
- KATO, S.; JENKINS, M.; FOGARTY, E. e BOWMAN, D. *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in field soil and its relation to soil characteristics: analyses using the geographic information systems. **Sci. Total Environ.** **321**: 47 – 58, 2004.
- KROGMANN, U. e BOYLES, L. Land application of sewage sludge (biosolids) #8: Pathogens. Biosolids Working Group Rutgers Cooperative Extension, 2000.
- LANE, S. e LLOYD, D. Current Trends in Research into the Waterborne Parasite *Giardia*. **Crit. Rev. Microbiol.** **28 (2)**: 123-47, 2002.

- LASARIDI, K.E.; STEINFORD, E.I e EVANS, T. Windrow composting of wastewater biosolids: process performance and product instability assessment. **Wat. Sci. Tech.** **42 (9)**: 217-226, 2000.
- LEMARCHAND, K. e LEBARON, P. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. **FEMS Microbiol. Let.** **218**: 203 – 209, 2003.
- LJUNGSTROM, I. e CASTOR, B. Immune response to *Giardia lamblia* in a water borne outbreak of giardiasis in Sweden. **J. Med. Microbiol.** **36 (5)**: 347-352, 1992.
- LOREILLE, O. e BOUCHET, F. Evolution of Ascariasis in human and pigs: a multi-disciplinary approach. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **98 (Suppl. I)**: 39 – 46, 2003.
- LONG, K. The use of biosolids (sewage sludge) as a fertilizer/soil conditioner on dairy pastures. A review from Dairy Food Safety perspective. Biosolids Report, 2001.
- MASSANET-NICOLAU, J. New method using sedimentation and immunomagnetic separation for isolation and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts. **Appl. Environ. Microbiol.** **69 (1)**: 6758 – 6761, 2003.
- McCUIN, R.M. e CLANCY, J.L. Methods for recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocysts in wastewaters. **J. Med. Microbiol.** **63 (1)**: 73 – 88, 2005.
- McGLADE, T.R.; ROBERTSON, I.D.; ELLIOT, A.D. e THOMPSON, R.C.A. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. **Vet. Parasitol.** **110**: 197 – 205, 2003.
- McGUIGAN, K.G.; MÉNDEZ-HERMIDA, F.; CASTRO-HERMIDA, J.A.; ARES-MAZÁS, E.; KEHOE, S.C.; BOYLE, M.; SICHEL, C.; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P.; MEYER, B.P.; RAMALINGHAM, S. e MEYER, E.A. Batch solar disinfections inactivates oocysts of *Cryptosporidium parvum* and cysts of *Giardia muris* in drinking water. **J. Appl. Microbiol.** **101**: 453 – 463, 2006.
- MEDEMA, G.J.; SCHETS, F.M.; TEUNIS, P.F.M. e HAVELAAR, H. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Appl. Environ. Microbiol.** **64 (11)**: 4460 – 4466, 1998.
- MEDEMA, G.J. e SCHIJVEN, J.F. Modelling the sewage discharge and dispersion of *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface water. **Wat. Res.** **18**: 4307 – 4316, 2001.
- MELO, W.J. e MARQUES, M.O.M. Potencial do lodo de esgoto como fonte de nutrientes para as plantas. In: BETTIOL, W. e CAMARGO, O.A. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna, SP.: EMBRAPA Meio Ambiente. Cap. 5, p. 109 - 141, 2000.

- MÉXICO. NORMA OFICIAL MEXICANA (NOM – 001 – ECOL). **Anexo I: Técnica para la determinación y cuantificación de huevos de helminto**. Disponível em: <<http://www.una.com.mx/content/sanidad/001ecol.pdf>>. 1996.
- MIGNOTTE-CADIERGUES, B.; MAUL, A.; HUYARD, A.; CAPIZZI, S. e SCHWARTZBROD, L. The effect of liming on the microbiological quality of urban sludge. **Wat. Sci. Tech.** **43** (12): 195 – 200, 2001.
- MONIS, P.T. e THOMPSON, R.C.A. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Inf., Gen and Evol.** **3**: 233 – 244, 2003.
- MONTEMAYOR, M.; VALERO, F.; JOFRE, J. e LUCENA, F. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. **J. App. Microbiol.** **99**: 1455 – 1462, 2005.
- NATH, G.; CHOUDHURY, A.; SHUKLA, B.N.; SINGH, T.B. e REDDY, D.C.S. Significance of *Cryptosporidium* in acute diarrhoea in North-Eastern India. **J. Med. Microbiol.** **48**: 523 – 526, 1999.
- NELSON, K.L. e DARBY, J. Inactivation of viable *Ascaris* eggs by reagents during enumeration. **Appl. Environ. Microbiol.** **67** (12): 5453 – 5459, 2001.
- O'CONNOR, G.A.O.; ELLIOT, H.A.; BASTA, N.T.; BASTIAN, R.K.; PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, R.C. e SMITH Jr, J.E. Sustainable land application: an overview. **J. Environ. Qual.** **34**: 7- 17, 2005.
- ODA, T.; KAWABATA, M e UGA, S. Detection of *Giardia* cysts in sewage and estimations of giardiasis prevalence among inhabitants in Hyogo Prefecture, Japan. **Trop. Med. and Health** **33** (1): 1 – 5, 2005.
- OGE, H. e OGE, S. Quantitative comparison of various methods for detection eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. **Vet. Parasitol.** **92**: 75 – 79, 2000.
- OKHUYSEN, P.C. e CHAPPEL, C.L. *Cryptosporidium* virulence determinants – are we there yet? **Int. J. Parasitol.** **32**: 517 – 525, 2002.
- OLIVEIRA, F. *Comunicação pessoal*. 2006.
- OLIVEIRA, P.V. Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no Rio Atibaia, Bacia do Piracicaba, Campinas, São Paulo, Brasil. **Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 100 pp**, 2005.
- O'LORCAIN, P. e HOLLAND., C.V. The public health importance of *Ascaris lumbricoides*. **Parasitology** **121**: S51 – S71, 2000.

OLSON, M.E.; O'HANDLEY, R.M.; RALSTON, B.J., McALLISTER, T.A. e THOMPSON, R.C.A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitol.** **20** (4): 185 – 191, 2004.

OPERSAN. Disponível em: <www.opersan.com.br>. Acesso em Novembro de 2006.

OROPEZA, M.R.; CABIROL, N.; ORTEGA, S.; CASTRO ORTIZ, L.P. e NOYOLA, A. Removal of fecal indicator organisms and parasites (fecal coliforms and helminth eggs) from municipal biologic sludge by anaerobic mesophilic and thermophilic digestion. **Wat. Sci. Tech.** **44** (4): 97 - 111, 2001.

PAULINO, R.C.; CASTRO, E.A.; SOCCOL, V.T. Tratamento anaeróbico de esgoto e sua eficiência na redução da viabilidade de ovos de helmintos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **34** (5): 421-428, 2001.

PAYMENT, P.; PLANTE, R.; CEJKA, P. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. **Can. J. Microbiol.** **47**: 188-193, 2001.

POGGIANI, F.; GUEDES, M.C. e BENEDETTI, V. Aplicabilidade de biossólido em plantações florestais: I. reflexo no ciclo de nutrientes. BETTIOL, W. e CAMARGO, O.A. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna, SP.: EMBRAPA Meio Ambiente. Cap. 8, p. 163 - 178, 2000.

QUINTERO-BETANCOURT, W.; GENNACARO, A.L.; SCOTT, T.M. e ROSE, J.B. Assessment of methods for detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in reclaimed effluents. **Appl. Environ. Microbiol.** **69** (9): 5380 – 5388, 2003.

RALSTON, B.J.; McALLISTER, T.A. e OLSON, M.E. Prevalence of infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. **Vet. Parasitol.** **114**: 113 – 122, 2003.

REDLINGER, T.; CORELA-BARUD, V.; GRAHAM, J.; GALINDO, A. AVITIA, R. e CARDENAS, V. Hyperendemic *Cryptosporidium* and *Giardia* in households lacking municipal sewer and water on the United States – México border. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **66** (6): 794 – 798, 2002.

RIMHANEN-FINNE, R.; VUORINEN, A.; MARMO, S.; MALMBERG, S. E HÄNNINEN, M.L. Comparative analysis of *Cryptosporidium*, *Giardia* and indicator bacteria during sewage sludge hygienization in various composting process. **Let. App. Microbiol.** **38**: 301 – 305, 2004.

- ROBERTSON, L.J.; HERMANSEN, L. e GJERDE, B.K. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in Norway. **Appl. Environ. Microbiol.** **72 (8)**: 5297 – 5303, 2006.
- ROBERTSON, L.J.; PATON, C.A.; CAMPBELL, A.T.; SMITH, P.G.; JACKSON, M.H.; GILMOUR, R.A.; BLACK, S.E.; STEVENSON, D. A e SMITH, H.V. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. **Wat. Res.** **34(8)**: 2310-2322, 2000.
- ROCHA, R.E.M.; PIMENTEL, M.S.; ZAGO, V.C.P.; RUMJANEK, N.G. E DE-POLI, H. Avaliação de biossólido de águas servidas domiciliares como adubo em couve. **Pesq. Agropec. Bras.** **38 (12)**: 1435 – 1441, 2003.
- ROSE, J. B.; LANDEEN, L.K.; RILEY, K.R. e GERBA, C.P. Evaluation of immunofluorescence techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.** **55 (12)**: 3189 – 3196, 1989.
- ROSE, J. B. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. **Annu. Rev. Public Health**, **18**: 135 – 161, 1997.
- ROSE, J.B.; HUFFMAN, D.E. e GENNACCARO, A. Risk and control of waterborne criptosporidiosis. **FEMS Microbiol.Rev.** **26**: 113 – 123, 2002.
- SANTAMARIA, J. e TORANZOS, G. A. Enteric pathogens: a short review. **Int. Microbiol.**, **6**: 5 – 9, 2003.
- SANTOS, L.U.; BONATTI, T.R.; CANTUSIO NETO, R. e FRANCO, R.M.B. Comparação de duas técnicas para detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de esgoto. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **46 (6)**: 309 – 313, 2004.
- SEARCY, K.E; PACKMAN, A.I.; ATWILL, E.R. e HARTER, T. Association of *Cryptosporidium parvum* with suspended particles: impact on oocyst sedimentation. **Appl. Environ. Microbiol.** **71 (2)**: 1072-1078, 2005.
- SCHMIDT, G.D. e ROBERTS, L.S. **Foundations of Parasitology**. 5ª. edição. Wm. C. Brown Publishers, Estados Unidos. 1996. 659 p.
- SHAMMA, M. e AL-ADAWI, M.A. The morphological changes of *Ascaris lumbricoides* ova in sewage sludge water treated by gamma irradiation. **Rad. Phys. and Chem.** **65**: 277 – 279, 2002.

- SHEPHERD, K.M. e WYN-JONES, A.P. An evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. **Appl. Environ. Microbiol.** **62** (4): 1317-1322, 1996.
- SILVA, F.C.; BOARETTO, A.E.; BERTON, R.S.; ZOTELLI, H.B.; PEXE, C.A.; BERNARDES, E.M. Efeito de lodo de esgoto na fertilidade de um Argissolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-de-açúcar. **Pesq. Agropec. Bras.**, **36** (5): 831-840, 2001.
- SLAPETA, J. Response to Xiao *et al.*: Further debate on the description of *Cryptosporidium pestis*. **Trends in Parasitol.**, *in press*. Disponível on line em dezembro de 2006.
- SMITH, A.L. e SMITH, H.V. A comparison of fluorescein diacetate and propidium iodide staining and *in vitro* excystation for determining *Giardia intestinalis* cyst viability. **Parasitology** **99**:329-331, 1989.
- SOCIEDADE DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA E SANEAMENTO S/A (SANASA). Disponível em: <www.sanasa.com.br>. Acesso em Novembro de 2006.
- STADTERMAN, K.L.; SNINSKY, A.M.; SYKORA, J.L. e JAKUBOWSKI, W. Removal and inactivation of *Cryptosporidium* oocysts by activated sludge treatment and anaerobic digestion. **Wat. Sci. Tech.** **31** (5 – 6): 97 – 104, 1995.
- SUNNOTEL, O.; LOWERY, C.J.; MOORE, J.E.; DOOLEY, J.S.G.; XIAO, L.; MILLAR, B.C.; ROONET, P.J. e SNELLING, W.J. *Cryptosporidium*. **Let. App. Microbiol.** **43**: 7 – 16, 2006.
- THIRIAT, L.; BIGOT, V. e SCHWARTZBROD, J. Evaluation of a procedure for detection of viable *Giardia* cysts in wastewater sludge. **Wat. Sci. Tech.** **35** (11 - 12): 377 – 380, 1997.
- THOMPSON, R.C.A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **Int. J. Parasitol.** **30**: 1250 -1267, 2000.
- THOMPSON, R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet. Parasitol.** **126**: 15 – 35, 2004.
- TSUTYA, M.T. Alternativas de disposição final de biossólidos gerados em estações de tratamento de esgotos. In: BETTIOL, W. e CAMARGO, O.A. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna, SP.: EMBRAPA Meio Ambiente. Cap. 4, p. 69 - 105, 2000.
- TZIPORI, S. e WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infections**, **4**: 1047 – 1058, 2002.

TYRREL, S.F. e QUINTON, J.N. Overland flow transport of pathogens from agricultural land receiving faecal wastes. **J. App. Microbiol.** **94**: 87S – 93S, 2003.

UDEH, P.J.; JOHN, G. e VEENSTRA, J.N. Field inactivation of oocysts exposed to agricultural land. **Wat., Air and Soil Pollut.** **142**: 211 – 228, 2003.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. (USEPA). **Clean water needs survey report to Congress.** EPA 832-R-003. 1997. Disponível em: <<http://www.epa.gov/owm/mtb/cwns/1996rtc/toc.htm>> . Acesso em Novembro de 2006.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. (USEPA). **Environmental regulations and Technology: Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge.** Revisado em Outubro de 1999. Washington, DC. Report no. EPA/625/R-92/013. 1999 (Revisado em 2003).

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. (USEPA). **USEPA method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA.** EPA 821-R-01-026. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. 2001.

VAZOLLÉR, R.F.; GARCIA, M.A.R.; GARCIA Jr, A.D.; CONCEIÇÃO NETO, J. **Microbiologia de lodos ativados.** CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) – Série Manuais, 1989.

VICTORICA, J. e GALVÁN, M. Preliminary testing of a rapid coupled methodology for quantitation/viability determination of helminth eggs in raw and treated wastewater. **Wat. Res.** **37**: 1278-1287, 2003.

VILLACORTA-MARTINEZ DE MATURANA, I.; ARES-MAZÁS, M.E.; DURAN-OREIRO, D. e LORENZO-LORENZO, M.J. Efficacy of activated sludge in removing *Cryptosporidium parvum* oocysts from sewage. **Appl. Environ. Microbiol.** **58** (11): 3514 – 3516, 1992.

WALKER, M.J.; MONTEMAGNO, C.; BRYANT, J.C. e GHIORSE, W.C. Method detection and immunofluorescence assay for *Cryptosporidium parvum* in soil. **Appl. Environ. Microbiol.** **64** (6): 2281 – 2283, 1998.

WERF – WATER ENVIRONMENT RESEARCH FOUNDATION (http://www.werf.org/press/summer01/01su_biosolids.cfm). (Acesso em Novembro de 2003).

WHARTON, D. Nematode egg-shells. **Parasitology** **81**: 447 – 463, 1980.

WHITMORE, T.N. e ROBERTSON, L.J. The effect of sewage sludge treatment process on oocysts of *Cryptosporidium parvum*. **J. Appl. Bacteriol.** **78**: 34 – 38, 1995.

WIDMER, G.; CLANCY, T.; HONORINE, D.W.; MILLER, D.; BATZER, G.M.; PEARSON, C.B. e BUKHARI, Z. Structural and biochemical alterations in *Giardia lamblia* cysts exposed to ozone. **J. Parasitol.** **88 (6)**: 1100 – 1106, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The world health report. Fighting Disease Fostering Development.** World Health Organization, Geneva, 1996.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U. e UPTON, S.J. Response to the newly proposed species *Cryptosporidium pestis*. **Trends in Parasitol.**, *in press*. Disponível on line em dezembro de 2006.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis.** Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey. 4ª edição. 1999.

ZARLENGA, D.S. e TROUT, J.M. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. **Vet. Parasitol.** **126**: 196 – 217, 2004.

ZUCKERMAN, U.; ARMON, R.; YUDITZKY, A. e GOLD, D. Chitin a structural component of *Cryptosporidium* oocyst wall. **J. Euk. Microbiol.** **47 (2)**: 13A-13A, 2000.

10. ANEXOS

10.1. ANEXO I ¹

INVESTIGAÇÃO PARASITOLÓGICA CONDUZIDA EM TRABALHADORES DE UMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO.

RESUMO

Protozoários patogênicos e helmintos requerem baixas doses infectantes, o que representa um risco para os trabalhadores que lidam diretamente com esgoto em Estações de Tratamento de Esgoto (E.T.E.). Os objetivos desse estudo foram verificar a presença de cistos e oocistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos em fezes de trabalhadores de uma E.T.E. que lidam direta e indiretamente com esgoto. Do ponto de vista da Saúde Pública, é interessante realizar essa investigação parasitológica nesses funcionários. Dos quarenta indivíduos que forneceram material para as análises, somente 3 apresentaram resultado positivo (7,3%). A prevalência de *Ascaris lumbricoides* foi de 2,5% e 4,87% para larva rãbitóide de *Strongyloides stercoralis*.

¹ Nota de pesquisa submetida.

1. INTRODUÇÃO

O esgoto contém microrganismos derivados das fezes humanas e animais. Os parasitos ganham entrada no esgoto de uma comunidade a partir de hospitais, residências, escolas, postos de saúde e são concentrados em várias ordens de grandeza no lodo de esgoto (O'CONNOR et al., 2005). Os dejetos de origem animal ou esterco podem conter microrganismos zoonóticos (aqueles que podem causar doenças tanto em animais quanto em humanos) e entram no esgoto a partir de fazendas, deposição e acúmulo das fezes de animais e descarga de abatedouros (O'CONNOR et al., 2005). Humanos podem entrar em contato com patógenos pelo contato direto com o lodo de esgoto ou esterco, pela ingestão de água ou alimentos contaminados com resíduos, por meio do contato com indivíduos ou vetores que tenham tido contato com o lodo de esgoto e via bioaerosol originado a partir da aplicação do resíduo no solo (GERBA e SMITH, 2005).

No Brasil, poucos estudos relatam a presença de cistos e oocistos de protozoários e ovos de helmintos em amostras de esgoto (PAULINO et al., 2001; DIAS JÚNIOR, 1999; FARIAS et al., 2002). Esses parasitos requerem uma baixa dose infectante, o que representa um risco para os trabalhadores de estações de tratamento de esgoto (E.T.E.), especialmente aqueles que estão expostos diretamente ao esgoto. Dentre esses trabalhadores, além daqueles que lidam diretamente com o lodo, existem também os técnicos responsáveis pelas análises de diversas etapas do tratamento (SCHLOSSER et al., 1999). O relatório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (2000) confirmou que existe um risco potencial dos trabalhadores expostos a organismos

patogênicos e recomenda a prevenção por meio de proteções pessoais, como o uso de luvas, óculos de proteção e práticas de higiene (NIOSH, 2000). Esse relatório cita os organismos entéricos que podem ser encontrados em biossólidos de Classe B, como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *Giardia* e vírus entéricos, mas ressalta que apesar de serem associados a doenças gastrointestinais auto-limitantes, podem desenvolver sintomas mais severos em indivíduos imunocomprometidos, crianças e idosos.

2. OBJETIVOS

Verificar a presença de cistos e oocistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos nas fezes dos trabalhadores da Estação de Tratamento de Esgoto de Jundiá que lidam direta e indiretamente com esgoto.

3. JUSTIFICATIVA

O trabalho em estações de tratamento de esgoto pode envolver a exposição aos diferentes tipos de microrganismos, como bactérias, vírus e protozoários além de compostos químicos (THORN e KEREKES, 2001).

Estudos realizados em diversos países sugerem que as infecções gastrointestinais são mais comuns em trabalhadores de estações de tratamento de esgoto do que nos grupos controle e relataram que os sintomas mais reportados são: fadiga, dor de cabeça, dificuldades respiratórias e disfunções gastrointestinais (THORN e KEREKES, 2001).

Do ponto de vista da Saúde Pública é interessante fazer o inquérito parasitológico entre trabalhadores que lidam com o esgoto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram feitas análises em dois períodos: de agosto a novembro de 2004, com fezes conservadas em formalina 10% e em agosto de 2005, com fezes frescas. Os trabalhadores (n=40) que forneceram o material foram os mesmos para os dois períodos

A Estação de Tratamento de Esgoto escolhida para o estudo com tais trabalhadores está localizada na região Sudeste do Brasil e é responsável pelo tratamento de 100% do esgoto doméstico e industrial produzido por uma cidade de cerca de 500.000 habitantes. A produção de lodo de esgoto é de 200 toneladas por dia.

No primeiro período de análises (Agosto à Novembro de 2004) realizaram-se análises parasitológicas de quarenta trabalhadores. As amostras foram coletadas em três dias alternados em frascos que continham formalina (10%). Antes do desempenho dos procedimentos, as amostras foram homogeneizadas com bastão de vidro e peneiradas em tela metálica.

Os procedimentos realizados foram os seguintes:

- Método de Sedimentação Espontânea (HOFFMAN, PONS e JANER, 1934), para a pesquisa de ovos de helmintos;
- Método de Willis (Flutuação em solução de cloreto de sódio) (WILLIS, 1921), para a pesquisa de ovos de *Ancylostoma*;
- Método de Faust (1939), para a pesquisa de cistos de *Giardia*;
- Método de Waldman et al. (1986) modificado (FRANCO, 1996), para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*, descrito a seguir.

Foram colocados 3 mL da suspensão fecal em tubos de centrifuga e procedeu-se a centrifugação a 500 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado. Em seguida, o sedimento foi ressuspensão em água destilada, homogeneizado e o volume do tubo completo. Novamente o conteúdo foi centrifugado a 500 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e, ao sedimento, adicionados 3 mL de éter previamente refrigerado. O conteúdo do tubo foi então homogeneizado manual e vigorosamente durante 30 segundos. Em seguida, o volume foi completo com água destilada e procedeu-se à centrifugação (500 x g por 10 minutos). As camadas superiores foram desprezadas, exceto o sedimento e a fase aquosa. Deste, foram confeccionados os esfregaços fecais que foram deixados secar para posterior coloração de Ziehl – Neelsen (Henriksen e Pohlenz, 1981).

No segundo período de análises (Agosto de 2005), foi realizado o Método de Rugai et al. (1954) com fezes frescas para a pesquisa de larvas de helmintos.

5. RESULTADOS

De quarenta pessoas que cederam o material para os experimentos, apenas 3 apresentaram resultados positivos (7,3%). A prevalência foi de 2,5% para *Ascaris lumbricoides* (um trabalhador infectado) e de 4,8% para larvas rabditóides de *Strongyloides stercoralis* (dois trabalhadores infectados) (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado da análise parasitológica conduzida em trabalhadores (n=40) de uma Estação de Tratamento de Esgoto do Estado de São Paulo, região Sudeste do Brasil.

| | n | % |
|----------------------------------|----|------|
| <i>Ascaris lumbricoides</i> | 1 | 2,5 |
| <i>Strongyloides stercoralis</i> | 2 | 4,8 |
| Negativo | 37 | 92,5 |

6. DISCUSSÃO

Segundo Schlosser et al (1999), em levantamento realizado na França, existe um risco crescente de contaminação por parasitos em trabalhadores expostos ao esgoto bruto. A baixa prevalência de enteroparasitoses pode estar associada às campanhas de higiene que a própria empresa de saneamento promove. Segundo Friis (2001) existe uma correlação positiva entre a presença de protozoários nas fezes de trabalhadores que lidam com o esgoto e a duração da exposição. Esse autor também sugere que a prevalência da infecção com parasitoses intestinais diminui com a melhora da complacência com as regras de higiene.

No caso do presente estudo, os indivíduos infectados podem ter adquirido tais parasitos fora do ambiente de trabalho, dado o baixo número de amostras positivas. Entretanto, é interessante ressaltar que tais trabalhadores executavam funções que lidavam diretamente com o lodo de esgoto (operador de equipamento e ajudante geral) fato que pode indicar um risco maior de contaminação, apesar de serem orientados a usar os equipamentos de proteção.

Strongyloides stercoralis é o único nematódeo com ciclo endógeno que infecta humanos por muitos anos sem requerer exposição após contaminação ao solo contaminado, uma situação caracterizada por poucos ou nenhum sintoma, o que pode passar sem ser noticiado (ROMÁN-SÁNCHEZ et al., 2003), como noticiado pelos trabalhadores cujos exames de fezes foram positivos para esse helminto.

7. REFERÊNCIAS

- DIAS JÚNIOR, O. Ocorrência de cistos de *Giardia* sp e oocistos de *Cryptosporidium* sp em águas superficiais e esgoto no município de Araras – S.P. **Tese de Mestrado, Universidade Presbiteriana Mackenzie, 110 pp, 1999.**
- FARIAS, E.W.C.; GAMBA, R.C. & PELLIZARI, V.H. Detection of *Cryptosporidium* spp. in raw and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol., 33: 41-43, 2002.**
- FAUST, E.C.; SAWITZ, W. e TOBIE, J. et al. Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. **J. Parasitol., 25: 241 – 242, 1939.**
- FRIIS, L. Health of municipal sewage workers. Studies of cancer incidence, biomarkers of carcinogenicity and genotoxicity, and self reported symptoms. Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 1015.* 67 pp. Uppsala. ISBN 91-554-4980-8. 2001.
- GERBA, P.C. e SMITH Jr, J.E. Source of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. **J. Environ. Qual. 34: 42 – 48, 2005.**
- HENRIKSEN, A. e POHLENZ, J.F.L. Staining of *Cryptosporidium* by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Vet. Scand. 22: 594-596, 1981.**
- HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A. e JANER, J.L. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. **J. Publ. Health, 9: 281 – 298, 1934.**
- NIOSH – NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. Hazard ID 10: Workers exposed to Class B biosolids during and after field application. Publication No. 2000 – 158. Washington: United States Department of Health and Human Services, 2000.

O'CONNOR, G.A.O.; ELLIOT, H.A.; BASTA, N.T.; BASTIAN, R.K.; PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, R.C. e SMITH Jr, J.E. Sustainable land application: an overview. **J. Environ. Qual.** **34**: 7- 17, 2005.

PAULINO, R.C.; CASTRO, E.A.; SOCCOL, V.T. Tratamento anaeróbio de esgoto e sua eficiência na redução da viabilidade de ovos de helmintos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **34** (5): 421-428, 2001.

ROMÁN-SÁNCHEZ, P.; PASTOR-GUZMÁN, A.; MORENO-GUILLÉN, S.; IGUAL-ADELL, R. SUÑER-GENEROSO, S. e TORNERO-ESTÉBANEZ, C. High prevalence of *Strongyloides stercoralis* among farm workers on the mediterranean coast of Soaïn: analysis of the predictive factors of infection in developed countries. **Am. J. Trop. Hyg.** **69** (3): 336 – 340, 2003.

RUGAI, E.; MATTOS, T. e BRISOLA, A.P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes – modificação do método de Baermann. **Rev. Inst. A. Lutz**, **14**: 5-8, 1954.

SCHLOSSER, O. GRALL, D. e LAURENCEAU, M.N. Intestinal parasite carriage in workers exposed to sewage. **Eur. J. Epidemiol**, **15**: 261 – 265, 1999.

WALDMAN, E.; TZIPORI, S.; E FORSYTH, J.R.L. Separation of *Cryptosporidium* species oocysts from feces by using a percoll discontinuous density gradient. **J. Clin. Microb.** **23**: 199-200. 1986.

THORN, J. e KEREKES, E. Health effects among employees in sewage treatment plants: a literature survey. **Am. J. Ind. Med** **40**: 170 – 179, 2001.

WILLIS, H.H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Med. J. Australia**, **29**: 375 – 376, 1921.

10.2. ANEXO II²

**COMPARISON OF TWO METHODOLOGIES FOR DETECTION OF *Giardia* spp.
CYSTS AND *Cryptosporidium* spp. OOCYSTS IN ACTIVATED SLUDGE
SAMPLES FROM A SEWAGE TREATMENT PLANT IN THE CITY OF
CAMPINAS, SÃO PAULO STATE, BRAZIL.**

Taís Rondello Bonatti^a

Regina Maura Bueno Franco^b,

Romeu Cantusio Neto^c

^a Parasitology Department, Biology Institute, State University of Campinas, SP,
Brazil. PO Box 6109, CEP:13083-970.

^b Parasitology Department, Biology Institute, State University of Campinas, SP,
Brazil. PO Box 6109, CEP: 13083-970.

^c Microbiology Laboratory, Society of Water Supply and Sanitation S/A, Campinas,
SP, Brazil.

² Artigo científico, Journal of Water and Health, "in press".

Abstract

Giardia spp. and *Cryptosporidium* spp. are recognized worldwide as highly infectious protozoan parasites that can cause severe gastrointestinal disease in humans and animals. The detection of these pathogens in activated sludge samples becomes interesting since there is an increasing trend for the use of sewage sludge (biosolids) in agriculture. A total of 22 samples were collected and evaluated by means of centrifugal-concentration, followed or not by a purification process (ether clarification and sucrose flotation). Student t tests for comparison of the two procedures indicated a higher recovery rate of *Giardia* cysts with centrifugal-concentration; regarding *Cryptosporidium* oocysts, no significant differences were found between the methods, as only two samples were positive. The centrifugal-concentration procedure was shown to be the simplest and cheapest to perform, as emphasized by the efficiency recovery results.

Keywords: centrifugal-concentration, *Cryptosporidium*, *Giardia*, recovery, sewage sludge.

Introduction

Giardia spp. and *Cryptosporidium* spp. are recognized worldwide as highly infectious protozoan parasites that can cause severe gastrointestinal disease in humans and animals (Armon *et al.*, 2002, Rose, 2002). In recent years, the presence of these parasites has been usually reported in superficial waters and sewage samples (Armon *et al.*, 2002), in many countries.

Sewage sludge is a by-product of the activated sludge treatment; it contains an elevated mixture of organic and inorganic compounds and, because of this, a growing trend for application of this treated sewage residue in agricultural land zones has emerged. During wastewater treatment by this process, cysts and oocysts are sedimented in the sludge. Meanwhile, the presence of these protozoa has implications concerning sewage sludge reuse (Armon *et al.*, 2002). Consequently, it is important to quantify the presence of (oo)cysts associated with the practice of sludge application in agriculture and more accurate detection and quantification methods are necessary.

This study was designed to assess the occurrence of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in activated sludge samples and to compare two methods of (oo)cysts concentration: centrifugal-concentration procedure (CC) and centrifugal-concentration followed by a purification and clarification technique (CC/PC).

Materials and Methods

Sampling site

The city of Campinas is located in the southeastern region of Brazil (22°53'20"/W 47°04'40"), with a population of about 1 million inhabitants (IBGE, 2000). The Samambaia Sewage Treatment Plant, situated in a suburb of the eastern region of the city, serves a 40,000 population (SANASA, 2003) and receives only domestic inputs with an average outflow of 98 L/s.

Sample collection

Activated sludge samples (n = 22) were collected every fifteen days (January to November 2003) in plastic PVC bottles, previously decontaminated and washed with 0.1% Tween-80 elution solution. All the samples were immediately sent to the laboratory for analysis.

Sample Concentration and Purification

Each sample was vigorously homogenized and filtered through a plastic sieve with 1.0 mm² pore size. Afterward, it was divided into two aliquots for parasitological analysis, using two different concentration methods (described below), adapted from Robertson *et al.* (2000). The modifications included the initial sample volume effectively submitted to centrifugation (5 mL in this study), initial sieving performed with a plastic mesh instead of muslin and introduction of vortex mixing steps during sample processing and previously to aliquot removal for immunofluorescence assay (IFA).

Centrifugal - concentration (CC): The 5 mL aliquot was submitted to continuous centrifugation after dilution with 10 mL of elution solution (1500 x g; 15 min) during

the deceleration phase. The supernatant was discharged and a pellet of 1 mL was left at the bottom of the tube and an aliquot of the resulting sediment (after vortex mixing during 2 minutes; Phoenix® Model AP 56) was analyzed by IFA.

Centrifugal - concentration followed by purification and clarification (CC/PC): The second one was also obtained through the initial process of centrifugation with elution solution. After supernatant discharge, the resulting sediment was successively submitted to the sucrose solution purification step and ethylic ether clarification. The tube was brought to volume (15 mL) with sucrose-saturated solution (specific gravity=1.2), vortex homogenized (2 min) and centrifuged (1500 x g, 15 min). The supernatant was collected, placed in clean tubes and washed three consecutive times with distilled water (dH₂O) (1050 x g, 10 min). Finally, the supernatant was discharged, the pellet resuspended to 1 mL in dH₂O and later analyzed. The residual sediment that remained at the tube bottom (after superficial layer collection) was defatted by adding 5mL of refrigerated ethylic ether. After vigorous manual shaking (30 sec), the tube content was brought to volume with dH₂O, homogenized by vortex mixing and centrifuged again (1050 x g, 10 min). The supernatant, including fat and ethylic ether were aspirated out and the resulting sediment was resuspended to 1 mL with dH₂O and analyzed as described below.

Staining for immunofluorescence

Both methodologies examined 5µl aliquots of the final sediment, removed immediately after sample vortex mixing (two minutes) and inversion of the microcentrifuge tube three times (for sample homogenization purposes), using the

Merifluor kit (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio) in accordance with the manufacturer's instructions. The (oo)cysts considered were those that fluoresced bright apple green when viewed under light with a wavelength of 450-490nm and that presented the characteristic morphological features.

Positive Control Trials

Positive control trials were carried out to evaluate the sensitivity of the methodology. *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. suspensions provided by the Merifluor® kit as positive staining controls were pooled for use in spiking controls. Therefore, an estimated number of *Giardia* cysts (magnitude order: 10^2) and *Cryptosporidium* oocysts (magnitude order: 10^3) determined by the well slide counting technique were seeded in the activated sludge samples (previously determined negative by the IFA assay). The samples were allowed to stand for two hours and then analyzed by the same procedures described above.

Data analysis

In order to estimate the number of (oo)cysts per liter (X), the following equation was used:

$$X = \frac{\alpha \times \beta}{\gamma \times \delta} \quad (1)$$

where α is the number of (oo)cysts multiplied by 10^6 , β is the total sediment volume (mL), γ is the sediment volume in the well (μ L) and δ is the sample volume (mL).

In the case of the CC/PC method, the number of (oo)cysts visualized in the sample corresponded to the total of separately visualized organisms in the steps of sucrose flotation and ether clarification. For comparison between different

procedures (CC and CC/PC) and different periods (January to June and July to November), Student t tests were carried out using the Excel package ($H_0: \mu_{cc} \geq \mu_{cc/pc}$; $H_a: \mu_{cc} < \mu_{cc/pc}$ and $H_0: \mu_{cc} > \mu_{cc/pc}$; $H_a: \mu_{cc} < \mu_{cc/pc}$, respectively) (Zar, 1999). A p-value of < 0.05 was considered significant.

Levels of (oo)cyst recovery efficiency (Y) were calculated in the following way:

$$Y = \frac{\alpha \times 100}{\beta} \quad (2)$$

where α is the number of recovered (oo)cysts and β , the total number of (oo)cysts inoculated in the sample (5 mL).

Results and Discussion

Data on sludge microbiological quality are scarce in developing countries (Jiménez *et al.*, 2002) due to the lack of a standardized methodology for recovery of these protozoa in sewage (Clancy and McCuin, 2003). The techniques that have been traditionally developed and optimized for enumeration of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in water are generally not suitable for (oo)cysts enumeration in sewage; the great difficulty is related to the large concentration of particulate material present in sewage (McCuin and Clancy, 2005). Thus, the critical point is the adequate separation and recovery of these parasites from the matrix rich in particles.

When CC was used, all the samples (100%, n=22) were positive for *Giardia* spp. cysts, while in relation to CC/PC, the positive rate was 95.4% (21 samples).

The presence of *Cryptosporidium* spp. oocysts was registered in two samples (9.0%) using CC technique and no oocysts were detected when the CC/PC protocol was used.

The average values of (oo)cysts per liter determined in this study (Tab. 1 and Tab. 2) corroborate those presented by Santos *et al.* (2004), who had also compared two other methodologies: ether clarification (*Giardia*: 8.0×10^4 cysts/L to 1.3×10^6 cysts/L; *Cryptosporidium*: 0 to 4×10^4 oocysts/L) and sucrose flotation (*Giardia*: 8×10^4 cysts/L to 1.2×10^6 cysts/L; *Cryptosporidium*: of 0 to 8×10^4 oocysts/L) separately. In this study, the combined procedure (CC/PC) included the ether clarification and sucrose flotation steps. Other studies in Brazil that examined raw and treated sewage samples revealed a higher density variation of these organisms per liter: Dias Júnior (1999) observed 2,222 cysts/L and 472 oocysts/L in effluent samples and Farias *et al.* (2002) reported 80 to 912 oocysts/L in raw sewage.

Considering the (oo)cyst recovery efficiency rate achievable by the combined procedure (CC/PC), in the first period of this study (Table 1) a modification was introduced with the aim of improving the method: all the supernatant volume was collected in the flotation stage in sucrose saturated solution, instead of only the 3 mL on the surface. Because of this, the results were analyzed separately for the first (January to June) and the second periods (July to November) and Student t test was used to evaluate whether such change caused better (oo)cyst recovery.

The number of (oo)cysts/L and the average value are shown in Table 1, for the first period (*Giardia* spp. range: 0 – 3.6×10^5 cysts/L; *Cryptosporidium* spp. range: 0 – 4.0×10^4 oocysts/L) and in Table 2, for the second period (*Giardia* spp. range: 4.0×10^4 – 4.8×10^5 cysts/L; *Cryptosporidium* spp. range: 0 – 4.0×10^4 oocysts/L), considering both procedures together.

The average value for the number of *Giardia* spp. cysts recovered by CC was higher when compared to the CC/PC, in the first period (for $t_{0,05 (1), 20} = 1.725$) (Zar, 1999). In relation to the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts, there was no significant difference between CC and CC/PC because only one sample was positive (CC).

The average value of the number of cysts recovered by CC was greater than those recovered by CC/PC, in the second period (for $t_{0,05 (1), 20} = 1,725$) (Zar, 1999). There was no significant difference between CC and CC/PC, with regard to the detection of oocysts, because only one sample was positive (CC).

The average *Giardia* spp. number of cysts recovered by CC/PC in the second period was greater when compared to the first one and this difference was significant (for $t_{0,05 (1), 22} = 1.717$) (Zar, 1999). The recovery efficiency levels for each period are shown in Table 3.

The high concentration of cysts found in activated sewage samples can be explained by the fact that giardiasis is considered one of the main intestinal parasitic diseases of man, particularly in developing countries (Thompson, 2000). It is endemic in Brazil: prevalence rates range between 13.8 and 63.3% for children (Rocha *et al.*, 1999). Another reason for this high concentration found could be the fact that in Campinas only 37% of the sewage were treated and discharged into the

water bodies, contributing to source contamination (SANASA, 2006). As regards *Cryptosporidium* spp., the lesser positive rate found in this study could be related to the marked seasonality shown by cryptosporidiosis in Brazil associated with great rainfall periods (Rose *et al.*, 2002). Other problems that could have affected recovery efficiency are oocyst adsorption onto particulate matter by means of interactions such as hydrophobicity, surface charges characteristic of the particle and the oocyst, ionic strength and matrix pH (Chesnot and Schwartzbrod, 2004).

In control trials, most studies involve the addition of (oo)cysts to samples in quantities that are several orders of magnitude higher than background levels (10^4 and to 10^5) (Massanel-Nicolau, 2003). In this study, the purpose was to assess the recovery procedure potentials with inoculation of these resistance forms in the order of 10^2 for cysts and 10^3 for oocysts, a more realistic condition. Thus, the goal of this study was to minimize organism losses using minimal manipulation in the first procedure (centrifugal-concentration) and to maximize impurity removal with the combination of two stages of purification (sucrose flotation and ether clarification) in the same procedure; therefore, we obtained lower percentages of recovery with the sucrose flotation step due to the higher viscosity characteristic of this solution that contributes to the loss of (oo)cysts.

Chesnot and Schwartzbrod (2004) conducted research with ether and found that increased centrifugation and washing steps could jeopardize recovery. In the case of CC/PC, the results obtained in the first period suggested that supernatant aspiration, during the sucrose flotation stage, constituted a critical step. The modified procedure resulted in greater recovery efficiency, with regard to *Giardia* cysts, which was noted in the higher average number of cysts attained in the

second period (Tab. 2); there was no difference for oocysts due to the low number of positive samples. The recovery efficiency means obtained showed that the introduction of modifications in the sucrose flotation protocol brought about improvement for the second period (Tab. 3).

The simplicity of the proposed procedure (centrifugal – concentration) and the recovery efficiency obtained suggest that this method is preferable due to its low cost and manipulation level. Methods such as IMS (immunomagnetic separation) have been proposed for sewage samples (Iacovsky *et al.*, 2004), but it is too expensive for routine work in Latin America. It would be interesting to carry out further study to develop methodologies that are not so costly and could be applied in routine laboratory procedures.

Conclusions

- The great amount of particulate matter makes it difficult to standardize a technique for *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts recovery from sewage samples.
- The proposed technique of centrifugal-concentration was shown to be an interesting alternative for its simplicity, low manipulation level and acceptable recovery efficiency.
- Future works must focus on the possibility of developing a technique that allows adequate separation of the particles from the matrix, the critical point for sewage samples. A possibly helpful step would be to change the elution

solution by the addition of TRIS, a salt that might facilitate adequate separation of *Cryptosporidium* oocysts from the matrix.

Acknowledgements

The authors would like to thank FAPESP (Foundation of Research Protection of São Paulo State) for sponsoring the project.

REFERENCES

- Andreoli, V.A. and Carneiro, C. 2002. Evaluation of the vertical behavior of organic nitrogen, amoniacal nitrogen and pH in windrows of limed sewage (Avaliação do comportamento vertical de nitrogênio orgânico, nitrogênio amoniacal e pH em leiras de lodo de esgoto calcado). Sanare. Rev. Téc. da Sanepar, 18 (18): 63 – 70.
- Armon, R.; Gold, D.; Brodsky, M. and Oron, G. 2002. Surface and subsurface irrigation with effluents of different qualities and presence of *Cryptosporidium* oocysts in soil and on crops. Wat. Sci. Tech., 46 (3): 115 – 122.
- CETESB - Company of Technology of Environmental Sanitation (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 1999. Application of sewage sludge from biological handling systems in agricultural areas: criteria for project and operation: Technical Manual, Norm P 4230. (Aplicação de lodos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas: critérios para projeto e operação: Manual Técnico, Norma P 4230). São Paulo, SP.
- Chesnot, T. and Schwartzbrod, J. 2004. Quantitative and qualitative comparison of density-based purification methods for detection of *Cryptosporidium* oocysts in turbid environmental matrices. J. Microbiol. Methods, 58: 375 – 386.
- Clancy, J.L. and Mccuin, R.M.; 2003. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* in wastewaters in the U.S. WQTC Conference.
- Dias Júnior, O. 1999. Occurrence of *Giardia* sp cysts and *Cryptosporidium* sp oocysts in superficial waters and sewage from Araras city – SP. (Ocorrência de cistos de *Giardia* sp e oocistos de *Cryptosporidium* sp em águas superficiais e esgoto no município de Araras – S.P). PhD Thesis, Mackenzie University, 110 pp.
- Farias, E.W.C.; Gamba, R.C. and Pellizari, V.H. 2002. Detection of *Cryptosporidium* spp. in raw and creek water in the city of São Paulo, Brazil. Braz. J. Microbiol., 33: 41-43.

Iacovsky, R.B.; Barardi, C.R.M. and Simões, C.M.O. 2004. Detection and enumeration of *Cryptosporidium* sp. oocysts in sewage sludge samples from the city of Florianópolis (Brazil) by using immunomagnetic separation combined with indirect immunofluorescence assay. *Waste Manage. Res.*, 22: 171 – 176.

IBGE – Brazilian Institute for Geography and Statistics (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2000. National Research of Basic Sanitation. www.ibge.gov.br/estatistica/populacao/condicadevida/pnsb/default.shtm. (Accessed in January, 2006).

Jiménez, B.; Maya, C.; Sánchez, E.; Romero, A.; Lira, L. & Barrios, J. A. 2002. Comparison of the quantity and quality of the microbiological content of sludge in countries with low and high content of pathogens. *Wat. Sci. Tech.*, 46 (10): 17 – 24.

Massanet-Nicolau, J. 2003. New method using sedimentation and immunomagnetic separation for isolation and enumerations of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (11): 6758 – 6761.

McCuin, R.M. and Clancy, J.L. 2005. Methods for the recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocysts in wastewaters. *J. Microbiol. Methods*, 63 (1): 73 – 88.

Robertson, L.J.; Paton, C.A; Campbell, A.T.; Smith, P.G.; Jackson, M.H.; Gilmour, R.A; Black, S.E.; Stevenson, D. A and Smith, H.V. 2000. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. *Wat. Res.*, 34(8): 2310-2322.

Rocha, M.O.; Mello, R.T.; Guimarães, T.M.P.D.; Toledo, V.P.C.P.; Moreira, M.C.C.G. and Costa, C.A. 1999. Detection of a *Giardia lamblia* coproantigen by using a commercially available immunoenzymatic assay, in Belo Horizonte, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 41 (3): 151 – 154.

Rose, J. B; Huffman, D.E. and Gennaccaro, A. 2002. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26: 113 – 123.

SANASA - Sanitation and Water Supplying Society (Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A). (www.sanasa.com.br). Accessed in February, 2006.

Santos, L.U.; Bonaffi, T.R.; Cantusio Neto, R. and Franco, R.M.B. 2004. Occurrence of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 46 (6): 309 – 313.

Silva, F.C.; Boaretto, A.E.; Berton, R.S.; Zofelli, H.B.; Pexe, C.A. and Bernardes, E.M. 2001. Effect of sewage sludge in an ultisol and on growth and nutrition of

maize. (Efeito de lodo de esgoto na fertilidade de um Argissolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-de-açúcar). *Pesq. Agropec. Bras.*, 36 (5): 831-840.

Thompson, R.C.A. 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.*, 30: 1250 -1267.

Zar, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall. 929 pages. Upper Saddle River, New Jersey. 4th edition.

Table 1. Number of (oo)cysts per liter in activated sludge samples, collected at Samambaia STP, Campinas, Brazil Southeastern Region, determined by Centrifugal - Concentration (CC) and Centrifugal - Concentration followed by purification and clarification (CC/PC), for the first period (January to June).

| Technique | CC | | CC/PC | | |
|-------------|--------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| | Sample | <i>Cryptosporidium</i> spp. | <i>Giardia</i> spp. | <i>Cryptosporidium</i> spp. | <i>Giardia</i> spp. |
| 1 | | 0 | 1.6x10 ⁵ | 0 | 1.2x10 ⁵ |
| 2 | | 0 | 4.0x10 ⁴ | 0 | 0 |
| 3 | | 0 | 2.0x10 ⁵ | 0 | 8.0x10 ⁴ |
| 4 | | 0 | 2.0x10 ⁵ | 0 | 1.6x10 ⁵ |
| 5 | | 0 | 8.0x10 ⁴ | 0 | 4.0x10 ⁴ |
| 6 | | 0 | 3.2x10 ⁵ | 0 | 8.0x10 ⁴ |
| 7 | | 0 | 3.6x10 ⁵ | 0 | 1.6x10 ⁵ |
| 8 | | 0 | 1.6x10 ⁵ | 0 | 1.6x10 ⁵ |
| 9 | | 4.0x10 ⁴ | 2.4x10 ⁵ | 0 | 2.4x10 ⁵ |
| 10 | | 0 | 2.4x10 ⁵ | 0 | 2.4x10 ⁵ |
| 11 | | 0 | 1.2x10 ⁵ | 0 | 1.6x10 ⁵ |
| <i>Mean</i> | | 3.6x10 ³ | 1.9x10 ⁵ | 0 | 1.3x10 ⁵ |
| <i>SD*</i> | | 1.1 x10 ³ | 9.1x10 ⁴ | 0 | 7.2x10 ⁴ |

*SD: Standard Deviation

Table 2. Number of (oo)cysts per liter in activated sludge samples, collected at Samambaia STP, Campinas, Brazil Southeastern Region, determined by Centrifugal - Concentration (CC) and Centrifugal - Concentration followed by purification and clarification (CC/PC), for the second period (July to November).

| Technique | CC | | CC/PC | |
|-----------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| | <i>Cryptosporidium</i> spp. | <i>Giardia</i> spp. | <i>Cryptosporidium</i> spp. | <i>Giardia</i> spp. |
| Sample 12 | 0 | 3.6×10^5 | 0 | 1.6×10^5 |
| 13 | 4.0×10^4 | 3.6×10^5 | 0 | 4.4×10^5 |
| 14 | 0 | 4.0×10^5 | 0 | 4.0×10^4 |
| 15 | 0 | 4.4×10^5 | 0 | 2.4×10^5 |
| 16 | 0 | 2.0×10^5 | 0 | 2.8×10^5 |
| 17 | 0 | 2.4×10^5 | 0 | 4.8×10^5 |
| 18 | 0 | 4.4×10^5 | 0 | 2.8×10^5 |
| 19 | 0 | 3.2×10^5 | 0 | 2.4×10^5 |
| 20 | 0 | 2.0×10^5 | 0 | 2.4×10^5 |
| 21 | 0 | 2.0×10^5 | 0 | 2.4×10^5 |
| 22 | 0 | 2.4×10^5 | 0 | 8.0×10^4 |
| Mean | 3.6×10^3 | 3.0×10^5 | 0 | 2.4×10^5 |
| SD* | 1.1×10^3 | 9.6×10^4 | 0 | 1.3×10^5 |

*SD: Standard Deviation

Table 3. Recovery efficiency means following positive control trials with *Giardia* spp and *Cryptosporidium* spp, for both periods.

| Period | Method | Protozoan | Mean Recovery (%) | SD ^c | RSD ^d |
|--------|--------------------|------------------------|-------------------|-----------------|------------------|
| I | CC ^a | <i>Giardia</i> | 5.55 | 0.77 | 13.87 |
| | | <i>Cryptosporidium</i> | 1.25 | 1.7 | 136 |
| | CC/PC ^b | <i>Giardia</i> | 0 | 0 | 0 |
| | | <i>Cryptosporidium</i> | 0 | 0 | 0 |
| II | CC | <i>Giardia</i> | 43.7 | 31.6 | 72.31 |
| | | <i>Cryptosporidium</i> | 13.6 | 12.8 | 94.11 |
| | CC/PC | <i>Giardia</i> | 19.7 | 17.6 | 89.34 |
| | | <i>Cryptosporidium</i> | 6.3 | 10.5 | 166.66 |

^a CC: Centrifugal - concentration

^b CC/PC: Centrifugal - Concentration followed by purification and clarification

^c SD: Standard Deviation

^d RSD: Relative Standard Deviation