

II-271 - QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE CISTOS DE *GIARDIA* E DE OOCISTOS DE *CRYPTOSPORIDIUM* EM LODO DE ETE.

Raphael Corrêa Medeiros⁽¹⁾

Engenheiro Ambiental pela Universidade Federal de Viçosa - MG. Mestre em Ciências - Hidráulica e Saneamento - pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). Doutorando em Ciências - Hidráulica e Saneamento na EESC/USP.

Luiz Antonio Daniel

Professor Doutor do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo - SHS/EESC/USP, São Carlos/SP. Brasil.

Endereço⁽¹⁾: Av. Trabalhador São-Carlense, 400. São Carlos -SP - CEP: 13566-590 - Brasil - Tel: (16) 3373-9558 - e-mail: medeiroscg@yahoo.com.br

RESUMO

Com vista à utilização de subprodutos do tratamento de esgoto sanitário, a questão microbiológica do lodo é extremamente importante, pois revela riscos diretos e indiretos quanto a sua manipulação e uso inadequados. Neste trabalho houve a quantificação e avaliação da viabilidade de (oo)cistos de protozoários patogênicos em lodo de ETE, a partir da utilização de reação de imunofluorescência direta (RID) e do corante vital iodeto de propídeo. Dez amostras de lodo foram coletadas de um sistema de lodos ativados, operado inicialmente em aeração prolongada e depois para modo convencional. Foram encontradas concentrações de quase 4 mil cistos de *Giardia* e de até 129 oocistos de *Cryptosporidium* por grama de lodo; além média acima de 80%. Os resultados suscitam preocupação quanto à utilização e descarte de lodo sem tratamento adequado.

PALAVRAS-CHAVE: Lodo de esgoto, viabilidade, *Giardia*, *Cryptosporidium*.

INTRODUÇÃO

Durante o tratamento biológico de esgoto doméstico por Lodos Ativados, os micro-organismos, devido à separação entre os sólidos e o esgoto tratado no decantador secundário, são concentrados no lodo, o que o torna uma fonte potencial de organismos infecciosos (USEPA, 2003; Romdhana et al., 2009). Este lodo, quando devidamente tratado, passa a ser chamado biossólido (USEPA, 2003).

Konoté et al. (2013) advertem sobre o acúmulo de cistos e oocistos de protozoários, bem como ovos de helmintos no lodo em lagoa anaeróbia, facultativa e de maturação, com concentrações de até 120 cistos de protozoários - *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* - por grama.

Apesar de os protozoários patogênicos *Giardia* e *Cryptosporidium* possuírem baixa dose infectante e serem resistentes a condições adversas do ambiente (USEPA, 2003; Bonatti, 2007), não são produto de caracterização do lodo quanto à presença de agentes patogênicos, segundo a Resolução CONAMA 375 (2006), exceto quando solicitado por órgão ambiental competente.

Este trabalho teve por objetivo analisar a presença e verificar a viabilidade de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em lodo de esgoto sanitário de um sistema de lodos ativados, operado em aeração prolongada e de modo convencional.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de lodo de esgoto foram coletadas da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) do Campus da Universidade de São Paulo, na cidade de São Carlos, São Paulo. Ela possui tratamento preliminar, seguido de reator UASB, com 18,8 m³, o qual possui tempo de detenção hidráulica de 12 horas, e sistema de tratamento por Lodos Ativados, cujo tanque de aeração possui 1,2 m³, seguido de decantador. Esse último sistema foi

operado com dois tempos de residência celular (TRC), 20 e 7 dias, vindo a caracterizá-lo como aeração prolongada e convencional, respectivamente.

Para o estudo foram retiradas amostras da linha de retorno de lodo do sistema de lodos ativados, em frascos previamente lavados, desinfetados e enxaguados com solução Tween 80 (0,1%).

Em seguida, 50 mL da amostra foi centrifugado a 1500 x g, por 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e descartado. Ao pellet final, com menos de 5 mL, são adicionados 10 mL de solução Tween 80 (0,1%). Após homogeneização em vórtex por 30 segundos, houve nova centrifugação (1500 x g, 15 min.), com retirada e descarte de sobrenadante. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de água deionizada e outra homogeneização em vórtex. Após a terceira centrifugação, o sobrenadante foi retirado e descartado, sendo deixado o pellet de 5 mL, o qual foi levado ao vórtex e mantido "overnight" a $7,5 \pm 2,5$ °C.

A partir de duas alíquotas de 10 µL de pellet por amostra, a enumeração de cistos e oocistos foi realizada por reação de imunofluorescência direta (RID) com utilização de kit Merifluor (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio), seguindo protocolo do fabricante.

A viabilidade dos cistos e oocistos foi inferida através da coloração diferencial com iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, USA). Esse reagente, responsável pela emissão de fluorescência vermelha ($\lambda = 510$ a 550 nm), penetra apenas nos microrganismos com membrana danificada (células mortas). As amostras foram examinadas em microscópio de imunofluorescência (Olympus BX51) sob aumento de 400X a 800X.

Para o cálculo da concentração de (oo)cistos por grama de lodo, foi utilizada a seguinte equação, modificada de Bonatti (2007).

$$N^{\circ} \text{ (oo)cistos por grama} = \frac{n^{\circ} \text{ de (oo)cistos contabilizados na lâmina}}{VSL \times MA \times VSF \times 10^{-3}}$$

VSL = volume de sedimento examinado na lâmina (10 µL)

MA = massa da amostra (g)

VSF = volume de sedimento final (5 mL)

A análise estatística dos dados encontrados foi realizada utilizando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc, 2004). Os dados, quando necessários, foram transformados para apresentarem

distribuição normal, a qual foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. A homogeneidade de variância foi verificada através do teste de Levene e para comparação de médias foi aplicado o teste t de Student.

RESULTADOS

Foram realizadas cinco coletas de lodo para cada tempo de residência celular, cujas contagens médias de cistos e oocistos estão reportadas na tabela 1.

Tabela 1: Quantificação de protozoários patogênicos em lodo de esgoto ((oo)cistos/grama)

	Aeração Prolongada		Convencional	
	<i>Giardia</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.
	560	n.d.	673	n.d.
	1352	129	2257	n.d.
	539	63	2418	82
	846	17	681	31
	3286	71	3752	n.d.
Média Aritmética	1317	70*	1956	57*

Nota: n.d.: não detectado (quantidade menor que o limite de detecção do método). * Média das amostras nas quais ocorreram quantificação de oocistos.

Pode-se observar que cistos de *Giardia* foram encontrados em 100% (10/10) das amostras analisadas, enquanto que oocistos de *Cryptosporidium* em 60% (6/10) delas, resultados superiores aos encontrados por Bonatti (2007). Porém, com relação à apenas *Cryptosporidium*, foi menor se comparada às porcentagens de amostras positivas deparadas por Iacovski et al. (2004). Houve diferença estatística entre a concentração de cistos e a de oocistos, p-valor menor que 0,05. No entanto, não foram verificadas diferenças entre as concentrações de (oo)cistos, ao se comparar o sistema operado em aeração prolongada e de modo convencional (p-valor = 0,4175).

Os resultados mostram ainda concentração expressiva de cistos e oocistos no lodo, superiores aos dados encontrados por Graczyk et al. (2008) de aproximadamente 27 cistos de *Giardia* e 14 oocistos de *Cryptosporidium* por grama de lodo de ETE; no entanto, próximos aos de Bonatti (2007), de até 4800 cistos de *Giardia* por grama e de Gerba et al. (2011), cujas concentrações se mostraram: para *Giardia*, de 10 a 1000 cistos por grama e *Cryptosporidium*, de 100 a 2000 oocistos por grama.

Segundo Iacovski et al. (2004), a variação tanto da concentração de cistos e oocistos, quanto da porcentagem de amostras positivas depende das características da população, como por exemplo, o nível de infecção, servida pela ETE.

Com relação à viabilidade dos oocistos de *Cryptosporidium*, para o TRC de 20 dias, 88% se apresentaram viáveis, enquanto que para o TRC de 7 dias, 100%. A viabilidade dos cistos de *Giardia* pode ser verificada na figura 1.

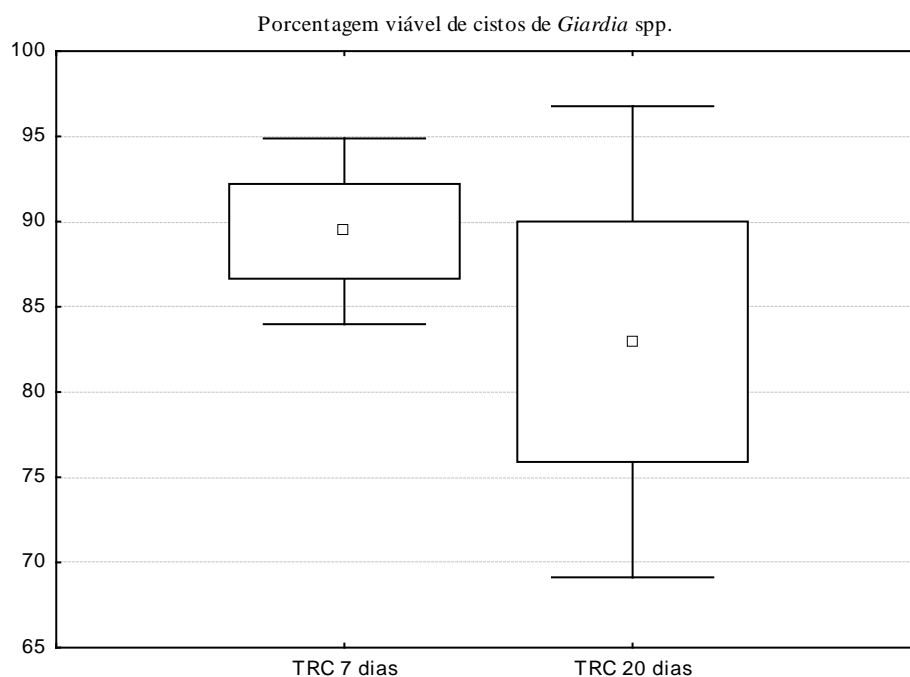


Figura1: Viabilidade de cistos de *Giardia* spp. em lodo de esgoto.

Os resultados encontrados suscitam preocupação devido à potencial contaminação do lodo destinado à aplicação no solo, sendo necessário tratamento. Como um dos principais destinos do lodo de esgoto é o uso na agricultura, devem ser ressaltados os riscos diretos e indiretos, como: contaminação do solo, da água, das plantações, etc. Além disso, deve-se atentar ao manejo do lodo para preservar a saúde dos trabalhadores e outras populações expostas.

CONCLUSÕES

A mudança de operação do sistema de lodos ativados, de aeração prolongada para convencional não ocasionou diferença na concentração de (oo)cistos dos protozoários pesquisados e nem de sua viabilidade.

As concentrações de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* ressaltam riscos à Saúde Pública caso ocorra utilização de lodo de esgoto sem tratamento, pois grande parte ainda se encontra viável, podendo se dispersar no solo, na água superficial e subterrânea, com potencial contaminação de pessoas e animais.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Tratamento Avançado e Reúso de Águas (LATAR) e à FAPESP pela bolsa de Doutorado (processo 2010/07902-1) e apoio financeiro (processo 2011/08653-8 e processo 2012/50522-0).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bonatti, T.R. (2007). Ocorrência de cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Cryptosporidium* spp. e ovos da família *Ascarididae* em amostras de lodo de esgoto. 157p. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP.
2. Gerba, C.P.; Tamimi, A.H.; Pettigrew, C.; Weisbrod, A.V.; Rajagopalan, V. (2011). Sources of microbial pathogens in municipal solid waste landfills in the United States of America. **Waste Management & Research**, 29(8), 781-790.
3. Graczyk et al. (2008). Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in sewage sludge and solid waste landfill leachate and quantitative comparative analysis of sanitization treatments on pathogen inactivation. **Environmental Research**, 106, 27-33.
4. Iacovski, R.B.; Barardi, C.R.M.; 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 Management & Research**, 22, 171- 176.
5. Konoté, Y.; Maiga, A.H.; Basset, D.; Casellas, C.; Picot, B. (2013). Parasite removal by waste stabilisation pond in Burkina Faso, accumulation and inactivation in sludge. **Ecological Engineering**, 50, 101-106
6. **Resolução CONAMA 375** (2006). Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências.
7. Romdhana et al. (2009). Monitoring of pathogenic microorganisms contamination during heat drying process of sewage sludge. **Process Safety and Environmental Protection**, 87, 377-386.
8. USEPA (2003). **Environmental Regulations and Technology** - Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge. EPA/625/R-92/013. Cincinnati, Ohio.