

# **ANÁLISE DA VIABILIDADE DE OVOS DE HELMINTOS EM AMOSTRAS DO CONTEÚDO DE FOSSAS E TANQUES SÉPTICOS**

**Yannice SANTOS (1); Dayana TORRES (2)**

(1) Instituto Federal do Ceará – Campus Juazeiro do Norte, Av. Aderaldo Plácido Castelo, 1646- Planalto.

Juazeiro do Norte – Ceará. CEP: 63.040-540, e-mail: yanzinha@yahoo.com.br

(2) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário, s/n. Lagoa Nova. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Laboratório de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental/LARHISA.

Caixa Postal 1524 - CEP 59072-970 Natal - RN, e-mail: dmelotorres@yahoo.com.br

## **RESUMO**

Diversos métodos para a quantificação de ovos de helmintos em águas residuárias são descritos na bibliografia especializada, cada um com suas vantagens e desvantagens. Para análise de amostras com altos teores de sólidos, como por exemplo, o conteúdo de fossas e tanques sépticos, a aplicação de um único método analítico pode não satisfazer a obtenção da verdadeira concentração dos ovos. A pesquisa teve como objetivo determinar o número de ovos de helmintos e sua viabilidade em amostras do conteúdo de fossas e tanques sépticos residenciais, com a inserção da fase de lavagem e retirada de impurezas do sedimento, elaborada por Zerbini & Chernicharo (2001), na metodologia de análise de viabilidade de helmintos proposta pela USEPA (2003). A fase inserida foi a adição do tampão aceto-acética e do acetato de etila. A introdução dessa etapa na metodologia da USEPA (2003) foi satisfatória, pois se percebeu visualmente a separação dos sedimentos impuros que não são desejados para a análise dos ovos nos tubos de centrífuga, que posteriormente poderia atrapalhar a contagem de ovos na câmara MacMaster durante a varredura no microscópio. Desta forma, a identificação dos ovos se tornou mais aferida por conta dos menores teores de sólidos (impurezas) durante a varredura. Das 24 residências analisadas, através da alíquota de 500 mL de amostra bruta do conteúdo de fossas e tanques sépticos foi possível encontrar concentrações que variaram entre 0 e 688 ovos, e viabilidade de 0 a 46 ovos viáveis.

**Palavras-chave:** ovos de helmintos, fossa, lodo, tanque séptico.

## 1 INTRODUÇÃO

Os helmintos constituem-se um dos organismos mais estudados na atualidade no âmbito do tratamento de esgotos, pois além da maioria desses organismos serem patogênicos, seus ovos podem ser utilizados como bons indicadores da eficiência do tratamento na remoção destes e de protozoários.

Diversos métodos para a quantificação de ovos de helmintos em águas residuárias são descritos na bibliografia especializada, cada um com suas vantagens e desvantagens. Alguns apresentam uma elevada porcentagem de recuperação, mas demandam grande tempo de análise; muitos não foram publicados em detalhes para permitir sua aplicação, ou suas taxas de recuperação não são conhecidas; alguns demandam reagentes químicos de custo muito elevado ou não são adequados para o uso em laboratórios com limitações de equipamentos; enquanto outros são capazes de recuperar apenas um número limitado de espécies (ZERBINI & CHERNICHARO, 2000).

A cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, tem 68% dos seus domicílios sem serviço de coleta de esgotos (CAERN, 2008). No Censo demográfico de 2000, 46,4% dos domicílios utilizavam fossas como meios de disposição dos efluentes gerados (IBGE, 2000), mas não se sabe certamente qual o tipo específico da disposição usada, se por fossa ou tanque séptico.

Muitos destes sistemas passam anos sem serem esgotados, e como são adotados pela população para receber efluentes principalmente sanitários, acredita-se que a concentração de ovos de helmintos seja muito significativa.

O conteúdo desses sistemas apresenta concentrações de matéria orgânica e de sólidos muito elevados e, portanto, dificulta a separação dos ovos na amostra. Logo, o presente artigo busca divulgar a experiência obtida ao inserir a etapa de remoção de impurezas, em amostras com altas concentrações de sólidos, não realizando assim dados comparativos com outras metodologias afins.

## 2 OBJETIVO

Determinar o número de ovos de helmintos e sua viabilidade em amostras do conteúdo de fossas e tanques sépticos residenciais, com a inserção da fase de lavagem e retirada de impurezas do sedimento elaborada por Zerbini & Chernicharo (2001), na metodologia de análise de viabilidade de helmintos proposta pela USEPA (2003).

## 3 METODOLOGIA

Foram visitadas 24 residências unifamiliares, sendo 10 fossas e 14 tanques sépticos, com configurações variadas, e coletadas amostras do conteúdo destes sistemas.

A amostragem foi realizada através da introdução de uma amostrador de coluna desenvolvido especificamente para a retirada de amostras que contemplasse uma coluna representativa contendo parcelas proporcionais da massa líquida, da espuma e dos sedimentos presentes no interior dos tanques sépticos (Figura 01).



**Figura 01: Partes do amostrador de coluna e sua utilização durante a amostragem em uma fossa residencial**

Inicialmente utilizou-se a metodologia aplicada pela USEPA (2003) acrescidas de adaptações oriundas das técnicas de Zerbini & Chernicharo (2001).

### 3.1 Etapas de Sedimentação e Lavagem do Sedimento

Foi retirada uma alíquota bem homogeneizada de 500 mL e transpassada para um cone de Imhoff acrescido de 200 mL de água destilada, e completado com solução 7X 1% (solução detergente) até atingir um volume final de 900 mL.

Após garantir boa homogeneização, com o auxílio do bastão de vidro, a amostra permaneceu em repouso por no mínimo 4 horas. Posteriormente foram feitas várias lavagens do sedimento, aspirando-se sempre o sobrenadante com um sifão, e em seguida adicionado solução de 7X. Essas sequências de sedimentações e lavagens auxiliaram na etapa de observação dos ovos, pois o sedimento tende a ficar relativamente mais clarificado.

Esta etapa é bastante trabalhosa pelo fato das amostras estudadas apresentarem concentração de sólidos muito elevada, não obstante, a quantidade de impurezas que escondem os ovos também é alta, o que dificulta o processo de separação dos ovos. Portanto, buscou-se reduzir ao máximo a presença desses interferentes.

Após sedimentação, o sobrenadante foi novamente aspirado, e o sedimento remanescente foi lavado, sob agitação magnética, com 300 mL de solução 7X 1% por 5 minutos. Em seguida, o sedimento foi colado em uma malha de 20 mesh e lavado com solução 7X 1% para remoção do material remanescente. Nesse material filtrado foi adicionado 7X 1% até atingir o volume de 900 mL. Manteve-se em repouso por mais 2 horas.

### 3.2 Etapas de Retirada de Impurezas e Separação do Sedimento Contendo os Ovos

Após sedimentação e aspiração do sobrenadante, o sedimento foi distribuído uniformemente em tubos de centrífuga de 15mL e centrifugados por 5 minutos. A técnica da USEPA (2003) recomenda que o sedimento seja passado para tubos com capacidade de 50 ml (figura 2). Contudo, como o laboratório não dispunha de tal vidraria, nem de uma centrífuga que comportasse um volume maior, fez-se uma adaptação utilizando um maior número de tubos, com menor volume de sedimento.



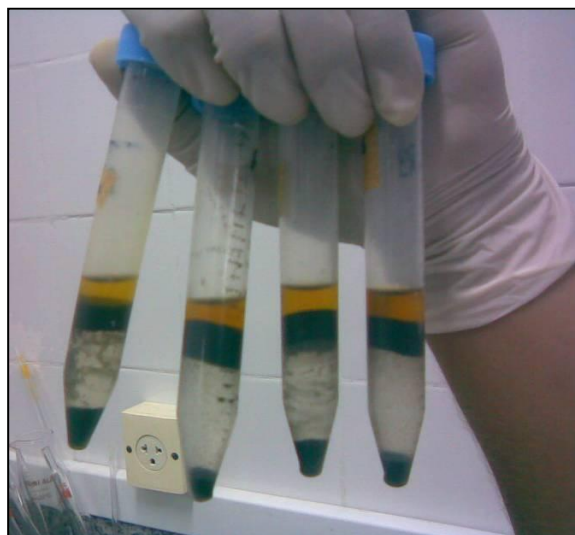
**Figura 02:** Utilização dos tubos de centrífuga de 15 mL ao invés dos tubos de 50 mL.

Depois de descartar o sobrenadante, foi verificado se em cada tubo o volume correspondia no máximo a 3 mL de sedimento ou menor que tal valor, caso contrário, o sedimento era redistribuído em novos tubos completados com água destilada e centrifugados novamente, a fim de se respeitar o volume máximo de 3mL em cada tubo de centrífuga.

O sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspenso. É nesta etapa em que ocorre a adaptação através das técnicas de Zerbini e Chernicharo (2001), pois as amostras de tanques sépticos e fossas por sua natureza apresentaram durante a pesquisa teores elevadíssimos de sólido totais (variando de 537 a 111.360 mg/L) e principalmente de sólidos sedimentáveis (variando de 5 a 1000 ml/L) o que dificultou bastante a separação do sedimento contendo os ovos das impurezas exigindo assim várias lavagens e principalmente a adição do tampão aceto-acético e do acetato de etila.

Portanto, a análise foi prosseguida com a adição de um volume equivalente ao dobro do sedimento, de solução tampão aceto-acético (pH 4,5). Nos casos em que o volume do sedimento eram inferiores a 2 mL, foi adicionado solução tampão até completar um volume de 4 mL para facilitar o descarte do sobrenadante sem provocar a ressuspensão do sedimento contendo os ovos. Além desse tampão, cada tubo teve adição de acetato de etila P.A correspondente também ao dobro do volume do sedimento.

O sedimento juntamente com a solução tampão aceto-acético e o acetato de etila foram homogeneizados no equipamento tipo vórtex e submetidos a centrifugação. Após a centrifugação de 15 minutos, verificou-se a formação de três fases no interior do tubo. Quanto maior a presença da fração de cor laranja, menor era o grau de impureza flotante. A Figura 03 ilustra tal fase.



**Figura 03: Fase acrescida na metodologia de contagem e viabilidade de ovos de helmintos para remoção de impurezas.**

O sobrenadante era descartado e em seguida adicionado um volume de solução de sulfato de magnésio (com densidade de 1,3) igual a 10 vezes o volume do sedimento, sendo posteriormente homogeneizado no vórtex. O sobrenadante contendo os ovos flotados era despejado em um papel filtro (14  $\mu$ m de poro) e filtrado. A membrana posteriormente era lavada com água destilada, de forma a remover todo o sedimento retido, e a água de lavagem transpassada para tubos de centrífugas de 15 ml e centrifugados por dois minutos.

O sobrenadante era descartado e, logo em seguida, eram adicionados 4 mL de solução de ácido sulfúrico 0,1N. Após, esse procedimento os tubos foram incubados em estufa microbiológica com temperatura ajustada para 26°C por 4 semanas. Em cada tubo era marcado o nível de solução do ácido sulfúrico 0,1N e tampados com plástico filme perfurado para circulação de ar.

### **3.3 Contagem e Análise de Viabilidade dos Ovos**

Após passados 28 dias, com auxílio de uma pipeta uma alíquota bem homogeneizada era retirada da amostra final, sendo a mesma diluída em ZnSO<sub>4</sub> (densidade de 1,20) numa proporção de 5 vezes o valor da alíquota.

A amostra diluída foi transferida para a câmara MacMaster, e examinada no microscópio, em objetivas de 10x ou 40x. Normalmente, eram visualizadas 3 câmaras por amostra, sendo realizada tanto a contagem (objetiva de 10x) quanto a viabilidade (objetiva de 40x) por meio da presença ou não de larva.

O restante da amostra bruta presente foi utilizada para a verificação da viabilidade total dos ovos, ou seja, esta visualização permitia obter uma porcentagem dos ovos viáveis frente aos inviáveis. Ainda no tubo, a amostra pode ser analisada em lâmina, por meio do seguinte procedimento:

- Completar o volume do tubo com  $\text{ZnSO}_4$  até a marca de 14 mL e centrifugar por 10 minutos;
- Retirar o tubo da centrifuga cuidadosamente e completar o volume total com  $\text{ZnSO}_4$  até a formação do menisco na superfície de abertura do tubo (é aconselhável acrescentar o  $\text{ZnSO}_4$  aos poucos, preferencialmente, pelas bordas da abertura do tubo, evitando ao máximo o revolvimento do material suspenso);
- Colocar uma lâmina em cima do tubo e aguardar 10 minutos;
- Retirar a lâmina com cuidado e cobri-la com lamínula e fazer a contagem dos ovos, bem como da presença ou não das larvas.

Essa técnica de contato com a lâmina foi adotada devido a recuperação dos ovos ser feita, praticamente, em sua totalidade, permitindo que o resultado corrobore aquele que foi obtido na câmara MacMaster e aumente a significância do resultado da viabilidade.

Os cálculos para a obtenção do número de ovos por litro na amostra são realizados por meio da Equação 01.

$$N_{(ovos/l)} = \frac{N^{\circ} \cdot VC \cdot VF}{AP} \quad [\text{Eq. 01}]$$

Onde:

N = Número de ovos por litro na amostra;

$N^{\circ}$  = Número médio de ovos contados na câmara Mac Máster;

VC = Volume da câmara em mL (câmara MacMaster com 0,5mL em cada grelha);

VF = Volume final da amostra que tinha no tubo que foi para incubadora;

AP = Amostra processada (500 mL).

*Note: Para se obter a quantidade de ovos viáveis faz-se uma regra de três relacionando o número total de ovos encontrados na câmara MacMaster, com o número de ovos viáveis observados no procedimento utilizando a lamínula. O resultado pode ser expresso em porcentagem ou em ovos viáveis por litro.*

## 4 RESULTADOS

A alíquota de 500 mL indicada pela USEPA (2003) foi representativa para a determinação dos ovos de helmintos, pois um volume maior que 500 mL inviabilizaria a análise, uma vez que a concentração de sólidos nesse tipo de amostra estudada é muito elevada além de ter colaborado com a limitação das vidrarias disponíveis no laboratório (os tubos de centrífugas de 15 mL ao invés do 50mL).

A introdução da etapa de lavagem e remoção de impurezas no sedimento, com o uso do tampão aceto-acético e o acetato de etila, proposta por Zerbini e Chernicharo (2001) na metodologia da USEPA (2003) foi satisfatória, pois se percebe visualmente (Figura 02) a separação dos sedimentos impuros que não são desejados para a análise dos ovos nos tubos de centrífuga. Este sedimento seria posteriormente transferido para a câmara MacMaster, a fim de se realizar a varredura no microscópio e contagem do número de ovos encontrados.

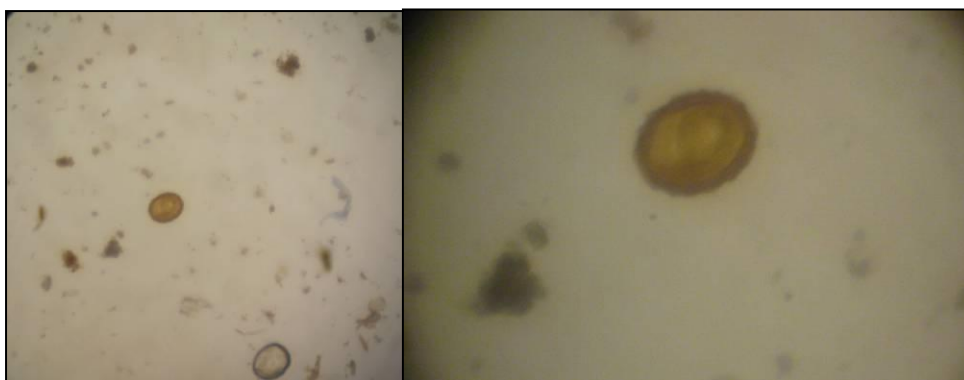
Desta forma, a identificação dos ovos se tornou mais aferida por conta dos menores teores de sólidos (impurezas) durante a varredura.

Das 24 residências analisadas, através da alíquota de 500 mL de amostra bruta do conteúdo de fossas e tanques sépticos foi possível encontrar as seguintes concentrações de ovos de helmintos e viabilidade apresentadas na Tabela 02.

**Tabela 02: Concentração de ovos de helmintos encontradas ao analisar 500ml de amostra proveniente de 24 residências**

<b>Estatística Descritiva</b>	<b>Helmintos (Nº ovos/L)</b>	<b>Viabilidade (%)</b>
<b>n</b>	24	24
<b>Média</b>	72,7	1,9
<b>Mediana</b>	9,2	0,0
<b>Máximo</b>	688	46
<b>Mínimo</b>	0	0

A seguir o registro fotográfico no momento da varredura, contagem e verificação da viabilidade de um ovo encontrado (Figura 3).



**Figura 3: Ovo de helminto viável encontrado na varredura.**

Embora o experimento não tenha sido comparado com resultados de outras metodologias de determinação dos ovos, é possível prever que caso a etapa de remoção das impurezas não tenha sido aplicada, poderia ter pedido muitos ovos durante o processo de lavagem, uma vez que o volume de sedimento gerado aumentaria consideravelmente.

Deve ser ressaltado que a vidraria disponível era restrita a um volume de 15 mL (tubo de centrífuga), o que demandou maior mão de obra nos procedimentos. Logo, esse trabalho foi válido no que diz respeito a divulgação de uma adaptação laboratorial para esse tipo de amostra.

A proposta futura após essa fase é a realização concomitante de duas ou mais técnicas de contagem dos ovos e análise de viabilidade, com o intuito de se buscar a eficiência em números da técnica proposta por este trabalho.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A fusão da etapa de lavagem e retirada das impurezas do sedimento elaborada por Zerbini e Chernicharo (2001) na metodologia de viabilidade de ovos de helmintos da USEPA (2003) facilitou a remoção de impurezas na amostra, otimizando assim a identificação da contagem e análise de viabilidade nas amostras analisadas.

O ideal seria utilizar tubos de centrífugas com capacidade de 50 mL para otimizar a distribuição dos sedimentos. No devido estudo só foram utilizados os tubos de centrífuga de 15 mL, pois eram as vidrarias que tinham disponíveis para análise.

## REFERÊNCIAS

CAERN- COMPANHIA DE ÁGUA E ESGOTO DO RIO GRANDE DO NORTE. Disponível em:  
<[www.caern.com.br/dadosdosistema](http://www.caern.com.br/dadosdosistema)>. Acesso em: 12 de fev. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Demográfico. 2000. Disponível em:  
<[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>. Acesso em: 4 jan. 2000.

USEPA. Environmental Regulations and Technology - Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge (Including Domestic Septage). Under 40 CFR Part 503. **Appendix I -Test Method for Detecting, Enumerating, and Determining the Viability of Ascaris Ova in Sludge**. p. 166, EPA/625/R-92/013, 2003. Disponível em  
<[www.epa.gov/ORD/NRMRL/pubs](http://www.epa.gov/ORD/NRMRL/pubs)>.

ZERBINI, A. M.; CHERNICHARO, C. A. L. Metodologias para quantificação, identificação e análise de viabilidade de ovos de helmintos em esgotos brutos e tratados. In: **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios**. CHERNICARO, C. A. L. (Coordenador). Projeto PROSAB. Belo Horizonte- MG. (2001) p. 71-107.