

AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DO FENO PRODUZIDO EM UM SISTEMA DE PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTE ANAERÓBIO POR DISPOSIÇÃO CONTROLADA NO SOLO

Bruno Coraucci Filho⁽¹⁾, Silvana Turolla Broleze⁽¹⁾, Ronaldo Stefanutti⁽¹⁾, Roberto Feijó de Figueiredo⁽¹⁾, Edson Aparecido Abdul Nour⁽¹⁾, Cláudia Brasil Vieira⁽¹⁾, Maria Rosa Mitsuko Ogawa⁽¹⁾, Marta Siviero Guilherme Pires⁽¹⁾ e Antonio Roberto Siviero⁽¹⁾

⁽¹⁾ *Depto. de Saneamento e Ambiente da Fac. Eng. Civil da UNICAMP
Caixa Postal 6021, CEP 13.081-970, Campinas/SP.
Email: bruno@fec.unicamp.br.*

RESUMO

A remoção de organismos entéricos presentes em águas residuárias (tratadas ou não) é uma preocupação geral, devido à resistência destes organismos no ambiente. Portanto, os critérios de reuso devem estar associados à redução de patógenos. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a qualidade sanitária do feno produzido a partir da cobertura vegetal do sistema de pós-tratamento de efluente anaeróbio por escoamento superficial, através do NMP de Coliformes totais e *Escherichia coli*, determinação de helmintos e protozoários no feno, para possível alimentação animal e manuseio. O sistema de escoamento superficial foi operado com a taxa de aplicação de 0,40m³/h.m, período de 8h/dia e frequência de 5 dias/semana. Após a gramínea atingir a fase de corte, foi ceifada, nas distâncias entre 0-5m (sem aplicação), 5-15m, 15-25m, 25-35m, 35-45m da cabeceira da rampa, e seca ao sol até o ponto de feno, devidamente armazenada para a realização das análises durante o período de 0 a 30 dias. Utilizou-se o método cromogênico, (AWWA, 1995) para a determinação de Coliformes totais e *E.coli*, e a metodologia de Oliveira e Germano (1992) para helmintos e protozoários no feno. Verificou-se num período de 30 dias a sobrevivência destes organismos no feno, podendo comprometer sua qualidade sanitária.

PALAVRAS CHAVE

Coliformes, helmintos, protozoários, esgoto sanitário, efluente anaeróbio, escoamento superficial

INTRODUÇÃO

Dentre os sistemas de tratamento de esgoto, o anaeróbio se caracteriza como um sistema de baixo custo de implantação, manutenção e operação, além de apresentar baixa produção de lodo. Entretanto, o seu efluente não atende ao padrão de lançamento previsto pela Legislação Brasileira ($DBO \leq 60 \text{ mgO}_2/\text{L}$ ou 80% de remoção), requerendo um tratamento complementar. O processo de disposição controlada no solo por escoamento superficial é um sistema alternativo de tratamento, possível de ser utilizado no pós-tratamento de efluente anaeróbio, de baixo custo de implantação, manutenção e operação, o qual apresenta boa eficiência na remoção da matéria

orgânica, fósforo e nitrogênio. Este sistema, isolado ou consorciado com outros sistemas, atende os padrões de lançamento de efluente em corpos d'água.

No sistema de escoamento superficial utiliza-se uma cobertura vegetal, a qual deve ser resistente à umidade, a teores elevados de matéria orgânica, e possíveis efeitos tóxicos do efluente (CORAUCCI FILHO, 1992; FIGUEIREDO, 1985; TERADA et al., 1985). A Tifton 85 (*Cynodon sp*) atende a estas exigências, caracterizando-se pela dominância sobre as espécies invasoras, boa remoção de N e P, maior número de cortes, melhor desenvolvimento sob condição de elevado teor de matéria orgânica, fechamento homogêneo e mais denso, maior produção de massa seca e uma recuperação mais rápida após o corte, podendo ser utilizada na alimentação animal (STEFANUTTI et al., 1999).

Na fase ideal para o corte, a gramínea é ceifada e passa por um processo de desidratação e secagem, até o ponto de feno. Antes da secagem e desidratação a umidade da planta deve estar entre 75 e 80% e ser reduzida a 15% no feno. As condições ambientais que favorecem a secagem são os dias ensolarados, pouca nebulosidade, baixa umidade relativa do ar, ocorrência de ventos e temperaturas elevadas. (COSTA, 1997).

A presença de helmintos no solo é preocupante, já que são resistentes e podem sobreviver por até 7 anos (EPA, 1992). Os ovos desses patógenos são considerados bons indicadores para avaliação da eficiência do processo de tratamento de um modo geral (JOHNSON et al., 1998).

De acordo com o ciclo de vida dos helmintos, os ovos fertilizados que são eliminados nas fezes do hospedeiro não são infecciosos até se tornarem embriões ativos. Quando se transformam dentro do ovo em larvas de segundo estágio, causam enfermidades. Os ovos ingeridos por um novo hospedeiro, liberam suas larvas no intestino delgado, continuando seu ciclo normal formando parasitas adultos. A etapa de desenvolvimento, desde a fase de embrião até larva infectiva, pode dar-se no solo ou nos cultivos, sendo capaz de permanecer durante anos sob condições ambientais adequadas (GALVÁN & VICTORIA, 1998). Sendo assim, os ovos de helmintos patogênicos são de grande risco para a saúde humana e animal, devido à alta frequência de parasitismo, ao maior tempo de sobrevivência no meio externo e a dose infectante (THOMAZ-SOCCOL, 1998).

Tabela 1 - Período de sobrevivência dos patógenos em produtos agrícolas e forragem para animais

Organismos	Produtos Agrícolas e Forrageiros	Tempo de Sobrevivência (dias)
Enterovírus	Raízes das plantas e folhas de vegetais	15-60
Ovos de <i>Ascaris</i>	Folhas de vegetais	27-35
<i>Entamoeba histolytica</i>	Folhas de vegetais	2-3
Coliformes totais	Folhas de vegetais	12-35

Fonte: BRAILE e CAVALCANTI (1993)

A presença de *Escherichia coli* (*E.coli*) em amostras ambientais é um importante indicador da possível presença de patógenos entéricos, os quais geralmente estão presentes em águas residuárias tratadas. Os critérios de reuso de águas residuárias tratadas, devem estar associados as condições sanitárias.

Tabela 2 - Microrganismos encontrados em esgoto doméstico não tratado

Organismos	Concentração – Número/ 100 mL
Coliformes totais	$10^5 - 10^6$
Coliformes fecais	$10^4 - 10^5$
Cistos Protozoários	$10^1 - 10^3$
Cistos <i>Giardia</i>	$10^{-1} - 10^2$
Cistos <i>Cryptosporidium</i>	$10^{-1} - 10^1$
Ovos Helmintos	$10^{-2} - 10^1$

Fonte: METCALF & EDDY (1991).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1989), um fator limitante para o reuso de efluentes na agricultura, é que o mesmo, não deve conter mais que um ovo de nematóide por litro, condição essencial para a saúde dos trabalhadores agrícolas e dos consumidores de vegetais.

Entre os organismos patogênicos conhecidos que podem perpetuar a relação homem-animal relacionados com o uso de feno para alimentação animal, produzido por este tipo de sistema, têm-se os helmintos das espécies *Taenia solium* e *Taenia saginata* (NEVES, et al, 2000).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar o número mais provável (NMP) de Coliformes totais e *Escherichia coli*, a quantificação e identificação de helmintos e protozoários no feno produzido a partir da cobertura vegetal do sistema de pós-tratamento de efluente anaeróbio por escoamento superficial.

METODOLOGIA

O sistema de pós-tratamento de efluente anaeróbio localiza-se na ETE Graminha, Município de Limeira, SP. É composto por 4 reatores anaeróbios de fluxo ascendente com enchimento de bambu, os quais operam com tempo de detenção hidráulica de três horas. Estes filtros operam em conjunto com rampas, instaladas no terreno, constituindo-se no sistema de tratamento no solo por escoamento superficial.

Rampa

Patamar de 4,2m de largura por 45m de comprimento sendo os primeiros 5m uma área sem aplicação de efluente (testemunha), com declividade do terreno de 3,5%. A operação do sistema foi realizada mediante aplicação de efluente anaeróbio de esgoto sanitário na taxa hidráulica de $0,40\text{m}^3/\text{h.m}$, período de aplicação de 8 h/dia e frequência de aplicação de 5 dias/semana. A rampa contém uma cobertura vegetal da grama Tifton 85 (*Cynodon sp*), por ser resistente à umidade, apresentar melhor fechamento dos espaços, maior domínio sobre as espécies invasoras, e produzir maior massa bruta. Optou-se por esta grama considerando-se a possibilidade de empregar a biomassa produzida na alimentação animal, na forma de feno.



Figura 1 - Vista geral da rampa do sistema de pós-tratamento por escoamento superficial de efluente anaeróbio

Coleta da gramínea

Antes do corte da gramínea, a aplicação de efluente anaeróbio no sistema de escoamento superficial foi interrompida por 24 horas, para promover a secagem da rampa, facilitando a operação e o manuseio na hora do corte. A gramínea foi primeiramente coletada na área testemunha (0-5m, não recebeu aplicação de efluente) e, posteriormente, a cada dez metros nas faixas entre 35-45m, 25-35m, 15-25m e 5 a 15m (área próxima à aplicação de efluente) - a contar do final da rampa, utilizando-se de um cortador de grama mecânico, tendo o cuidado de desinfetar com álcool e flamar as lâminas do equipamento a cada distância. Foram coletadas cinco amostras de cada distância, as quais posteriormente constituíram-se em uma única amostra. Parte da amostra foi armazenada em sacos plásticos e transportada em seguida ao laboratório para a realização das análises bacteriológicas, de helmintos e protozoários, *in natura*. A outra parte foi distribuída em local próximo à área, deixando-se secar ao sol por dois dias de forma a se manter as condições de umidade próximas a 15% (ponto de fenação) e, em seguida, armazenou-se em local ausente de contaminação.

ANÁLISE

Para a determinação de Coliformes totais e *Escherichia coli*, utilizou-se o método cromogênico – substrato Colilert, por cartelas – marca IDEXX (AWWA, 1995). As amostras do feno foram analisadas nos períodos de 0, 15 e 30 dias, utilizando-se 10 gramas da amostra, retirada com uma tesoura estéril, tomando-se o cuidado de se compor uma amostra homogênea (CABRINI et al., 2000). Em seguida as amostras de feno foram picotadas, e colocadas no frasco de diluição,

completando um volume de 100 mL de solução salina (0,85% NaCl). Os frascos foram agitados manualmente 50 vezes e em seguida procedeu-se às diluições para cada amostra, variando entre 10^{-1} a 10^{-5} . Após o preenchimento das cartelas com as amostras mais o substrato, as mesmas foram seladas e incubadas à temperatura de 35°C durante 24 horas. Após este período realizou-se a contagem do NMP de coliformes totais e fecais. As cavidades positivas para coliformes totais apresentaram coloração amarela intensa. Com o auxílio de uma lâmpada UV de comprimento de onda de 365nm incidida sobre as cartelas, identificou-se às cavidades positivas para *Escherichia coli* que apresentam cor azul fluorescente, de acordo com a tabela apresentada pelo método cromogênico por cartela, calculou-se o NMP.

Para a determinação de helmintos e protozoários no feno, utilizou-se a metodologia segundo OLIVEIRA & GERMANO (1992). As amostras foram inicialmente pesadas (100 g), deixadas em repouso por 30 minutos em uma solução de detergente “Extran” neutro diluído em solução fisiológica (10 ml de Extran para 2 litros de solução fisiológica), sendo necessários 300 a 500 mL dependendo da sua umidade para descolar os ovos e cistos que estão aderidos ao material vegetal. Após este período, foi realizada a lavagem com a ajuda de um pincel e o material vegetal foi descartado. A solução de lavagem foi filtrada e recolhida em um cálice de sedimentação e deixada em repouso por 24 horas. Para efetuar a análise, o sobrenadante foi descartado, permanecendo no cálice somente um volume de 100mL, o qual foi processado pelo método de centrifugo-flutuação com sulfato de zinco 33%.

A contagem dos organismos patogênicos foi feita a partir da média da leitura de 4 (quatro) lâminas, obtendo-se a média para uma lâmina. Para quantificação dos organismos patogênicos utilizou-se o método de Kato ou de Kato-Katz, segundo REY (1991), isto é, multiplica-se o resultado da contagem média de uma lâmina pelo fator 24 para a obtenção do número de organismos patogênicos (OP) por grama de amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analizou-se as características microbiológicas do feno, devido a grande importância na alimentação animal e na facilidade de manuseio. Uma característica que se levou em consideração é o fato do feno não perder seu valor nutricional, mesmo armazenado por meses.

Durante todo o período de operação do sistema na taxa de aplicação de 0,40m³/h.m de efluente anaeróbio no sistema, foi determinado o NMP de Coliformes totais ($1,41 \times 10^8$ /100 mL de amostra), *E.coli* ($3,59 \times 10^6$ /100 mL de amostra), uma média de 790 Helmintos/100 mL amostra, e 660 Protozoários/100 mL amostra.

Verifica-se na Tabela 3 que a *Escherichia coli* e os Coliformes totais sobrevivem no feno num período de 30 dias de armazenamento.

Tabela 3 - Resultados do NMP de Coliformes Totais e Fecais no feno ao longo do tempo

Amostras	Coliformes Totais – NMP/g amostra			<i>Escherichia coli</i> – NMP/g amostra		
	0 dias	15 dias	30 dias	0 dias	15 dias	30 dias
Testemunha	$8,7 \times 10^3$	$2,42 \times 10^4$	$2,42 \times 10^5$	$1,00 \times 10^1$	$2,77 \times 10^2$	$1,00 \times 10^1$
5-15m	$2,42 \times 10^4$	$2,42 \times 10^4$	$2,42 \times 10^5$	$4,11 \times 10^3$	$1,69 \times 10^3$	$5,25 \times 10^3$
15-25m	$2,42 \times 10^4$	$2,42 \times 10^4$	$2,42 \times 10^4$	$1,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^1$	$3,00 \times 10^1$
25-35m	$1,16 \times 10^4$	$2,42 \times 10^5$	$1,16 \times 10^4$	$1,00 \times 10^2$	$1,00 \times 10^2$	$1,00 \times 10^2$
35-45m	$2,42 \times 10^4$	$2,42 \times 10^4$	$2,42 \times 10^4$	$2,00 \times 10^1$	$1,28 \times 10^2$	$5,00 \times 10^1$

Verifica-se na Tabela 4 uma diminuição significativa de protozoários em 15 dias de armazenamento. Constata-se que na taxa de aplicação 0,40m³/h.m, ocorreu um arraste dos protozoários ao longo da rampa.

Tabela 4 - Quantificação e identificação de protozoários por grama de feno

Amostras	Dias	Protozoários (OP/1g amostra)			Total
		<i>Entamoeba coli</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Endolimax nana</i>	
Testemunha	0	19	---	56	75
	15	---	---	---	0
	30	---	---	6	6
5-15m	0	12	---	12	24
	15	---	23	15	38
	30	---	---	---	0
15-25m	0	---	---	---	0
	15	---	---	---	0
	30	---	6	---	6
25-35m	0	---	---	24	24
	15	---	---	---	0
	30	---	---	---	0
35-45m	0	18	53	---	71
	15	---	10	---	10
	30	---	---	---	0

--- Não detectável; OP = organismos patogênicos.

Os valores de ovos encontrados na amostra da área testemunha podem ter sido provenientes de uma possível contaminação externa, por pequenos animais que circundam a área. Observa-se na Tabela 5, que após 15 dias de armazenamento do feno, houve uma diminuição significativa de helmintos assim como os protozoários. Na taxa 0,40m³/h.m, houve uma concentração de ovos e larvas de helmintos no intervalo entre 15 a 35m de rampa..

Tabela 5 - Quantificação e identificação de helmintos (OP) por grama de feno

Amostras	Dias	Helmintos (OP/1g amostra)						Total
		<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Toxocara canis</i>	Ovo de <i>Taenia</i>	Ovo	Larva	
Testemunha	0	---	---	---	---	94	27	151
	15	---	---	---	---	19	---	19
	30	---	---	---	---	---	24	24
5-15m	0	---	---	---	---	70	46	116
	15	---	---	---	---	38	15	53
	30	---	---	---	---	37	18	55
15-25m	0	---	---	---	---	119	104	223
	15	---	---	---	---	31	10	41
	30	---	---	---	---	36	---	36
25-35m	0	---	---	---	---	24	192	216
	15	---	---	---	---	11	21	32
	30	---	6	6	12	30	12	66
35-45m	0	36	---	---	---	36	35	107
	15	---	---	---	---	30	---	30
	30	---	---	---	---	---	---	0

--- Não detectável; OP = organismos patogênicos.

CONCLUSÃO

Observou-se que os organismos (coliformes totais, E.coli, helmintos e protozoários) resistem ao período de 30 dias de armazenamento do feno, necessitando de pesquisas com um período superior ao estudado, e um acompanhamento da patogenicidade do material fenado nas mesmas condições sanitárias que este até 12 meses pelo menos. Quanto à utilização do feno na alimentação animal, a Taenia é o organismo mais preocupante, e a sua ocorrência nesse material, não foi significativa. Pesquisas ainda estão se desenvolvendo para poder avaliar o período de armazenamento para a redução significativa do número de organismos patogênicos presentes no feno produzido em áreas de tratamento de esgoto.

Em amostras em que o feno ficou armazenado por quatorze meses o valor da redução dos organismos foi alto. Para protozoários seu valor não foi detectado e para helmintos ficou menor de 1 organismo viável/grama de feno. Os coliformes totais sobreviveram no feno após 12 meses de armazenamento ($1,10 \times 10^4$ /g), e a *Escherichia coli* não foi encontrada.

Também se observou que não existe uma faixa da rampa de tratamento que o número de microrganismos se reduz mais do que em outra. Tanto na região da rampa em que se acumula maior quantidade de lodo - próximo ao local de lançamento, como na região da rampa em que o efluente sofreu maior tratamento, os valores são aproximadamente iguais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à empresa Águas de Limeira S/A, pelo apoio na realização das atividades de campo, e aos órgãos financiadores desta pesquisa: FINEP, CNPq, CAPES, FAPESP e Caixa Econômica Federal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA; AWWA; WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19.ed. Washington D. C.1995.
- BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. – Manual de Tratamento de Águas Residuárias Industriais – CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – São Paulo – Brasil – 1993 – pags: 583 - 640.
- CABRINI, K. T.; SIVIERO, A. R.; HONÓRIO, E. F.; OLIVEIRA, L. F. C. DE; VENÂNCIO, P. C. – *Pesquisa de Coliformes Totais e Escherichia coli em Alfaces (Lactuca sativa) Comercializadas na Cidade de Limeira – São Paulo, Brasil*, 6º Encontro Científico dos Pós-Graduandos no CENA/USP, 21/09/2000 – Piracicaba, SP, 6p.
- CAMPOS, J. R. *Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo*. Cap. 2 e 5, 1º ed., Rio de Janeiro: ABES, 1999, 464p.
- CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. *Norma L5.550, Helmintos e Protozoários Patogênicos: Contagem de Ovos e Cistos em Amostras Ambientais*. São Paulo: CETESB, 1989. p: 1 – 22;
- CHERNICHARO, C. A. L. – *Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Reatores Anaeróbios – Sistema UASB – Aplicação no Solo*, Volume 5 – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – 1997 – Belo Horizonte – MG – págs: 230 - 234;

- CORAUCCI FILHO, B. *Tratamento do esgoto doméstico no solo pelo método do escoamento superficial*. São Paulo, 1992. 1367p. *Doutorado*. Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. 1992.
- COSTA, J. L. *Produza feno com mais qualidade e eficiência*. Revista: A lavoura Sociedade Nacional de Agricultura, Ano 100, Junho 1997, 7p.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – U.S.E.P.A.(1992) *Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge*. EPA/625/R-92/013. Dec. 1992.
- FIGUEIREDO, R.F. Tratamento de esgotos pelo processo de escoamento superficial do solo, *Revista DAE*, 45 (140): 62-66, 1985.
- GALVAN, M.; VICTORIA, J.; ROJAS, N. (1998) *Potential viability of helminth eggs in wastewater assessed by vital staining*. In: Proc. Of the IAWQ 19th Biennial international Conference, v. 10, p. 32-36, Vancouver, Canada.
- JOHNSON, P.W., DIXON, R., ROSS, A.D. *An in vitro test for assessing the viability for Ascaris suum eggs exposed to various sewage treatment processes*. International Journal for Parasitology, v. 281, n.4, p. 627-633, April, 1998.
- METCALF & EDDY. *Wastewater Engineering – Treatment, Disposal and Reuse*. 3. ed.. 1991. Onsite Wastewater Treatment and Disposal System. Design Manual. U.S. Environmental Agency. EPA. 1980. p.113-140.
- NEVES, DAVID PEREIRA; MELO, ALAN LANE DE; GENARO, ODAIR; LINARDI, PEDRO MARCOS – *PARASITOLOGIA HUMANA* – Editora Atheneu – Ano: 2000 – 10^a Edição – São Paulo – Rio de Janeiro – Belo Horizonte – págs: 101 - 284;
- OLIVEIRA, C. A. F. DE, GERMANO, P. M. L. – *Estudo da Ocorrência de Enteroparasitas em Hortaliças Comercializadas na Região Metropolitana de São Paulo, SP, Brasil. I – Pesquisa de Helmintos*, Revista Saúde Pública, São Paulo, 26 (4): 283 – 289, 1992;
- REY, L. – *Método de Kato Quantitativo ou de Kato-Katz – Parasitologia* – 2^a Edição – Editora Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, RJ – 1991 – pag: 688;
- STEFANUTTI, S.; MATTIAZZO, M.E.; CORAUCCI FILHO, B.; NOUR, E. A. A.; FIGUEIREDO, R. F., Comportamento de duas forrageiras sob diferentes taxas de aplicação de esgotos sanitários utilizando o método do escoamento superficial. (*Compact disc*) IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 28; Pelotas, 1999. Artigo científico. Pelotas, 1999.
- TERADA, M.; ZUCCOLO, A. C. F.; PAGANINI, W. DA SILVA – *Tratamento de Esgotos Domésticos por Disposição no Solo com Utilização de Gramíneas* – Revista DAE – Vol. 45 – Nº 142 – Set/ 1985 – Edição: Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP – São Paulo – SP - págs: 249 a 254;
- VON SPERLING, MARCOS – **Disposição de Efluentes no Solo** - Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos - Volume 1 – 2^a Edição Revisada – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Anos: 1996 – Belo Horizonte – MG – pág: 204 - 226.
- WORD HEALTH ORGANIZATION (1989). *Health guidelines for use of wastewater in agriculture and aquaculture*. Technical Report Series. 778. WHO, Geneva.
- ZEEMAN, G., LETTINGA, G. The Role of Anaerobic Digestion of Domestic Sewage in Closing The Water and Nutrient Cycle at Community Level. *Water Science Technologic*, v. 39, n. 5, p. 187-194, 1999.