

ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA, ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO LODO E EFLUENTE ORIUNDOS DO PROCESSO DA PARBOILIZAÇÃO DE ARROZ

Marcela da Silva Afonso (*), Willian César Nadaleti, Maurício Silveira Quadro, Thayli Araujo, Érico Corrêa.

* Universidade Federal de Pelotas, marcelamafonso@yahoo.com.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise microbiológica do lodo, efluente e atividade metanogênica específica oriundos do processo da parboilização de arroz, de modo a identificar microrganismos patogênicos que servem de indicadores de contaminação fecal. Podemos dizer que grande quantidade do lodo proveniente de processos industriais, é destinado à compostagem e posterior utilização como adubos agrícolas. Para a sua utilização segura, o lodo não deve apresentar organismos patogênicos. Portanto, é necessário a realização de uma análise microbiológica de organismos indicadores de contaminação fecal como procedimento de segurança para a destinação do lodo para compostagem. As análises microbiológicas realizadas incluíram a determinação de coliformes e presença ou ausência de *Salmonella spp.* Foram realizadas por meio dos métodos descritos em Apha et al (2001). Realizaram-se análises em três tipos de amostras: mistura oriunda do processo finalizado de determinação de ação metanogênica específica (AME), lodo e efluente oriundo do processo da parboilização de arroz, cedidos por uma determinada indústria de arroz. Dentre os resultados encontrados, foi detectada a presença de *Salmonella* não produtora de H₂S (sulfeto de hidrogênio) em ágar TSI no efluente de arroz e na mistura oriunda do processo finalizado de AME. Porém, no mesmo teste, devido a sua coloração e formação de gás, o lodo apresentou *E.coli*, com crescimento em Ágar TSI. Com isso, podemos concluir que o lodo deve receber tratamento específico para remoção destes microrganismos patogênicos de modo a ser destinado à reciclagem agrícola.

PALAVRAS-CHAVE: Análise microbiológica, Lodo de arroz, Efluente de arroz, Compostagem.

ABSTRACT

The objective of this work was to perform a microbiological analysis of the sludge, effluent and specific methanogenic activity from the rice parboiling process, to identify pathogenic microorganisms that serve as indicators of faecal contamination. We can say that a great amount of the sludge coming from industrial processes, is destined to compost and later use as agricultural fertilizers. For its safe use, the sludge must not contain pathogenic organisms. Therefore, it is necessary to perform a microbiological analysis of fecal contamination indicator organisms as a safety procedure for the allocation of sludge to compost. Microbiological analyzes included determination of coliforms and presence or absence of *Salmonella spp.* They were performed using the methods described in Apha et al (2001). Analyzes were carried out in three types of samples: a mixture from the finished methanogenic action (AME), sludge and effluent from the rice parboiling process, yielded by a rice industry. Among the results, the presence of non-H₂S *Salmonella* (hydrogen sulphide) was detected in TSI agar in the rice effluent and in the mixture from the finished SMA process. However, in the same test, due to its coloration and gas formation, the sludge presented *E. coli*, with growth in TSI Agar. With this, we can conclude that the sludge must receive specific treatment for the removal of these pathogenic microorganisms to be destined to the agricultural recycling.

KEY WORDS: Microbiological analysis, Rice sludge, Rice effluent, compost.

INTRODUÇÃO

O arroz parboilizado representa 25 % do total de arroz produzido no Brasil. Para cada quilograma de arroz sujeito a esse processo são gerados quatro litros de um efluente que, após tratado, origina um resíduo na forma de lodo, rico em substâncias orgânicas, N e P, dentre outros nutrientes (FARIA et al., 2006).

O lodo deve ser destinado de forma ambientalmente adequada, por meio da reciclagem, da compostagem, da recuperação e do aproveitamento energético, de modo a evitar danos ou riscos à saúde pública e à segurança e a minimizar os impactos ambientais adversos.

Nos EUA, estima-se que 55% do lodo produzido em 2004 era aplicado em atividades agrícolas, silvicultura e recuperação de áreas degradadas; na União Europeia, estima-se que em 2010 o uso agrícola respondesse por cerca de 50% das opções de destino final do lodo produzido; no Reino Unido, de acordo com estimativas de 2008, 67% das 1,5 milhões de toneladas de lodo produzidas anualmente eram aplicadas na agricultura (LEBLANC et al., 2008).



1º Congresso Sul-Americano de Resíduos Sólidos e Sustentabilidade

GRAMADO-RS

12 a 14 de junho de 2018

A reciclagem agrícola do lodo é a forma de destinação mais utilizada atualmente, em função do potencial de geração de matéria prima agrícola, devido a alta carga de macro e micronutrientes, e por representar uma solução definitiva para o problema.

Apesar dos vários benefícios associados ao uso agrícola do lodo, essa prática ainda é objeto de polêmicas, principalmente no que diz respeito aos impactos potencialmente adversos à saúde humana (CHROSTOWSKI, 2002). Em vista disso, frequentemente, há uma imposição de normas rigorosas, incluindo critérios exigentes de qualidade dos biossólidos, principalmente no que se refere aos microrganismos presentes.

De acordo com Blumenthal et al. (2000), existem, basicamente, três abordagens para o estabelecimento de critérios de qualidade para a irrigação com águas residuárias, as quais podem ser extrapoladas para o uso agrícola de lodos de esgotos e industriais: ausência de patógenos e, ou de organismos indicadores; a medida do risco atribuível à utilização agrícola do lodo dentre uma população exposta e a estimativa do risco mediante o emprego de modelos probabilísticos.

A primeira abordagem objetiva a ausência de perigos, tem sido referida como abordagem do “risco nulo” e criticada por rigor excessivo e fragilidade em termos de fundamentação epidemiológica (BLUMENTHAL et al., 2000). Na segunda abordagem, buscam-se evidências epidemiológicas de associação entre o fator de risco e a ocorrência de doença na população por meio de medidas de risco, visando à ausência de risco atribuível. Entretanto, esse enfoque apresenta dificuldades práticas, por, dentre outros aspectos, depender de complexos estudos epidemiológicos (BLUMENTHAL et al., 2000).

Alternativamente, tomando como referência um nível de risco tido como “tolerável” e baseado na construção de “cenários de exposição”, limites microbiológicos podem ser estabelecidos a partir de modelos de Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM) (BLUMENTHAL et al., 2000; WHO, 2006).

A abordagem epidemiológica também poderia ser utilizada para estabelecer padrões tendo como referência o “risco tolerável”, mas evidências epidemiológicas podem ser escassas e estudos epidemiológicos são, em geral, restritos ao estudo específico, além de apresentar, em alguns casos, baixa sensibilidade na detecção de riscos. Para determinadas situações, portanto, a AQRM pode se revelar como a única abordagem plausível, sendo especialmente adequada quando o risco tolerável se encontra abaixo do nível que pode ser mensurado por estudos epidemiológicos (BLUMENTHAL et al., 2000).

Idealmente, evidências epidemiológicas e AQRM devem ser utilizadas como ferramentas complementares, como nas Diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS) para o uso de águas residuárias na agricultura, em que o padrão bacteriológico (*E. coli*) para a abordagem de riscos bacterianos, virais e de protozoários foi definido a partir da AQRM (risco tolerável) e o padrão de helmintos foi estabelecido com base em evidências epidemiológicas (ausência de risco atribuível) (WHO, 2006).

OBJETIVOS

Portanto, o objetivo deste trabalho é realizar uma análise microbiológica do lodo e efluente oriundos do processo da parboilização de arroz, de modo a identificar microrganismos patogênicos que servem de indicadores de contaminação fecal.

METODOLOGIA

As análises microbiológicas realizadas incluíram a determinação de coliformes e presença ou ausência de *Salmonella spp.* Foram realizadas por meio dos métodos descritos em Apha et al (2001). Realizaram-se análises em três tipos de amostras: mistura oriunda do processo finalizado de determinação de ação metanogênica específica (AME) contendo glicose (12,5mL), macro nutrientes (7mL), micronutrientes (1mL) e água destilada (466mL); lodo e efluente oriundo do processo da parboilização de arroz, cedidos por uma determinada indústria de arroz. A tabela 1 mostra os componentes utilizados na fabricação das soluções de macro e micronutrientes:

Tabela 1. Componentes utilizados na fabricação das soluções de macro e micronutrientes.

Solução de macro nutrientes

Componente	Quantidade
NaHCO ₃	1g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,65g.L ⁻¹
NH ₄ Cl	0,5g.L ⁻¹
MgCl ₂	0,1g.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1g.L ⁻¹

Solução de micronutrientes

Componente	Quantidade
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,002g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,0002g
AlCl ₃ 6H ₂ O	0,0001g
H ₃ BO ₃	0,0001g
EDTA	0,002g
H ₃ PO ₄	1mL.L ⁻¹

O ágar TSI serve para diferenciar os bastonetes gram negativos, utilizando para isso a fermentação de carboidratos e produção de sulfeto de hidrogênio. Possui em sua composição glicose, lactose e sacarose, os quais sofrendo fermentação são visualizados através da viragem (de vermelho para amarelo) do indicador de pH: o vermelho de fenol. Já o sulfato ferroso de amônio é usado na detecção da produção de sulfeto de hidrogênio, formando composto na cor preta. Composição: Esculina (1,0g/L); Bile (40,0g/L); Extrato de carne (3,0g/L); Citrato férrico (0,5g/L); Peptona (5,0g/L); Ágar (15,0g/L); Água Destilada (q.s.p); pH final (6,6 ± 0,2).

DETERMINAÇÃO DE SALMONELLA SPP

Para o preparo das diluições e pré-enriquecimento, transferiu-se 1mL da amostra para tubo com 9mL de caldo lactosado. Incubou-se à 35°C em um período de 24h. Para o enriquecimento seletivo, transferiu-se asepticamente 1mL da amostra para 1 tubo com 5mL de Caldo TT (Tetrationato) e 1mL para outro tubo com 5mL de Caldo SC (Selenito Cistina). Realizou-se a incubação de ambos à 35°C pelo período de 24h. Para o plaqueamento diferencial, agitou-se em vórtex e transferiu-se 1 alçada do TT para uma placa de XLD (ágar Xilose Lisina Desoxicolato), HE (ágar Entérico de Hecktoen) e BS (ágar Bismuto Sulfíto).

Repetiu-se o procedimento com o caldo SC e incubaram-se as placas à 35°C pelo período de 24h. Removeu-se, com o auxílio de uma agulha de inoculação, uma porção de biomassa do centro de uma colônia típica de cada placa com colônias típicas e atípicas (estas últimas somente do XLD) e inoculou-se por picada seguido de estrias na rampa, dois tubos de TSI (ágar Tríplice Açúcar-Ferro) grandes. Incubou-se à 35°C por 24h. A partir das colônias puras, procedeu-se a Coloração de GRAM. Conduziu-se as colônias purificadas para provas bioquímicas de fermentação de carboidratos, VM-VP, Citrato e Urease.

DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES

Para o preparo das diluições, pesou-se asepticamente 5g de amostra e transferiu-se para 45mL de H₂O_p. Homogeneizou-se e transferiu-se uma alíquota de 1mL para tubo de ensaio com 9mL de diluente e, após, homogeneizou-se em agitador vórtex. Transferiu-se 1mL do tubo para outro tubo com 9mL de diluente. Para o teste presuntivo selecionou-se as três maiores diluições consecutivas e com auxílio de pipeta estéril, inoculou-se uma série de três tubos de Caldo LST para cada diluição. Incubou-se à 35°C por 24h. Os tubos que apresentaram desprendimento de gás passam para os testes de confirmação, tubos negativos à formação de gás são incubados à 35°C por mais 24h.

Na ausência de formação de gás após as 48h, há indicação da ausência de coliformes totais nas amostras e a análise é encerrada. Para o teste confirmativo, a partir de cada tubo positivo no teste presuntivo, retira-se 1 alçada para tubo com Caldo VB com tubo de Durham e incuba-se à 35°C por 24h. Em caso de resultado negativo, reincuba-se por mais 24h na mesma temperatura. A partir de cada tubo positivo nos tubos VB, retira-se 1 alçada para o tubo com Caldo EC e incuba-se a 45,5°C por 24h. Dos tubos de EC com produção de gás, esfria-se 1 alçada com ágar BEM e incuba-se a 35°C por 24h. Se há presença de colônias típicas, transfere-se e cada placa 2 colônias isoladas para tubos com ágar PCA inclinado modificado e incuba-se à 35°C por 24h, obtendo, assim, colônias mais puras. Para o teste bioquímico (IMVC) e morfológico, a partir das colônias puras, procede-se a Coloração de GRAM. As colônias purificadas são conduzidas para provas bioquímicas de VM-VP e Citrato.

RESULTADOS

Nos testes microbiológicos realizados para detectar a presença de *Salmonella*, o efluente de arroz e a mistura oriunda do processo finalizado de AME apresentaram salmonella não produtora de H₂S (sulfeto de hidrogênio) em ágar TSI. Porém, no mesmo teste, devido a sua coloração e formação de gás, o lodo apresensou *E.coli*, com crescimento em Ágar TSI.

Já no teste microbiológicos para dectetar a presença de coliformes não houve produção de gás, portanto, não houve presença de *E.coli*. Podemos mostrar os resultados na tabela 2:

Tabela 2. Resultados das análises de Salmonella e Coliformes.

	Salmonella (mL)	E.Coli (mL)
Lodo	Ausente	Presente
Efluente	Presente	Presente
AME	Presente	Presente

Nas próximas figuras 1, 2 e 3, podemos mostrar os tubos com duas devidas colorações, indicando a presença de Samonella não produtora de H₂S em ágar TSI, na análise do efluente, a presença de *E.coli*, na análise do lodo, e presença de *Salmonella* não produtora de H₂S em ágar TSI, na AME, respectivamente.



Figura 1. Análise em efluente indicando Salmonella não produtora de H₂S em ágar TSI. Fonte: Autor do Trabalho



Figura 2. Análise em lodo indicando Escherichia coli em ágar TSI. Fonte: Autor do Trabalho



Figura 3. Análise em mistura de AME indicando Salmonella não produtora de H₂S em ágar TSI. Fonte: Autor do Trabalho

A pesquisa de organismos indicadores de contaminação fecal tem sido usada há décadas em programas de monitoramento e controle de qualidade ambiental (LEBARON et al., 2005), pois, por limitações de ordem técnica e econômica, é praticamente impossível investigar, de forma rotineira, todos os organismos patogênicos potencialmente presentes na água. Os microrganismos indicadores de contaminação fecal mais utilizados na avaliação da qualidade da água são as bactérias do grupo coliforme (coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli*) e os enterococos.

As bactérias coliformes são os microrganismos mais utilizados como referência para indicar e medir a grandeza de uma contaminação. O uso de *E. coli* para indicar contaminação sanitária mostra-se mais significativo que o uso da bactéria coliforme total, pois as primeiras são restritas ao trato intestinal de animais de sangue quente. Sendo assim, a determinação da concentração dos coliformes pode indicar a existência de microrganismos patogênicos, responsáveis pela transmissão de doenças de veiculação hídrica, tais como febre tifoide e paratifoide, desintéria bacilar e cólera (ORTEGA et al., 2009). No estudo realizado por Gantzer et al. (2001), foi observado uma diminuição de contaminação por *E. coli* após calagem e após o tratamento termofílico. O estudo evidencia a presença da bactéria anteriormente aos tratamentos, igualmente como encontrado no estudo em questão.

A salmonela tem sido isolada de uma grande variedade de espécies de animais. Nos países industrializados, as gastroenterites causadas por essa bactéria são as de maior interesse. Essas doenças são resultantes da ingestão de alimentos contaminados, como bife mal cozido, porco, frango, frutos do mar e ovos (HILBERT et al., 2011). Em pesquisa desenvolvida por Sahlstrom et al. (2004), *Salmonella* spp foi encontrada em 67% (43/64) de lodos de esgoto bruto e 55% (38/69) de esgotos tratados, ressaltando a presença da bactéria em lodos.

CONCLUSÕES

O efluente, o lodo e a mistura oriunda do processo finalizado de determinação de ação metanogênica específica (AME) apresentaram tanto a bactéria do gênero *Salmonella*, como a presença de *E. coli*, indicando contaminação fecal. O lodo, portanto, deve receber tratamento específico para remoção destes microrganismos patogênicos de modo a ser destinado à reciclagem agrícola.

Também, sugere-se realizar novas amostragens para se dispor de resultados estatisticamente significativos, pois o número de amostras analisadas foi pequeno quando comparado com a quantidade de lodo e efluente produzidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Public Health Association (APHA). American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF): **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21st Edition, 2001.
2. Leblanc, R. J.; Matthews, P.; Richard, R. P. **Global atlas of excreta, wastewater sludge, and biosolids management: moving forward the sustainable and welcome uses of a global resource**. Kenya: United Nations Human Settlements Programme (UN-HABITAT), 2008.
3. Chrostowski, P.C.; O'dette, R.G.; Demystifying the great biosolids debate. Sound science removes emotion from decisions about biosolids recycling. **Pollution Engineering**, v.34, n.8, p.23-7, 2002.
4. Blumenthal, U.J.; Mara, D.D., Peasey, A.; Ruiz-Palacios, G.; Stott, R. Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. **Bulletin of the World Health Organization**, v.78, n.9, p.1104-16, 2000.



1º Congresso Sul-Americano de Resíduos Sólidos e Sustentabilidade

GRAMADO-RS

12 a 14 de junho de 2018

5. Faria, O.L.; Koetz, P.R.; Santos, M.S. & Nunes, W.A. Remoção de fósforo de efluentes da parboilização de arroz por absorção biológica estimulada em reator em batelada seqüencial (RBS). **Ci. Técnol. Alim.**, 26:309-317, 2006.
6. Sahlstrom, L.; Aspa, A.; Bagge, E.; Tham, M. L. D.; Albiñ, A.. Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. **Water Research**. vol. 38, 1989-1994 p. 2004.
7. Ortega, C.; Sologabriele, H.M.; Abdelzaher, A.; Wright, M.; Deng, Y. Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 9, p. 137, 2009.
8. Gantzer, C.; Gaspard, P.; Galvez, L.; Huyard, A.; Dumouthier, N.; Schwartzbrod, J. Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge. **Wat. Res.** Vol. 35, No. 16, pp. 3763-3770, 2001.
9. Hilbert, F.; Smulders, F.J.M.; Chopra-Dewasthaly, R.C.; Paulsen, P. Salmonella in the wildlife-human interface. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 603-608, 2011.
10. Lebaron, P.; Henry, A.; Lepeuple, A. S.; Pena, G.; Servais, P. An operational method for the real-time monitoring of E. coli numbers in bathing waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, p. 652-659, 2005.
11. World Health Organization (WHO). **Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater**. Volume 2: Wastewater use in agriculture. Geneva: WHO, 2006a. 213 p.