

AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA DO TRATAMENTO COM O PROCESSO UASB/BIOFILTRO ANAERÓBIO/WETLANDS CONSTRUÍDOS DE FLUXO SUBSUPERFICIAL (WCFSS) DE EFLUENTES DE PROPRIEDADE RURAL

CYTOGENETIC ANALYSIS OF UNDERGROUND WASTE WATER FLOWS BY UPFLOW ANAEROBIC SLUDGE BLANKET/ ANAEROBIC BIOFILTER/ UNDERGROUND WETLANDS CONSTRUCTIONS (UWC)

Filipe Vargas Zerwes

Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul – RS, Brasil
Mestrado em Tecnologia Ambiental
filipezerwes@yahoo.com.br

Deivid Ismael Kern

Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul – RS, Brasil
Mestrado em Tecnologia Ambiental
deividkern@gmail.com

Carlos Alexandre Lutterbeck

Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul – RS, Brasil
Mestrado em Tecnologia Ambiental
galaxpacde@yahoo.com.br

Lourdes Teresinha Kist

Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul – RS, Brasil
Mestrado em Tecnologia Ambiental
lourdes@unisc.br

Ênio Leandro Machado

Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul – RS, Brasil
Mestrado em Tecnologia Ambiental
enio@unisc.br

Resumo

A eficiência do sistema UASB/Biofiltro Anaeróbico/WCFSS/UV foi avaliada quanto aos parâmetros de carga poluente e de potencial genotóxico de efluentes gerados em propriedade rural com cultivo de tabaco no interior do Rio Grande do Sul. O sistema WCFSS com o uso da *Hymenachne grumosa* operou com fatores de carga de DQO de $10,7 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$; de NTK de $1,43 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ e de fósforo total de $0,17 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$. Com tempo de detenção hidráulico total de 10,17 dias nos *Wetlands* Construídos o sistema integrado de tratamento permitiu reduções superiores a 90% em todos os parâmetros de carga poluente. Quanto a genotoxicidade, os ensaios com *Allium cepa* demonstraram redução contínua da frequência de células micronucleadas para as amostras UASB/Biofiltro Anaeróbico e para os estágios dos *Wetlands* Construídos sequenciais nos estágios 1 e 2, bem como 3 e 4. Para os WCFSS não ocorreram diferenças quando comparadas com a resposta obtida na amostra de controle negativo com água destilada e deionizada.

Palavras-chave: Genotoxicidade. *Hymenachne grumosa*. *Wetlands* construídos.

Abstract

The efficiency of the UASB system / Anaerobic biofilter / UWC was evaluated for the pollutant loading parameters and genotoxic potential of effluents generated in tobacco farm in the Rio Grande do Sul. The UWC system using the crumbly *Hymenachne* operated with COD load factors of 10.7 g m⁻² day⁻¹; NTK 1.43 g m⁻² day⁻¹ and total phosphorus of 0.17 g m⁻² day⁻¹. With total time of hydraulic detention of 10.17 days on Wetlands Construction the integrated treatment allowed reductions of more than 90% in all pollution load parameters. The genotoxicity assays *Allium* strain showed continuous reduction in the frequency of micronucleated cells for UASB / Anaerobic biofilter samples and the stages of sequential Constructed Wetlands in stages 1 and 2 and 3 and 4. For UWC there were no differences compared with the response in negative control sample with distilled and deionized water.

Keywords: genotoxicity; lumpy *Hymenachne*; wetlands construction.

1 Introdução

O aumento significativo da frequência de células micronucleadas é considerado indicador tradicional e bastante confiável em avaliações de mutagenicidade de amostras ambientais. A origem destas alterações celulares está relacionada a danos não reparados no DNA e, até mesmo, são decorrentes de algumas aberrações cromossômicas. Estas alterações surgem através da eliminação de parte do DNA do núcleo principal em uma tentativa de restaurar as condições normais de poliploidia (FERNANDES et al., 2007).

A suspeita de substâncias genotóxicas pode ter relação direta com a interferência de determinados tipos de substâncias químicas que entram no sistema por meio das águas cinzas advindas de lavanderias. Neste caso, tensoativos, sanitizantes, amaciantes e outros tipos de detergentes, podem acabar interferindo nas respostas genotóxicas. Além disso, o fato do sistema de tratamento estar inserido em uma propriedade rural nos remete a hipótese de que agro-químicos utilizados na cultura do tabaco, e que por ventura estejam aderidos às roupas dos trabalhadores, bem como de outros prováveis poluentes emergentes, influencie nas respostas da genotoxicidade.

A interferência dos poluentes emergentes tem recebido atenção nas últimas décadas da comunidade científica. Os poluentes emergentes envolvem uma vasta gama de produtos químicos que variam desde fármacos, até mesmo produtos de higiene pessoal, surfactantes, cosméticos, plastificantes, agrotóxicos e aditivos industriais (PETROVIC et al., 2008).

Trabalhos da literatura indicam possíveis ações genotóxicas e, especialmente mutagênicas de efluentes que contenham carga de tensoativos e sanitizantes. Estas alterações podem ser observadas em trabalhos que envolveram o uso do sistema teste com *Allium cepa* no monitoramento de substâncias genotóxicas, procurando avaliar a possibilidade de redução dos indicadores.

Herrero et al. (2012) avaliaram três classes de compostos químicos emergentes, entre eles estavam representantes de composto comumente utilizado em ingredientes anti-bacterianos em cosméticos e produtos de limpeza (triclosan), além de (2-etil-hexil) ftalato produto de ampla

utilização em materiais diversos, como materiais de construção, embalagens de alimento e de medicamento e Propilparabeno, conservante de alimento onipresente em esgotos urbanos.

Para toda a gama de produtos, contaminantes e poluentes em que ocorram associações de ecotoxicidade e citotoxicidade são necessárias investigações de remediação, mesmo com ações de tecnologias limpas e reduções na fonte dos poluentes citados anteriormente.

Neste sentido a remediação das águas residuárias com *Wetlands* Construídos vem sendo estudada com estes indicadores. Os trabalhos de Tanner e Headley (2011), Horn et al. (2014) e Galdoni et al. (2014) associam a citotoxicidade e genotoxicidade de efluentes urbanos, demonstrando que o uso de macrófitas permite reduzir estes potenciais poluentes.

Logo, com objetivo de avaliar a redução da citotoxicidade em efluentes de propriedade rural típica de área central do estado do Rio Grande do Sul, na cidade de Vera Cruz, Vale do Rio Pardo, foram aplicados ensaios com *Allium cepa* para verificar a eficiência do sistema UASB/Biofiltro Anaeróbio/WCFSS/UV quanto à detoxificação dos efluentes compostos por águas negras, amarelas e cinzas geradas na propriedade.

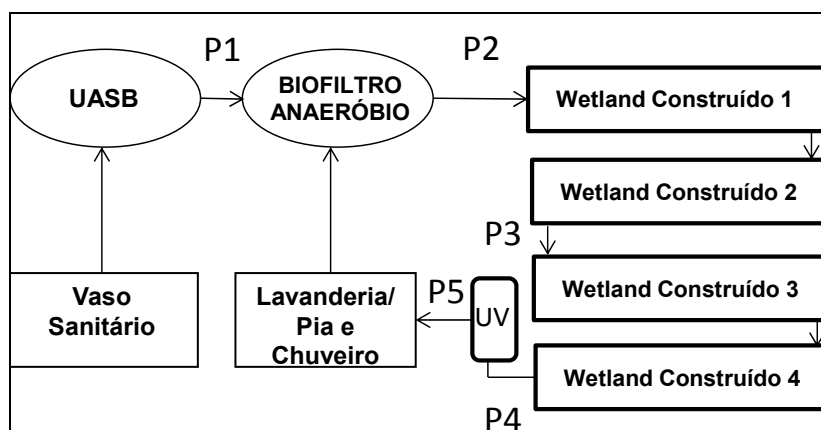
2 Metodologia

2.1 Caracterização do Local de Estudo

A instalação da ETE UASB/Biofiltro Anaeróbio/WCFSS/UV está em área estritamente rural, em família com atividades de agricultura familiar e plantação de tabaco no município de Vera Cruz, RS - Brasil. A residência estudada é caracterizada como unifamiliar, onde residem cinco moradores. A propriedade foi selecionada considerando a necessidade de área para a instalação da estação de tratamento, a disponibilidade da família para o uso da instalação, e principalmente o fato de que todos os moradores permanecessem em suas residências durante as suas atividades diárias.

A configuração da ETE, bem como os pontos amostrais são apresentados na Figura 1.

Figura 1 – Configuração e localização dos pontos de amostragem no sistema UASB/Biofiltro Anaeróbio/WCFSS/UV



Fonte: Autoria própria (2013)

O dimensionamento do sistema de tratamento anaeróbio segue as características apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Dimensões do sistema UASB/Biofiltro Anaeróbio utilizado na ETE rural de Vera Cruz, RS

Itens	Dimensões	
	UASB	Biofiltro Anaeróbio
Altura total (m)	1,50	1,50
Altura útil (m)	1,10	1,10
Diâmetro (m)	0,68	0,68
Volume total (m ³)	0,40	0,40
Volume útil (m ³)	0,40	0,21
Vazão (m ³ dia ⁻¹)	0,6	0,6
Tempo de Detenção Hidráulica (h)	16	8

Fonte: Autoria própria (2013)

Como tratamento complementar ao sistema UASB/Biofiltro foram adotados sistemas de *wetlands* construídos com regime subsuperficial de fluxo horizontal. Sendo utilizados quatro leitos de *wetlands* em série, os quais foram construídos no solo com a utilização de uma manta de impermeabilização de PEAD de 1,6 mm de espessura.

O meio suporte filtrante foi composto por 30 cm de brita nº4 (64 a 100 mm) sobreposta por 30 cm de brita nº1 (20 a 40 mm). Os acessórios hidráulicos utilizados para as zonas de distribuição e recolhimento foram constituídos por tubos de PVC perfurados e flanges com diâmetro de 40 mm.

A macrófita selecionada foi a *Hymenachne grumosa* referendando os estudos feitos por Silveira (2010).

O dimensionamento dos *wetlands* foi baseado na taxa de aplicação de carga orgânica e em referências de estudos, nas quais indicam um dimensionamento de 3 a 5 m² por pessoa (SOUSA et al., 2004; CALIJURI et al., 2009; VYMAZAL, 2010).

O estudo realizado por Sousa et al., (2004), foi levado em consideração para o dimensionamento do sistema em questão, tendo em vista que a carga aplicada de DQO variou de 5,1 a 9,45 g DQO m⁻² dia⁻¹.

As características construtivas dos *wetlands* são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Características construtivas dos WCFSS

Itens	Dimensões
Altura total do leito (m)	1,00
Altura do líquido no leito (m)	0,60
Comprimento (m)	5,00
Largura (m)	1,00
Porosidade total do meio filtrante (%)	0,50
Volume útil total dos leitos (m ³)	12,00
Volume útil efetivo dos leitos (m ³)	6,10
Área superficial total dos leitos (m ²)	20,00
Vazão afluente (m ³ dia ⁻¹)	0,60
Tempo de Detenção Hidráulica (dias)	10,17

Fonte: Aatoria própria (2013)

O tempo de detenção hidráulico, bem como o volume total de cada leito, foram calculados a partir da determinação da porosidade do material suporte. A porosidade foi determinada por ensaios de variação de volume, através da utilização de volumes pré-estabelecidos para ambos os seixos utilizados nos leitos.

O tratamento de desinfecção foi feito através da utilização de lâmpada ultravioleta (UV) germicida ($\lambda = 254 \text{ nm}$), constituído por dois tubos de PVC com diâmetro de 100 mm, ligados em série, dispostas concentricamente e com configuração para tempo de detenção mínimo de 1 min. A abordagem de análise do P5 não é discutida neste trabalho.

2.2 Caracterização dos parâmetros gerais de carga poluente

Em cada ponto de coleta (**Ponto 1:** esgoto bruto coletado no interior do reator UASB; **Ponto 2:** pós UASB/filtro anaeróbio; **Ponto 3:** pós *Wetlands 1 e 2*; bem como o **Ponto 4:** pós *Wetlands 3 e 4*, os quais foram caracterizados com os parâmetros Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅), Demanda Química de Oxigênio (DQO), nitrogênio total Kjeldahl, fósforo total e pH. Todos os procedimentos de coleta e análise das amostras foram desenvolvidos conforme descrito em APHA/AWWA (2012).

Os dados aqui são pertinentes a três meses de operação, sendo que a unidade da ETE no meio rural já opera desde 12/10/2012.

2.3 Avaliação citogenética por meio do teste envolvendo sementes de *Allium cepa*.

As sementes de *Allium cepa* utilizadas foram da marca ISLA PRO, sendo estas isentas de qualquer tratamento químico. O método de exposição das sementes seguiu as adaptações de Sobrero

e Ronco (2004), diferindo quanto à espécie utilizada (*A. cepa*) e tempo de exposição (168 horas), em incubadora com temperatura controlada ($20^{\circ}\text{C} \pm 1$).

O método consistiu na exposição de sementes em placas de Petri com diâmetro de 100 mm, identificadas, forradas com papel filtro de qualidade similar ao Whatman nº 3, com diâmetro de 90 mm, e saturadas com 4 mL de amostra. As amostras utilizadas corresponderam aos efluentes brutos e tratados (pós UASB/Biofiltro Anaeróbio, e *wetlands* 1 e 2 e *wetlands* 3 e 4) nas concentrações de 100%. Para o Controle Negativo (CN), foi utilizado água destilada e deionizada e para o Controle Positivo (CP) foi optado pelo uso de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) a 10 mg L^{-1} .

Após o período de exposição, as raízes emergidas das sementes foram imediatamente seccionadas com bisturi e fixadas em *Carnoy* (solução de etanol absoluto e ácido acético glacial na proporção de 3:1) por 24 horas a ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$). Para a preparação das lâminas, o material fixado em *Carnoy* foi previamente lavado e submetido à lise celular ácida com HCl 1N a 60°C por 11 minutos e, posteriormente imersos em corante reativo de *Schiff*, por 20 minutos no escuro.

Após este período a região meristemática foi removida e suavemente esmagada em duas gotas de ácido acético 45% sobre lâmina histológica, e recoberta por uma lamínula. Foram analisados, um meristema por lâmina e cinco lâminas por tratamento. As observações foram feitas por meio de microscópio óptico a partir da contagem entre 5.000 a 8.000 células, por grupo de cinco lâminas, e os registros fotográficos das alterações foi realizado com auxílio de câmera fotográfica Sony W30 6.0 megapixel de resolução.

A análise citogenética foi executada através da avaliação da citotoxicidade inerente ao registro das alterações no índice mitótico (IM), que corresponde ao percentual de células em divisão por tratamento, conforme equação abaixo:

$$IM = \left(\frac{CD}{TCA} \right) \times 100$$

Onde:

CD – número de células em divisão;

TCA – número total de células observadas por amostra.

Foram feitos os registros de frequência de aberrações cromossômicas (CA), como perdas, fragmentos, atrasos, pontes, aderências, viscosidade entre outras, presentes em metáfase, anáfase e telófase; e mutagenicidade, determinada através da frequência de células micronucleadas (MCN).

Os dados foram analisados por meio de cada índice e as diferenças foram testadas em relação ao CN, através do teste de Chi-quadrado (χ^2), em tabela de contingência de 2 x 2, com um nível de significância de $p < 0.05$ (SPIEGEL, 1978). Foram utilizados pacotes estatísticos do programa *Instat Graphpad* versão 5.00.

3 Resultados e Discussões

3.1 Eficiência do sistema quanto aos parâmetros de cargas gerais

A Tabela 3 mostra o desempenho do sistema UASB/BF/WCFSS em termos dos valores de carga poluente dos parâmetros de DQO, DBO₅, pH, NTK e fósforo total.

Tabela 3 – Caracterização do desempenho de cada etapa do sistema UASB/BF/WCFSS/UV.

Parâmetros	Efluente Bruto (P1)	UASB/Biofiltro Anaeróbio (P2)	WCFSS ₁₋₂ (P3)	WCFSS ₃₋₄ (P4)
DQO (mg L ⁻¹ O ₂)	1074,5	356,9	94,5	15,7
DBO ₅ (mg L ⁻¹ O ₂)	903,9	262,5	95,2	4,7
NTK (mg L ⁻¹)	45,5	47,7	19,7	1,12
Fósforo total (mg L ⁻¹)	16,64	5,9	4,2	1,9
pH	7,3	7,4	7,4	7,5

Fonte: Autoria própria (2013)

A adequação para o descarte dos efluentes já é observada parcialmente no tratamento dos tanques 1-2 dos WCFSS, permitindo, de acordo com a Resolução CONSEMA 128/06 do RS, que os efluentes sejam descartados em corpo receptor sem ação de depleção de oxigênio dissolvido e ocorrência de agentes eutrofizantes.

A carga poluente em cada compartimento do sistema integrado está sub-condicionada, especialmente pelos valores da Tabela 3 e por vazões na faixa de 310 a 920 L semana⁻¹, justificando o bom desempenho dos *wetlands* construídos com a *Hymenachne grumosa*.

Neste contexto, os estudos de genotoxicidade foram encaminhados.

3.2 Resultados da avaliação citogenética com *Allium cepa*

Os resultados da avaliação citotóxica, por meio das alterações no índice mitótico, dos diferentes tratamentos, revelaram pouca citotoxicidade das amostras. Usualmente, na literatura, tem sido considerada como interferência citotóxica, a inibição capaz de reduzir 22% do índice mitótico em relação ao controle negativo (ANTONSIE-WIEZ, 1990), enquanto que a diminuição maior da divisão celular, 50% por exemplo, usualmente é interpretada como fator que potencialmente causa efeito letal ao organismo teste (PANDA e SAHU, 1985).

Diferenças significativas em relação ao controle negativo (CN) foram identificadas quando comparados os resultados encontrados para o índice mitótico das amostras expostas ao controle positivo (CP). Neste caso, foi possível constatar aumento da divisão celular em decorrência da presença do potássio.

Para as amostras de efluentes avaliadas, apenas a amostra de efluente tratado pós UASB/Biofiltro Anaeróbio apresentou diferenças significativas. Houve, neste caso, diminuição em 11,22% da divisão celular em relação ao CN. Nas demais amostras avaliadas, tanto para efluente bruto, quanto para os efluentes depurados em parte com os *wetlands*, as diferenças significativas inexistiram e o IM tendeu a normalização quando comparado à amostra CN.

As amostras do sistema de *wetlands* construídos proporcionaram aumento da taxa de divisão celular. Esta tendência pode ser observada, tanto na amostra coletada no ponto P3, o qual teve um aumento de 5,31% em relação ao CN, quanto para a amostra da saída do sistema, *Wetlands* construídos 4, que apresentou aumento significativo da divisão celular em relação ao CN, indicando possível capacidade de remoção do potencial citotóxico do efluente.

As diferenças sutis encontradas nos valores de citotoxicidade não foram replicadas para outros indicadores de genotoxicidade do sistema-teste. Aberrações cromossômicas (CA), por exemplo, apresentaram significativo aumento para as raízes expostas ao efluente bruto, neste caso as células aberrantes aumentaram em 32,52% em relação ao CN (Tabela 4).

Na Tabela 4 são apresentados os resultados da avaliação citogenética realizada por meio da aplicação de *Allium cepa test* sobre uma amostragem do sistema de tratamento.

Tabela 4 – Resultado da avaliação citogenética do efluente final do sistema UASB/BF/WCFSS com a *Allium cepa*.

	NC	PC	Bruto	UASB/BF	WCFSS ₁₋₂	WCFSS ₃₋₄
Número de Células	5934	6834	6078	7239	5861	7990
Número de Divisões	656	1000	718	710	684	1010
MI	11,0 ± 3,5	14,63 ± 7,6	11,8 ± 4,8	9,8 ± 3,1	11,6 ± 5,1	12,6 ± 5,3
X ²	0	35,7	1,6	5,3	1,0	7,9
Df NC %	0	24,5	6,4	-11,22	5,31	12,6
CA	0,8 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,4	1,3 ±	0,6 ± 0,3	0,8 ± 0,2
X ²	0	4,3	4,5	8,1	1,0	0,0
Df NC %	0	31,4	32,5	39,4	-21,6	1,2
MCN	0,1 ± 0,10	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,08	0,04 ± 0,03
X ²	0	10,3	22,2	2,5	0,3	0,6
Df NC %	0	78,9	86,8	61,9	42,8	-50

NC= Controle negativo; PC= Controle Positivo; MI= Índice mitótico; CA= frequência de aberrações cromossômicas; MCN = frequência de células micronucleadas; % Dif NC= Percentual de redução ou aumento em relação ao CN; *= p(<0.05) **=p(<0.0001); de acordo com o teste de Chi-quadrado.
Fonte: Autoria própria (2013)

Os valores de incidência de células aberrantes (CA), do efluente bruto, superaram os valores encontrados no controle positivo (CP), que apresentou 31,40% de aumento significativo. A amostra oriunda do sistema biológico (pós UASB/Biofiltro Anaeróbio), assim como para o índice mitótico, apresentou o maior valor entre os demais índices de aberrações cromossômicas (CA). O valor do índice foi 39,4% maior do que o encontrado no controle negativo CN, diferindo, portanto, significativamente (Tabela 4).

A amostra coletada na metade do sistema de *wetland* (WCFSS₁₋₂) e na saída do sistema (WCFSS₃₋₄), indicaram redução da genotoxicidade a níveis não mais significativos em relação ao CN. As diferenças percentuais observadas foram, respectivamente de -21,68 e 1,19%.

4 Considerações finais

A avaliação do tratamento permite constatar a eficiência do sistema integrado UASB/Biofiltro Anaeróbio/WCFSS para o tratamento de efluentes domésticos gerados em propriedades rurais.

Há potencialidade na reutilização do efluente, contudo se faz necessário controle analítico permanente dos indicadores biológicos, uma vez que este indicador impossibilita a utilização da água de reúso até mesmo para fins de descarga em vaso sanitário, sendo este um dos usos menos nobres.

As amostras da saída do sistema indicaram aumento significativo da divisão celular em relação ao CN, indicando possível capacidade de remoção do potencial citotóxico do efluente com o sistema até as etapas UASB/Biofiltro Anaeróbio/WCFSS.

Agradecimentos

Agradecimentos ao CNPq com o financiamento para o projeto número 481620/2013-3.

Referências

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION/AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION – APHA/AWWA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22th ed., Washington. 2012.

CALIJURI, M. L. et al. Tratamento de esgotos sanitários em sistemas reatores UASB/wetlands construídas de fluxo horizontal: eficiência e estabilidade de remoção de matéria orgânica, sólidos, nutrientes e coliformes. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, n. 3, p 421-430, jul/set 2009.

FERNANDES, T. C. C., et al. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n. 88, p. 252-259, 2007.

HERRERO, O. et al. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v. 743, n. 1-2, p. 20-4, 18 mar 2012.

PETROVIC, M. et al. **Emerging contaminants in waste-waters: sources and occurrence**. In: D. Barceló, M. Petrovic (Eds.), *Emerging contaminants from industrial and municipal waste: occurrence, analysis and effects*, Hdb Env Chem, v. 5, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 1–36, 2008,

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. **Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*)**. In: ___ MORALES, G. C. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Centro internacional de investigaciones para el desarrollo: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), México, 189p, 2004.

SOUSA, J. T. et al. Utilização de *wetland* construído no pós-tratamento de esgotos domésticos pré-tratados em reator UASB. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 4, p. 285-290, 2004.

TANNER, C. C. AND HEADLEY, T.R. Components of floating emergent macrophyte treatment wetlands influencing removal of stormwater pollutants. **Ecological Engineering**, v. 37, n. 3, p.474-486, 2011

VYMAZAL, J. Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetlands systems for wastewater treatment. **Ecological Engineering**, v. 25, p. 478 – 490. 2005.