
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LAIS ROBERTA DEROLDO SOMMAGGIO

**AVALIAÇÃO DA ATENUAÇÃO DA
TOXICIDADE DE LODO DE ESGOTO POR
ASSOCIAÇÃO COM RESÍDUO VEGETAL DA
INDÚSTRIA SUCRO-ALCOOLEIRA**



Rio Claro
2013

LAIS ROBERTA DEROLDO SOMMAGGIO

AVALIAÇÃO DA ATENUAÇÃO DA TOXICIDADE DE LODO DE
ESGOTO POR ASSOCIAÇÃO COM RESÍDUO VEGETAL DA
INDÚSTRIA SUCRO-ALCOOLEIRA.

Orientador: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales

Co-orientador: Dra. Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Bacharela e Licenciada em Ciências
Biológicas.

Rio Claro
2013

628.2
S697a

Sommaggio, Lais Roberta Deroldo

Avaliação da atenuação da toxicidade de lodo de esgoto por associação com resíduo vegetal da indústria sucro-alcooleira / Lais Roberta Deroldo Sommaggio. - Rio Claro, 2013
58 f. : il., figs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Maria Aparecida Marin Morales

Coorientador: Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo

1. Lodo de esgoto. 2. Allium cepa. 3. Aberrações cromossômicas. 4. Micronúcleo. 5.
Bagaço de cana-de-açúcar. 6. Análise microbiológica. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

*Dedico esse trabalho aos meus
queridos pais, irmãos e avós.*

*“A única forma de chegar ao impossível,
é acreditar que é possível.”
Lewis Carroll
(Alice no País das Maravilhas)*

AGRADECIMENTOS

É difícil agradecer a todos que de algum modo se fizeram presentes em minha vida no decorrer destes cinco anos de graduação. Por isso, primeiramente, agradeço a todos de coração que de alguma forma contribuíram para minha formação. Este trabalho só foi possível devido ao auxílio de pessoas que me apoiaram e me ajudaram direta e/ou indiretamente na execução do mesmo. Acredito que a convivência tanto profissional quanto pessoal foi essencial para o meu aprimoramento intelectual e emocional, sendo essencial para minha construção como futura pesquisadora e professora. Por isso quero agradecer:

Aos meus pais, Maria Conceição e José Roberto, por estarem sempre presentes, por terem me proporcionado uma ótima educação, por estarem sempre me apoiando e aconselhando e, principalmente, pelo amor incondicional.

Ao meu “maninho” Leonardo, e a minha “maninha” Laila, por fazerem parte da minha vida, pela convivência diária, pelos conselhos, brincadeiras e até mesmo pelas discussões. Muito obrigada também, pela parceria e ajuda neste trabalho.

Aos meus avós Eda e Luiz, que sempre, com muito carinho, me perguntavam sobre a faculdade, e mesmo não conhecendo muito bem este meio, me apoiaram e me aconselharam. Ao meu avô, sempre interessado em saber o “porque” de tantos livros e tanto estudo, e minha vó pelas deliciosas comidas.

Aos meus familiares, tias e tios, primas e primos, que fizeram parte do meu crescimento dos quais tenho belas lembranças.

À minha querida orientadora Prof^a Dr^a Maria Aparecida Marin Morales, por todo apoio, conselhos e ensinamentos passados, por me aceitar no grupo e acreditar na minha capacidade em desenvolver esta pesquisa, pela inspiração como pessoa e pesquisadora. Obrigada pela dedicação, amizade, apoio e orientação.

À minha co-orientadora Dr^a Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo, por me “adotar” (rs) e aceitar este desafio, pelos ensinamentos constantes e dedicação, por estar presente nos momentos bons (ex: congresso em Porto de Galinhas) e ruins (ex: coleta do LE). Obrigada por me ensinar com paciência e me ajudar a realizar e concluir este trabalho.

Ao Dú que ajudou a preparar as misturas super cheirosas de lodo de esgoto.

A todos meus colegas de classe, que já se tornaram ou se tornarão biólogos, por fazerem parte dessa jornada. Obrigada pela parceria nos estudos, no futsal (H1N1), nas festas...

A todos os meus queridos mutagênicos: Bruna, Carol, Cinthya, Cris, Dânia, Franco, Jaque Bianch, Jaque Pira, Leonardo, Livia, Márcia, Maria Tereza, Matheus, Michele, Nádia, Paula, Raquel, Roberta, Thaís, Verônica e Yali, por fazerem parte desta etapa e se tornarem grandes amigos. Muito obrigada pela convivência, risadas, piadas, músicas, experimentos e pela ajuda em diversas etapas do meu trabalho. Agradeço por sempre me oferecerem ajuda e poder sempre contar com vocês.

À Bruna e Dânia, pela oportunidade de participar do capítulo do livro, pelos ensinamentos e amizade.

Às minhas amigas mutagênicas Quel, Mary, Michele, Nadica, Marcita, Pulga e Lívia pelos conselhos, auxílios, horas extras de trabalho e muitas risadas.

Às minhas amigas de longa data Rê e Gê que mesmo distantes estão muito presentes em minha vida. Amizade eterna.

Às minhas amigas da UNESP Paula, Aline e Elen pelos trabalhos em grupo, jornadas de estudos, conversas, almoços, filmes e festinhas. Em especial, obrigada Paula, por ser minha dupla, pelos conselhos e amizade.

Às minhas queridas amigas Celine e Vanessa, também transferidas, pelos trabalhos, provas, conversas, risadas e angústias compartilhadas.

Às minhas fiéis companheiras Andrea, Marina e Ana, que por muitas vezes entenderem a minha ausência, por poder contar com a amizade em qualquer momento, pelas risadas, broncas, planos, enfim por tudo. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

A todos os professores e funcionários da UNESP, os quais tive o prazer de conhecer e conviver.

Ao Prof. Dr. Carlos Emílio Levy pela colaboração na identificação dos micro-organismos.

Ao PIBIC/CNPq e a FAPESP pela bolsa concedida ao longo desses anos.

À empresa Foz de Rio Claro pelo fornecimento do lodo de esgoto empregado neste trabalho.

Enfim... A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho! Fico muito agradecida!

RESUMO

O lodo de esgoto (LE) é um resíduo semi-sólido gerado no processo de tratamento de esgoto. Devido a uma legislação ambiental mais rigorosa, o LE vem tendo sua produção aumentada. A fim de propor um destino mais efetivo para este resíduo, autores sugerem sua utilização como insumo agrícola, o que pode caracterizar um recurso interessante do ponto de vista econômico e ambiental. Porém, o LE pode conter substâncias tóxicas e micro-organismos patogênicos que inviabilizam o seu uso na agricultura. Uma das soluções para redução de seu potencial tóxico é submetê-lo ao processo de biorremediação com introdução de agentes estimulantes. O bagaço de cana-de-açúcar (B) pode ser utilizado como descompactante de solo, pois favorece uma melhor porosidade ao meio, e melhor aerobiose ao sistema, características ideais para a biorremediação dos contaminantes. Neste experimento, foram utilizadas cubas contendo amostras de LE100%; LE+B (3:1-v/v); LE+Solo (3:1-v/v); LE+B+Solo (3:1:1-v/v/v). As amostras foram biorremediadas por períodos de 1 (T1), 3 (T2) e 6 meses (T3). Decorrido cada período, avaliou-se os potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das diferentes amostras sólidas, dos solubilizados dessas amostras e da água que percolou das mesmas, por meio de ensaios com o organismo teste *Allium cepa*. Foi realizada uma análise microbiológica do LE e de suas associações, após cada período testado. Com relação às análises dos efeitos citotóxicos, avaliado pelo índice mitótico, as amostras sólidas de LE+B apresentaram, para todos os períodos, uma diminuição significativa da divisão celular, assim como a amostra sólida de LE 100% para T3. Para os solubilizados, observou-se um efeito citotóxico apenas para as amostras LE+B em T1, LE 100% em T2 e LE+B+S em T3. Para as amostras dos percolados, não houve efeito citotóxico. Para o parâmetro de genotoxicidade, (quantificação de alterações cromossômicas e nucleares) apenas a amostra sólida de LE+B apresentou-se genotóxica. Quanto à mutagenicidade (avaliada pela presença de quebras cromossômicas e micronúcleos), nenhum resultado foi estatisticamente significativo. Com relação à análise microbiológica, foi observada uma alternância na comunidade microbiana das amostras. A espécie *Bacillus sp* estava presente em todas as

amostras de T1, *Pseudomonas* sp e *Ochrobactrum anthropi* estavam presentes em todas as amostras de T2, e as espécies *Acaligenes faecalis* e *O. anthropi* em todas as amostras de T3. Para T1 e T2, só foram observadas micro-organismos do grupo das bactérias. Contudo, para T3, foram identificados, além das bactérias, alguns fungos, sendo o gênero *Penicillium* o mais frequente. Com este trabalho pode-se perceber que os períodos de biorremediação empregados parecem não ter sido totalmente suficientes para a detoxificação completa do LE, assim como, a utilização do bagaço de cana de açúcar pareceu não contribuir, de maneira satisfatória, para a biorremediação. Os extratos aquosos das amostras parecem não funcionarem como veículos de contaminação de agentes contaminantes genotóxicos e mutagênicos para o ambiente. Por este estudo, entendemos que ainda são necessários mais estudos para avaliar a efetividade de detoxificação completa do LE, assim como testar novas tecnologias de biorremediação, que possam contribuir para uma aplicação mais segura e sustentável deste resíduo nos solos agrícolas.

Palavras-chave: *Allium cepa*, aberrações cromossômicas, micronúcleo, bagaço de cana-de-açúcar, análise microbiológica.

ABSTRACT

Sewage sludge (SS) is a semi-solid residue generated in the sewage treatment process. Due to a stricter environmental legislation, the production of SS has increased. In order to propose a more effective destination for this residue, authors suggest its use as agricultural input, which can characterize it as an interesting resource from the economic and environmental viewpoint. However, SS can contain toxic substances and pathogenic microorganisms that prevent its use in agriculture. One solution for the reduction of its toxic potential is to submit it to bioremediation with the introduction of stimulating agents. Sugarcane bagasse (B) can be used as soil decompressing, since it favours a better porosity in the medium and better anaerobiosis to the system, ideal characteristics for the contaminants bioremediation. In this experiment, vats containing samples of SS100%; SS+B (3:1-v/v); SS+Soil (3:1-v/v); SS+B+Soil (3:1:1-v/v/v) were used. The samples were bioremediated for 1 (T1), 3 (T2) and 6 months (T3). After each period, the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials of the different solid samples, solubilized of these samples and the water that percolated from them were assessed by assays with *Allium cepa* test organism. A microbiological analysis of the SS and its associations was performed after each period tested. In relation to the cytotoxic effects analysis, evaluated by the mitotic index, the solid samples of SS+B presented, for all the periods, significant decrease of cell division, as well as the solid sample of SS 100% for T3. For the solubilized, a cytotoxic effect was only observed for the samples SS+B in T1, SS 100% in T2 and SS+B+S in T3. For the percolated samples, there was no cytotoxic effect. For the genotoxicity parameter (quantification of chromosome and nuclear alterations) only the solid sample of SS+B was genotoxic. Regarding the mutagenicity (assessed by the presence of chromosome breaks and micronuclei), no result was statistically significant. In relation to the microbiological analysis, an alternation in the microbial community of the samples was observed. The species *Bacillus* sp was present in all samples of T1, *Pseudomonas* sp and *Ochrobactrum anthropi* were present in all the samples of T2, and the species *Acaligenes faecalis* and *O. anthropi* in all the samples of T3. For T1 and T2, only microorganisms of this

group of bacteria were observed. However, for T3, in addition to bacteria, some fungi were identified, being the genera *Penicillium* the most frequent. With this study it can be noticed that the bioremediation periods used do not seem to be totally sufficient for the complete detoxification of SS, as well as the use of sugarcane bagasse did not seem to contribute, satisfactorily, to the bioremediation. The aqueous extracts of the samples do not seem to function as contamination vehicles of genotoxic and mutagenic contaminant agents to the environment. With this study, we understand that further studies are needed to assess the effectiveness of the complete detoxification of SS, as well as test new bioremediation technologies that can contribute for a safer and more sustainable application of this residue in agricultural soils.

Key-words: *Allium cepa*, chromosome aberrations, micronuclei, sugarcane bagasse, microbiological analysis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA	10
2 OBJETIVOS.....	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Materiais	16
3.2 Organização dos diferentes ensaios.....	16
3.3 Avaliação microbiológica do LE	19
3.3.1 <i>Diluição, semeadura e identificação de micro-organismos das amostras</i>	19
3.3.2 <i>Contagem de bactérias presentes na amostra.....</i>	20
3.4 Cálculo do peso seco.....	20
3.5 Obtenção dos solubilizados (ABNT, 2004 - norma NBR 10.006)	21
3.6 Avaliação da genotoxicidade pelo teste <i>Allium cepa</i>	22
3.6.1 <i>Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de Allium cepa.....</i>	22
3.6.2 <i>Forma de análise dos resultados</i>	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Peso seco das amostras.....	24
4.2 Obtenção dos percolados	26
4.3 Caracterização microbiológica do LE.....	27
4.4 Avaliação da ação do LE pelo teste <i>A. cepa</i>	31
5 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

O crescente aumento das áreas urbanas, acompanhado do mau gerenciamento das atividades humanas, acarreta graves impactos ecológicos. Tal fato, faz com que a manutenção e qualidade das condições ambientais fiquem seriamente comprometidas.

Uma das grandes preocupações contemporâneas esta relacionada com o destino final dos resíduos sólidos gerados pelas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), devido ao intenso aumento de sua produção. Esse resíduo, conhecido como lodo de esgoto (LE), é disponibilizado, em sua maioria, em aterros sanitários apropriados, que, pelo seu alto custo, torna o processo de tratamento de esgoto ainda mais caro. Segundo Oliveira (2000), a geração deste resíduo, só no estado de São Paulo, já excede a produção de 100 toneladas de LE seco por dia.

A concentração predominante de matéria orgânica e a presença de nutrientes no LE têm levado alguns pesquisadores a sugerir sua utilização como insumo agrícola, fertilizante ou condicionante de solos agricultáveis (ANDREOLI et al., 2004; BOVI et al., 2007; FARIA, 2007). Esta proposta pode levar a um destino mais efetivo e nobre para este resíduo, tanto do ponto de vista econômico como ambiental (LOPES, 2008), por se caracterizar em uma disposição final menos impactante ao ambiente (SIMONETE et al., 2003).

Alguns estudos apontam que o LE promove uma melhoria no estado de agregação das partículas do solo, contribuindo para uma diminuição de sua densidade e um aumento da aeração e retenção de água entre as suas partículas (MELO; MARQUES, 2000). Também é sugerido que o LE pode promover um aumento nos teores de fósforo (SILVA et al., 2002), de carbono orgânico (CAVALLARO et al. 1993), da fração húmica da matéria orgânica (MELO et al., 1994), da capacidade de trocas catiônicas, da condutividade elétrica do solo (OLIVEIRA et al., 2002) e uma elevação do pH (SILVA et al., 2001).

Segundo Silva et al. (2003), o LE é um resíduo complexo, que, devido a sua origem bastante diversa, pode apresentar várias substâncias prejudiciais tanto aos organismos vivos quanto ao meio ambiente. Assim, apesar do LE possuir características favoráveis ao seu reuso, sua aplicação deve ser

realizada com cautela e de maneira controlada. Dentre as substâncias tóxicas, presentes no LE, podemos citar metais pesados do tipo zinco, cobre, níquel, chumbo, cádmio e mercúrio; compostos orgânicos, tais como fenóis, benzenos, antracenos, alquilbenzenos linear sulfonados; além de microrganismos patogênicos (LOURENÇO, 1997; ALMEIDA et al., 1998; HOLMSTRUP et al., 2001; LOPES et al., 2005; PARAIBA; SAITO, 2005). Embora o uso desse resíduo na agricultura seja interessante, a presença desses contaminantes pode inutilizar esse uso, pela possibilidade de movimentação desses compostos no meio edáfico, levando a uma consequente contaminação de outras camadas do solo e também das águas subterrâneas (BERTONCINI; MATTIAZZO, 1999). Uma possibilidade dessa movimentação pode acontecer em decorrência da lixiviação química dos solos, promovida pela ação da água pluvial, que pode promover uma efetiva disseminação da contaminação para águas subterrâneas e também para sistemas fluviais vizinhos (RODRIGUES-FILHO; MADDOCK, 1997 apud YALLOUZ et al., 2008).

Para a aplicação do LE, ou de algum de seus derivados, na agricultura, há a necessidade de uma avaliação sobre o seu potencial agrônomo, sobre a presença de possíveis substâncias orgânicas e inorgânicas com potencial tóxico, a presença de patógenos e ainda estudos sobre a sua estabilidade no ambiente (BRASIL, 2006). Para que o LE possa ser aplicado em solos agrícolas, ele deve estar de acordo com a Resolução CONAMA nº 375, que regulamenta e especifica o uso do LE na agricultura (PIRES, 2006). Caso o LE não esteja dentro das condições previstas pela legislação, ele deve ser disposto em aterros sanitários.

Um método seguro e eficaz para reduzir a toxicidade de resíduos orgânicos é o processo de biorremediação, que consiste na utilização de organismos vivos capazes de modificar ou decompor poluentes. Neste processo, a degradação dos contaminantes presentes no ambiente é feita pela própria comunidade microbiológica endógena do ambiente contaminado, que, mantida as condições de aeração e suplementação de nutrientes, permite uma conversão das substâncias tóxicas em outras menos prejudiciais aos organismos expostos (BAMFORTH; SINGLETON, 2005). Segundo Pedrozo (2002), alguns micro-organismos encontrados no solo, em águas superficiais e em águas subterrâneas são capazes de degradar compostos orgânicos,

utilizando-os como fonte de energia e, assim, promover a sua eliminação do ambiente contaminado. O emprego dessa tecnologia pode permitir a eliminação de substâncias tóxicas do LE e favorecer o uso desse resíduo como fertilizante agrícola.

Uma estratégia que vêm sendo empregada para auxiliar na biorremediação é a bioestimulação. Este método envolve a adição de agentes estimuladores, como, por exemplo, nutrientes e oxigênio, a fim de aumentar o crescimento da microbiota indígena. Fatores como pH ajustado, relações ideais de nutrientes no meio, adição de biosurfactantes ou enzimas podem colaborar para a eficácia da bioestimulação (SINGH et al., 2011). Uma proposta para realização de bioestimulação é a incorporação de resíduos agro-industriais em ambientes contaminados, pela possibilidade desses materiais agirem como espessantes, portanto aumentando o volume do substrato, proporcionando assim um melhor suporte à microbiota associada (XU; LU, 2010). A aplicação de resíduos de agro-indústrias em ecossistemas contaminados também pode promover um acréscimo no suprimento energético do sistema, conferindo assim uma maior possibilidade de incrementar o desenvolvimento de micro-organismos degradadores. O êxito na biodegradação de compostos orgânicos tem relação direta com a porosidade do solo e a quantidade de oxigênio disponível no meio, beneficiando a remoção mais efetiva de contaminantes em condições aeróbias (PEREZ-ARMENDÁRIZ et al., 2004). A porosidade e a aeração dos solos podem ser melhoradas por meios físicos ou pela adição de materiais descompactantes, o que permite a entrada de ar no sistema e a consequente aerobiose no processo (VASUDEVAN; RAJARAM, 2001).

O bagaço de cana-de-açúcar funciona como um bom agente descompactante de solo, por melhorar a sua porosidade e constituir uma boa fonte de carbono, graças ao seu alto teor de carboidratos (PANDEY et al., 2000). Esta fibra vegetal contém cerca de 40% de celulose, 35% de hemicelulose e 15% de lignina (RODRIGUES, 2005), constituintes estes importantes para os micro-organismos que irão atuar na biorremediação do LE. Segundo Teixeira et al. (2007), o bagaço resultante da extração do caldo da cana-de-açúcar, após esmagamento nas moendas, é considerado um dos maiores resíduos da agroindústria brasileira.

Ensaio biológico têm se mostrado eficientes estratégias para avaliação de riscos ambientais e, conseqüentemente, podem ser utilizados em monitoramento de solos contaminados e/ou biorremediados (PLAZA et al., 2005), fornecendo grande confiabilidade aos resultados e auxiliando na tomada de decisões, quanto ao tratamento e disposição adequada de resíduos (RODRIGUES, 1999). Testes biológicos são essenciais para a avaliação das reações de organismos vivos à poluição ambiental (MORAES et al., 2003). De acordo com Lanno et al. (2003), o uso de bioindicadores em experimentos controlados de laboratório permite uma avaliação mais apurada do potencial tóxico do LE.

As plantas são ótimos bioindicadores para a avaliação de genotoxicidade de ambiente terrestre, já que este substrato é o meio de crescimento para a grande maioria delas (WHITE; CLAXTON, 2004). Dentre os vegetais superiores, a espécie *Allium cepa* tem sido considerada um eficiente organismo-teste para estudos dos mecanismos básicos de ação de contaminantes ambientais (FISKEJÖ, 1985; BUSITRA ATEEQ et al., 2002; FERNANDES et al., 2007; 2009), bem como na comprovação da efetividade do processo de biodegradação (MAILA; CLOETE, 2005; MAZZEO et al., 2010). Este organismo teste tem como características principais a sua cinética de proliferação, o crescimento rápido de suas raízes, o grande número de células em divisão, a sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, a sua disponibilidade durante o ano todo, o seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho (QUINZANI-JORDÃO, 1978; RANK; NIELSEN, 1998; PATRA; SHARMA, 2002; MATSUMOTO et al., 2006), além de serem facilmente corados e observados em microscopia de luz (KURÁS et al., 2006).

De acordo com Caritá (2007) e Souza et al. (2009), a espécie *A. cepa* caracteriza-se em um eficiente sistema-teste para a detecção de danos genotóxicos e mutagênicos induzidos por solos e solubilizados de solos contaminados com lodo de esgoto e hidrocarbonetos de petróleo, respectivamente.

A possibilidade da aplicação agrícola do LE pode ser, então, uma importante estratégia para a melhoria das questões ambientais, pois contribui para a diminuição da disposição irregular desse resíduo no ambiente, favorece

a reciclagem de nutrientes e a redução do uso de fertilizantes minerais, além de também melhorar o condicionamento físico do solo, já que o LE possui um alto teor de matéria orgânica. A avaliação do potencial tóxico do LE por sistemas biológicos, bem como o aprimoramento de técnicas para descontaminação do LE, poderá fornecer informações relevantes sobre a possibilidade de um uso mais nobre para este resíduo, além de poder também minimizar os impactos que este material vem causando ao meio ambiente.

2 OBJETIVOS

Tendo em vista os efeitos negativos do lodo de esgoto, quando depositado de forma inadequada nos ecossistemas, por possibilitar a introdução de substâncias tóxicas, e causar sérios impactos ao ambiente, fica clara a necessidade emergencial de se investigar novos métodos de descontaminação deste resíduo, para que o mesmo possa ter um destino mais nobre, como o de condicionador de solos agricultáveis. Assim, este projeto teve como objetivo:

- ✓ avaliar os potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de diferentes concentrações de lodo de esgoto, obtidas pela adição de diferentes porcentagens de solo e resíduo vegetal ao LE, por meio de ensaios desenvolvidos com o organismo-teste *Allium cepa*;
- ✓ avaliar a presença de substâncias tóxicas no LE, que sejam solúveis em água, tanto nos solubilizados como nos líquidos percolados das amostras estudadas, a fim de estimar um possível carreamento dessas substâncias para as camadas mais profundas do solo e para os recursos hídricos adjacentes;
- ✓ Identificar e quantificar os micro-organismos presentes nas amostras de LE e nas associações, para diferentes períodos de biorremediação;
- ✓ monitorar a efetividade da detoxicação do LE, com e sem a presença de resíduo vegetal, em diferentes tempos de tratamento;
- ✓ estimar as possibilidades de utilização do lodo, associado ou não a resíduo vegetal, como biofertilizante de solos agrícolas;
- ✓ verificar a possibilidade do uso do bagaço de cana-de-açúcar para a redução da toxicidade do LE, e assim poder utilizá-lo como biofertilizante de solos agricultáveis.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

O LE anaeróbio centrifugado, utilizado nesse projeto, foi obtido junto a ETE do Jardim das Flores na cidade de Rio Claro – SP, no ano de 2011. Esta ETE, que recebe somente efluente de esgoto doméstico, compreende uma área de 40 000 m² e gera, mensalmente, 113,53 toneladas de LE anaeróbio. O LE da ETE Jardim das Flores é depositado em aterros sanitários apropriados.

Para o preparo das amostras estudadas neste trabalho, foi utilizado solo (S) de textura argilosa, coletado no Jardim Experimental da UNESP do campus de Rio Claro, solo este considerado de boa qualidade agrícola. O agente descompactante utilizado foi bagaço de cana-de-açúcar (B) seco e triturado grosseiramente.

As amostras estudadas foram preparadas de acordo com as seguintes proporções:

- ✓ Lodo de esgoto 100% (LE 100%)
- ✓ Lodo de esgoto + bagaço de cana-de-açúcar (3:1 –v/v) (LE+B)
- ✓ Lodo de esgoto + solo (3:1 - v/v) (LE+S)
- ✓ Lodo de esgoto + bagaço de cana-de-açúcar +solo (3:1:1 - v/v/v) (LE+B+S).

3.2 Organização dos diferentes ensaios

As amostras preparadas e estudadas foram dispostas, individualmente, em cubas de material inerte - inox (dimensões: 24 cm de largura, 20 cm de altura e 30 cm de comprimento), para evitar qualquer interferência de poluentes externos às amostras.

Antes da disposição das amostras, foram colocados no fundo das cubas 2,73 kg de esferas de vidro, para representar a camada porosa do solo, a fim de facilitar o escoamento do líquido que percolou das amostras. Para a extração das amostras do líquido percolado das misturas foi feito um orifício na parte inferior da cuba (1,5 cm do fundo da cuba), onde foi acoplado uma mangueira de silicone, por onde podia se retirar esses percolados (Figura 1).

Durante todo o período de experimentação da biorremediação, as cubas foram mantidas no Jardim Experimental da UNESP de Rio Claro, em local parcialmente coberto e sob temperatura ambiente. Foram montadas duas cubas para cada tipo de amostra estudada (duplicata). Pelo fato dessas cubas se encontrarem em um sistema aberto, as amostras estavam sujeitas a perda de água por evaporação, como também a incorporação de água (água da chuva ou umidade do ar). A massa das amostras foi monitorada, pesando-se as cubas constantemente. Toda vez que foi observada a perda de massa das amostras, pela comparação entre o peso inicial e o peso apresentado no momento da pesagem, foi borrifada água ultra-pura em uma quantidade equivalente à perda na amostra, a fim de reincorporar a quantidade de água perdida, para não comprometer a microbiota ali existente, que é dependente de umidade, essencial para o processo de biodegradação.

Figura 1: A, B e C: Cubas dispostas no Jardim Experimental, contendo as diferentes amostras preparadas com LE. 1: Cubas de inox; 2: Mangueira de silicone.



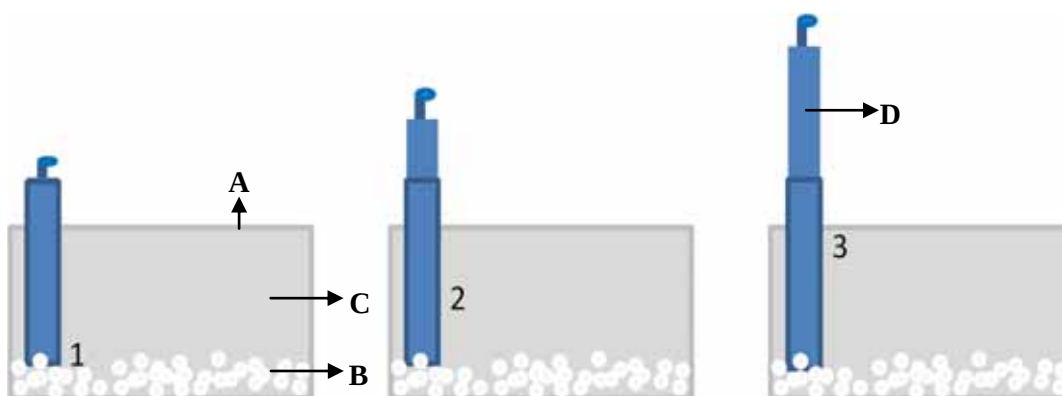
Fonte: Elaborado pela autora

Os períodos escolhidos para avaliação da detoxificação foram de um mês (T1), três meses (T2) e seis meses (T3), após o início do experimento. Decorridos cada tempo, as amostras foram retiradas das cubas e o peso seco de cada amostra foi calculado para a correta preparação do solubilizado. Também foi coletado, de cada cuba, o líquido que percolou das amostras, por meio da mangueira de silicone. Além da amostra sólida, também foram utilizados na realização dos bioensaios, o solubilizado e o percolado de cada uma das amostras, a fim de se avaliar a possível presença de substâncias tóxicas solúveis em água.

A amostra sólida foi coletada com auxílio de um tubo de plástico de PVC (dimensões: 3 cm de diâmetro- e 40 cm de comprimento-), acoplado a um êmbolo de menor diâmetro, de modo que a retirada da amostra atingisse toda a altura da cuba (Figura 2).

Após cada coleta, as amostras sólidas das misturas foram colocadas individualmente em béqueres de vidro, devidamente identificados, e os percolados em frascos de vidro com tampa. Parte das amostras sólidas (relacionada com o peso seco de cada amostra) foi utilizada para a preparação dos solubilizados.

Figura 2: Desenho esquemático da coleta. 1. Coleta da porção do fundo da cuba; 2. Coleta da porção mediana da cuba; 3. Coleta da porção superficial da cuba. A: Cubo de inox; B: Esferas de vidro; C: amostra; D: coletor.



Fonte: Elaborado pela autora

3.3 Avaliação microbiológica do LE

A caracterização microbiológica do LE foi feita após o primeiro, segundo e terceiro período de biorremediação, ou seja, um, três e seis meses após o início do experimento, para as quatro amostras: amostra de LE 100%; LE+B; LE+S e LE+B+S, a fim de observar a biodiversidade microbiana nestes materiais.

3.3.1 Diluição, semeadura e identificação de micro-organismos das amostras

Para a diluição das amostras, foi adicionado 1 g de cada uma das amostras, individualmente, em 10 mL de solução salina estéril a 0,85%. Após homogeneização em Vortex, foi transferido 1 mL da mistura para um frasco contendo 9 mL de outra solução salina. Após nova homogeneização, uma nova alíquota de 1 mL foi

transferida a outro frasco com 9 mL de solução salina, sendo novamente a nova mistura homogeneizada. Em seguida, foram semeados 100 μ L (por meio de pipeta automática), 10 μ L e 1 μ L (por meio de alça calibrada descartável) das três diluições nos meios: Ágar Sangue, Ágar MacConkey, Ágar Sabouraud e Cromoágar UriSELECT 4 (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, França).

A avaliação da densidade e da contagem da microbiota presente nas amostras foi feita por método quantitativo, cuja diluição final se encontra indicada na tabela abaixo.

As placas semeadas foram incubadas em estufa por sete dias, ininterruptamente. Após este período, as placas foram analisadas quanto ao tipo e quantidade de colônias. As colônias foram identificadas por meio de provas bioquímicas manuais. Posteriormente, os micro-organismos foram identificados em equipamento de automação Vitek®2 Compact, BioMérieux®.

3.3.2 Contagem de bactérias presentes na amostra

A quantificação dos micro-organismos presentes em cada amostra foi realizada pela contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônia), referente a 1 g do material original. Para a contagem final, foi considerado o meio de cultura que apresentou maior quantidade de cada micro-organismo, pois nem todos crescem em todos os meios de cultura, pelo fato de alguns meios serem seletivos para alguns micro-organismos ou por acelerar o crescimento de alguns micro-organismos, dificultando assim a observação e contagem dos demais micro-organismos presentes na amostra. Após a identificação, as cepas foram congeladas em caldo BHI com glicerol a -80°C.

3.4 Cálculo do peso seco

Para verificar o conteúdo de água presente nas amostras estudadas, e para a preparação do solubilizado, houve a necessidade de se calcular o peso seco das amostras, segundo o protocolo:

Primeiramente, cápsulas de porcelana foram pesadas e secas em estufa a 105 °C por 24 h. Decorrido este período, as cápsulas foram novamente pesadas em

balança de precisão. Em seguida, foi adicionado em cada cápsula 10g da amostra correspondente à associação (solo, LE e bagaço de cana) proposta para o estudo. Sendo esta etapa realizada em triplicata.

As amostras foram, então, colocadas em estufa a 105 °C por, no mínimo, 24 horas e pesadas novamente. Para evitar que as amostras incorporassem a umidade do ambiente em sua massa, o seu resfriamento foi feito em dessecador.

O cálculo do conteúdo da água existente foi realizado pela diferença dos pesos inicial e final.

3.5 Obtenção dos solubilizados (ABNT, 2004 - norma NBR 10.006)

O processo para a obtenção dos solubilizados das amostras de LE e suas respectivas combinações com solo e bagaço de cana-de-açúcar, consistiu de:

Dissolução de 62,5g da amostra (referente ao peso seco) de LE ou de suas associações e da amostra de solo referência, individualmente, em 250 mL de água de osmose reversa, submetendo essas soluções a uma agitação constante, em baixa velocidade, por 5 minutos. Para a obtenção dos solubilizados das amostras LE 100% e LE+B, foram adicionados, diferentemente das demais, 500 mL e 400 mL de água, respectivamente.

Posteriormente as amostras foram acondicionadas em temperatura ambiente (22 °C), por sete dias, em frascos cobertos com filme de PVC. Após decantação do material, foi coletado o sobrenadante para ser filtrado em membrana com 0,45 µm de porosidade. Os solubilizados, então, foram reservados, para serem utilizados nos bioensaios (Figura 3).

Figura 3: Solubilizados das amostras de LE e suas associações



Fonte: Elaborado pela autora

3.6 Avaliação da genotoxicidade pelo teste *Allium cepa*

As sementes de *A. cepa* foram dispostas em placas de Petri, sendo submetidas diretamente a germinação nas associações especificadas anteriormente, nos seus solubilizados e no líquido percolado dessas associações.

Os tratamentos controles foram realizados em água ultra pura (controle negativo), em solo (controle ambiental) e em metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3) para o controle positivo. Todos os testes de germinação de sementes foram realizados em duplicata.

Após germinação, foram coletadas radículas com cerca de 2,0 cm de comprimento e fixadas em carnoy (álcool e ácido acético, proporção de 3:1 – v/v) por 6 a 18 h em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, foi realizada a troca do fixador por um recém-preparado, para posterior armazenamento das raízes a 4°C, até a sua utilização na confecção das lâminas.

3.6.1 Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de *Allium cepa*

Os testes de Aberrações Cromossômicas (AC) e de Micronúcleo (MN), realizadas com células meristemáticas de radículas de *A. cepa*, foram feitos de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982), com algumas modificações. As raízes fixadas foram submetidas à reação de Feulgen. Para o preparo das

lâminas, os meristemas foram dispostos em lâminas, contendo uma gota de carmim acético (2%), e recobertos com lamínulas, sendo, suavemente, esmagados. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética.

3.6.2 Forma de análise dos resultados

Para a análise das AC, foram considerados diferentes tipos de aberrações (perdas, fragmentos, pontes, atrasos, aderências cromossômicas, entre outros) nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase, telófase). Foi considerado como *endpoint* de genotoxicidade, todas as diferentes aberrações cromossômicas encontradas, com exceção das quebras cromossômicas. As presenças de MN e de quebras cromossômicas foram consideradas como outro parâmetro de avaliação (*endpoint* de mutagenicidade). O Índice mitótico (IM), obtido pela razão do número de células em divisão sobre o número total de células analisadas, constituiu um outro parâmetro de avaliação, que caracterizou o *endpoint* de citotoxicidade.

A análise de todos estes parâmetros foi realizada pela contagem de cerca de 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina, para um total de 10 lâminas avaliadas. As análises estatísticas foram feitas por meio do teste Kruskal-Wallis a $<0,05$ de nível de significância, utilizando o software BioEstat 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Peso seco das amostras

O peso seco das amostras determina a massa das partículas sólidas presentes no solo ou no resíduo sólido, na ausência total de umidade. Por meio destes dados, foi possível estimar a quantidade de água das amostras de LE e das associações de LE com bagaço de cana-de-açúcar e solo.

Os resultados obtidos, em relação ao peso seco, para as amostras iniciais de solo, LE 100% e suas misturas de LE/solo, LE/bagaço e LE/solo/bagaço, após os períodos de um mês (T1), três meses (T2) e seis meses (T3) de biorremediação, podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Média do peso seco referente aos três períodos de remediação, após o início do experimento.

Amostra	Repetição	T1	T2	T3
Solo	-	90,640 ± 0,183	98,103 ± 0,116	98,303 ± 0,035
LE 100%	1	25,290 ± 0,976	32,575 ± 2,740	53,651 ± 1,392
	2	24,322 ± 1,108	38,404 ± 0,779	53,255 ± 3,273
LE + B	1	28,911 ± 1,414	37,686 ± 2,740	52,036 ± 1,330
	2	31,152 ± 1,184	39,157 ± 0,734	46,756 ± 1,902
LE + S	1	58,735 ± 0,743	69,295 ± 0,438	74,930 ± 0,381
	2	59,393 ± 1,782	62,449 ± 0,522	67,572 ± 0,656
LE+ B + S	1	45,801 ± 0,974	47,387 ± 0,765	58,970 ± 1,468
	2	49,583 ± 0,241	51,610 ± 2,572	60,739 ± 2,130

T1: 1 mês após início do experimento; T2: 3 meses após o início do experimento; T3: 6 meses após o início do experimento. Fonte: Elaborado pela autora

Nossos resultados indicaram que para o T1, o peso seco de LE 100% foi de 25%, evidenciando que grande parte de sua massa era composta por água (Tabela 1). Para o T2, dessa mesma amostra, houve um aumento da porcentagem correspondente ao seu peso seco, embora ainda uma grande parte de sua massa era constituída por água (cerca de 35%). Para o T3, também foi observado um aumento do seu peso seco, chegando a mais de 50% de sua massa total. Dessa forma, pode-se perceber um aumento gradual no número de partículas sólidas do LE 100%, em relação ao seu volume total, após seis meses. Um aumento do peso seco de amostras de LE também foi observado por Mazzeo (2013), após diferentes períodos de biorremediação, indicando que o processo de atenuação natural favorece a perda de água das amostras.

Quando a amostra de solo foi comparado, com as demais amostras, foi observado que a amostra de solo, em todos os períodos estudados, apresentou o maior peso seco e, conseqüentemente, a menor quantidade de água.

Nas associações de LE+B, pode-se observar que a massa correspondente ao seu peso seco foi de cerca de 30% para o T1, 38% para o T2 e 49% para o T3; já para a associação de LE+S esta massa correspondeu a cerca de 59% para o T1, 66% para T2 e 71% para T3. Para as amostras de LE+B+S, a massa correspondente ao seu peso seco foi de cerca de 47% para T1, 49% para T2 e 59% para T3. Portanto, foi observada, de maneira geral, uma correlação inversa entre a quantidade de lodo e o peso seco, pois quanto maior foi a quantidade de lodo nas amostras, menor foi o seu peso seco, embora esta relação tenha uma tendência de aumentar no decorrer do experimento.

Segundo Maia, Morais e Medeiros (2005), a matéria orgânica é higrófila, devido as suas cargas negativas e sua superfície específica elevada, o que leva a um alto poder de retenção de água. Dessa forma, um aumento na degradação da matéria orgânica leva, conseqüentemente, a uma perda da retenção de água do sistema. Isso também explica a alta retenção de água pela amostra de LE 100%, já que este material apresenta uma maior quantidade de matéria orgânica, quando comparada com os demais substratos usados nas associações.

4.2 Obtenção dos percolados

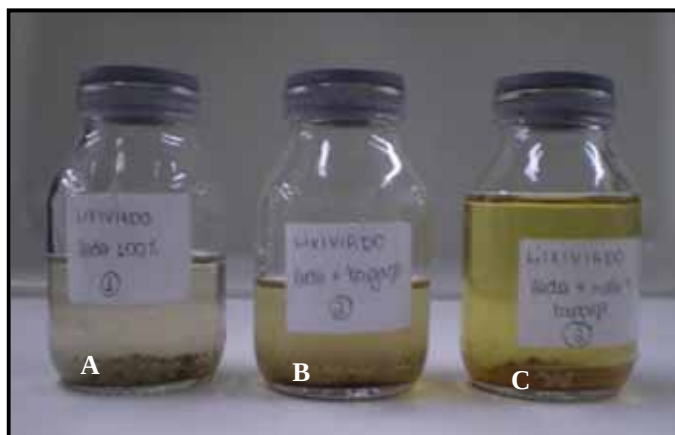
Os percolados utilizados na realização dos bioensaios foram obtidos para os tempos e associações descritas abaixo:

- Para o tempo 1: LE 100%; LE+B; LE+ B+S;
- Para o tempo 2: LE+B; LE+S ; LE+B+S ;

Como pode-se observar nas figuras 4 e 5, a coloração e a quantidade de líquido coletado nos ensaios variaram de acordo com o tratamento. No primeiro tempo, não se obteve percolado da amostra de LE+S, provavelmente devido à adição da matéria orgânica do LE ao solo, a qual pode influenciar na retenção das moléculas de água, dificultando a percolação da mesma. O LE, quando associado ao solo, pode melhorar algumas das propriedades físico-químicas do solo receptor, como o aumento da capacidade de campo, ou seja, uma maior retenção hídrica (MELO et al., 2001).

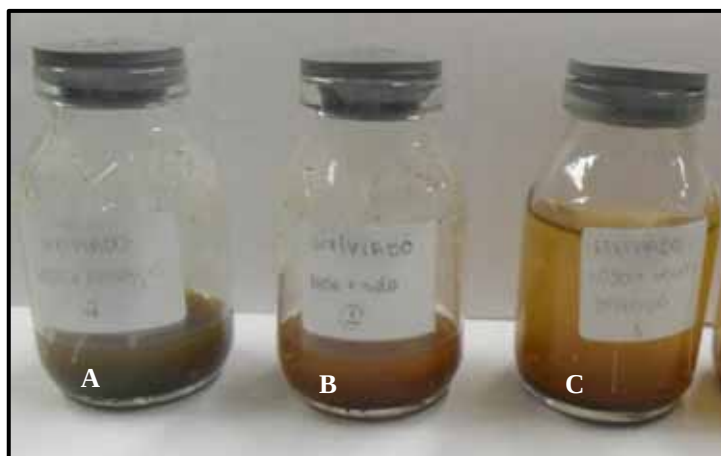
Outro fator que pode ter ocasionado a diferença na obtenção dos percolados, nos diferentes tempos de biorremediação, pode estar relacionado com a evaporação da água destes tratamentos, uma vez que os ensaios foram desenvolvidos em sistema aberto de experimentação. Os ajustes, em relação aos pesos iniciais das cubas, foram feitos somente pela adição de água nas amostras. Assim, a decomposição da matéria orgânica, ao longo do período de biorremediação, pode ter proporcionado uma menor retenção hídrica das amostras, favorecendo o aumento da evaporação. Essa resposta pode ser observada na tabela 1, que mostra que, com o passar do tempo, as amostras foram perdendo água. Sugerimos que essa maior perda de água, provavelmente, ocorreu devido a um aumento da evaporação do sistema. Podemos citar como exemplo, o LE 100%, onde foi obtido percolado para T1, mas não para T2 e T3. No T1, o peso seco do LE 100% correspondia a apenas 25% do seu peso total, enquanto que no T3, este valor aumentou para 53%, comprovando à grande perda na capacidade de retenção de água dessa amostra.

Figura 4: Obtenção do percolado das diferentes amostras no T1.



A: LE 100%; B: LE+B; C: LE+B+S. Fonte: Elaborado pela autora

Figura 5: Obtenção do percolado das diferentes amostras no T2.



A: LE+B; B: LE+S; C: LE+B+S. Fonte: Elaborado pela autora

4.3 Caracterização microbiológica do LE

A biodegradação de compostos orgânicos ocorre de maneira mais eficaz, quando os micro-organismos inoculados são pré-selecionados, portanto mais adaptados aos poluentes alvos (KATAOKA, 2001). Dessa forma, é de suma importância a caracterização dos micro-organismos presentes nas amostras, para que se possa utilizá-los no tratamento do LE, antes de sua disponibilização como fertilizante agrícola. As bactérias, leveduras e fungos filamentosos são

biotransformadores eficazes, pela sua habilidade em degradar uma diversidade de substâncias orgânicas frequentemente encontradas em efluentes. Como estes micro-organismos assimilam tais substâncias como fonte de carbono e/ou de energia, o uso destes agentes biológicos tem sido apresentado como uma alternativa promissora aos métodos convencionais de tratamento e, consequentemente, de resolução de problemas ambientais (URURAHY, 1998).

Com relação ao primeiro período de bioatenuação (T1), foram encontrados nove diferentes gêneros de bactérias, tanto Gram-negativas (p.e. *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*) como Gram-positivas (p.e. *Bacillus sp*) (Tabela 2).

Pelos resultados obtidos para T1, foi possível observar que o *Bacillus sp* foi a única bactéria presente em todas as amostras neste tempo experimental. Sendo assim, podemos sugerir que esta espécie deva ser um organismo importante para a biodegradação inicial dos poluentes ambientais, devido a sua resistência às condições do LE. No entanto, esse gênero não foi o mais abundante na contagem de micro-organismos das amostras.

Para o segundo período (T2), foi observada uma alteração da microbiota, quando comparada ao T1 (Tabela 2). As bactérias *Pseudomonas sp.* e *Ochrobactrum anthropi* foram encontradas em todas as amostras analisadas para T2, enquanto que *Serratia marcescens* só foi encontrada na amostra de LE+B+S.

Para o terceiro período (T3), foram encontrados cinco gêneros de fungos distintos e nove de bactérias. Dentre as bactérias presentes neste tempo de experimentação, a espécie *Alcaligenes faecalis* foi observada em todas as amostras de T3, bem como em algumas amostras dos tempos anteriores. Já a bactéria *Rhizobium radiobacter* foi encontrada apenas na amostra de LE+B+S do terceiro período de experimentação (T3). Com relação aos fungos, o único gênero presente em todas as amostras de T3 foi o *Penicillium*.

Segundo Silva et al. (2003) os micro-organismos, além de promoverem a degradação de diversas substâncias, possuem também propriedades de se ligarem em solução aquosas, a alguns metais, sendo esta propriedade conhecida como biosorção. Há várias vantagens do uso de bactérias como biossorventes, dentre elas se destacam o seu tamanho reduzido, a ubiquidade, a capacidade de crescimento em condições controladas e a resiliência a uma gama de condições ambientais (URRUTIA, 1997). Um dos impactos negativos da deposição do LE em solos agrícolas é a presença de altas concentrações de metais, uma vez que esses

poluentes são de difícil remoção (JIANG;FAN, 2008). Dessa maneira, a identificação dos micro-organismos com capacidades biosorventes pode auxiliar em processos de descontaminação do LE. Entre os micro-organismos que possuem uma boa propriedade de biosorção de metais, destaca-se o *Bacillus sp*, encontrado em T1, e a *Pseudomonas sp* (QUINTELAS, 2007), também encontrada nas amostras estudadas neste trabalho.

Em estudos realizados por Ozdemir et. al (2003), os autores mostraram que *O. anthropi* é eficiente na adsorção de alguns metais pesados como cromo, cobre e cádmio. Esta mesma bactéria foi também encontrada neste experimento, para as diferentes amostras do T2 e T3.

Os fungos também merecem destaque na degradação de compostos orgânicos, sendo conhecidos por degradar ou provocar deterioração de uma ampla variedade de materiais (SING, 2006). Os fungos apresentam um crescimento mais lento, quando comparado às bactérias, e geralmente precisam de um substrato para co-metabolismo, sendo então considerados menos eficientes na degradação de xenobióticos do que as bactérias. No entanto, esses micro-organismos são mais eficientes na degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com mais de quatro anéis, quando comparados às bactérias (LEITÃO, 2009).

Leitão (2009) cita que o gênero *Penicillium sp* tem um importante papel como biosorvente de metais, como zinco e cobre, além de ser um agente natural para remediação de diferentes compostos orgânicos como fluoreno e pireno.

Neste trabalho, o gênero *Penicillium* foi encontrado em todas as amostras, do período T3, corroborando com os dados de Leitão (2009), em relação a uma demora na colonização das amostras, devido a seu metabolismo mais lento.

Tabela 2. Identificação e contagem dos micro-organismos presentes nas amostras de LE e suas associações.

Micro-organismos	LE 100%			LE+B			LE+S			LE+B+S		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
<i>Achromobacter denitrificans</i>	-	2,5x10 ⁶	2,6 x 10 ⁴	-	-	2,0 x 10 ²	-	5,0x10 ⁶	-	-	3,0x10 ⁶	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	-	1x10 ⁷	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter ursingii</i>	-	5,0x10 ⁶	-	-	3,0x10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1,5x10 ⁶	-	1,7 x 10 ⁴	1x10 ⁶	>10 ⁷	5,0 x 10 ⁴	-	-	2,0 x 10 ⁴	-	-	1,2 x 10 ⁴
<i>Alcaligenes faecalis ssp faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	>10 ⁷	-	-	-	1,2 x 10 ³
<i>Aspergillus Niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,0 x 10 ²
<i>Aspergillus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	10 ³	-	-	-
<i>Aspergillus sp. (col. Marrom)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,0 x 10 ³
<i>Aspergillus sp. (col. Rosa)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10 ⁴
<i>Bacillus sp</i>	1x10 ⁵	-	-	1,3x10 ⁶	-	-	1x10 ⁵	-	-	1x10 ⁵	-	-
BGN - não identificado *	-	5,0x10 ⁶	5,8 x 10 ⁴	-	-	5,3 x 10 ⁴	-	-	10 ⁴	-	-	3,0 x 10 ³
BGP ***	-	-	-	3x10 ⁶	-	-	9x10 ⁶	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	10 ⁴	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	1x10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cupriavidus pauculus</i>	-	5,0x10 ⁶	3,7 x 10 ⁴	-	-	-	-	5,0x10 ⁶	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-	-	4x10 ⁶	-	-	1x10 ⁷	-	-
<i>Fungo anemófilo</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0 x 10 ⁴	-	-	-
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-	5,0x10 ⁶	2,0 x 10 ³	-	>10 ⁷	3 x 10 ³	-	>10 ⁷	4,2 x 10 ³	-	5,0x10 ⁶	10 ⁴
<i>Penicillium sp.</i>	-	-	2,2 x 10 ⁵	-	-	>10 ⁵	-	-	10 ⁵	-	-	-
<i>Penicillium sp. (col. Verde)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10 ⁵
<i>Pseudallescheria sp.</i>	-	-	1,4 x 10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa 1 **</i>	1x10 ⁷	1,0 x 10 ⁶	-	1x10 ⁶	-	-	4x10 ⁵	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa 2 **</i>	5x10 ⁶	-	-	6x10 ⁵	-	-	4x10 ⁵	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa 3 **</i>	4x10 ⁶	-	-	-	-	-	4x10 ⁶	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa 4 **</i>	-	-	-	-	-	-	5x10 ⁶	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-	1,5 x 10 ⁶	-	1x10 ⁵	-	-	-	>10 ⁷	-	-	1,2x10 ⁶	-
<i>Pseudomonas sp</i>	7x10 ⁶	5,0x10 ⁶	-	-	3,0x10 ⁶	-	-	>10 ⁷	-	2x10 ⁶	3,0x10 ⁶	2,0 x 10 ²
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	-	-	1x10 ⁶	-	-	-	-	-	2x10 ⁶	-	-
<i>Rhizobium radiobacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10 ⁴
<i>Scopulariopsis sp.</i>	-	-	-	-	-	>10 ⁵	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5x10 ⁶	-
<i>Sphingobacterium sp.</i>	-	-	-	-	-	-	2x10 ⁶	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	-	-	-	7x10 ⁵	-	-	-	-	5,0 x 10 ⁴	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	-	>10 ⁷	-	1x10 ⁶	-	-	-	2,5x10 ⁶	-

*BGN: Bacilos gram-negativos; ** *Pseudomonas aeruginosa* 1,2,3 e 4 são cepas com cor, tamanho ou outras características que as diferencia morfológicamente, embora pertencentes a mesma espécie; ***BGP: Bacilos gram-positivos. Fonte: Elaborado pela autora.

Também foi observado uma variação na composição das populações de micro-organismos presentes nas diferentes amostras, possivelmente pela adição do bagaço de cana-de-açúcar e do solo, indicando que o uso desses materiais pode aumentar a diversidade microbiana do LE. A biorremediação utiliza de micro-organismos com capacidades de degradação para remediar solos contaminados. Mas para que essa microbiota fique ativa, há a necessidade de uma quantidade adequada de oxigênio no sistema (RHYKERD et al., 1999). Os agentes descompactantes, além de proporcionarem uma melhor aeração, podem auxiliar na biodegradação fornecendo nutrientes, quando enriquecidos, e massa microbiana (HENCKLEIN, 2008). Estudos relatam o aumento da degradação de compostos orgânicos em sistemas de compostagem ou landfarming, quando são adicionados alguns agentes descompactantes, como cascas de madeira, palha, feno de grama, entre outros (RHYKERD et al., 1999; MOLINA-BARAHONA et al., 2004).

Dessa forma, a identificação da microbiota presente nas amostras é interessante, não somente pela possibilidade de selecionar os microrganismos mais eficientes, para posterior utilização no processo de aceleração da detoxificação do LE, mas também para identificar se a introdução de novos agentes (bagaço e solo) pode favorecer a biodegradação, pela introdução dos novos microrganismos ao sistema.

4.4 Avaliação da ação do LE pelo teste *A. cepa*

Um dos vegetais mais utilizados para avaliação genotóxicas e mutagênicas é a espécie *A. cepa*. Inúmeros trabalhos citam as células de meristemas radiculares como um eficiente material para ensaios de aberrações cromossômicas e de micronúcleos (BUSHRA ATEEQ; ABUL FARAH; NIAMAT ALI, 2002; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011).

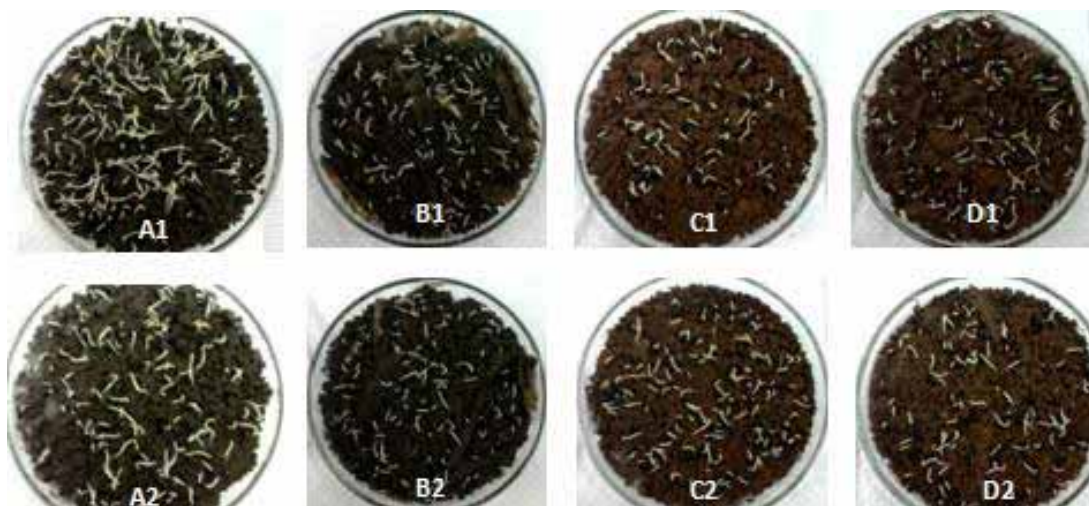
Neste trabalho, o organismo teste *A. cepa* foi utilizado para avaliar a eficiência da detoxificação do LE e de suas associações com bagaço de cana-de-açúcar e solo e suas respectivas soluções aquosas, após os períodos de um mês, três meses e seis meses do início do experimento. Este bioensaio não

foi realizado com o LE no tempo zero (antes do início da biorremediação), pois, segundo Mazzeo (2013), o LE inicial bruto inibe a germinação das sementes de *A. cepa*. Esse fato também foi observado por Maziviero (2011), quando o autor expôs sementes de *A. cepa* ao lodo bruto coletado na ETE da cidade de Atibaia.

Os ensaios desenvolvidos no presente trabalho foram realizados em duplicatas, embora os resultados aqui apresentados, referentes ao potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico, foram considerados como um único grupo, pois as réplicas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si.

Os resultados observados para as amostras brutas, após o primeiro tempo de ensaio (T1), com relação à germinação das sementes, se mostrou semelhante para todas as amostras controle (controle negativo, controle positivo e a controle ambiental) e para o LE 100%, e diferente para as amostras de LE/Solo, LE/Bagaço e LE/ Bagaço/Solo. Como podem ser observado na Figura 6, as amostras de LE 100% apresentaram um padrão de crescimento das radículas maior que as outras amostras. Já a amostra de LE/Bagaço apresentou um padrão de crescimento menor, quando comparado às demais. Todas as radículas foram coletadas no mesmo dia, mesmo as que exibissem um padrão de crescimento diferente entre si, pois houve, para todos os ensaios, um tamanho aceitável para a confecção das lâminas.

Figura 6a: Germinação de sementes de *A. cepa*, referente aos tratamentos realizados com LE, S e B, após um mês do início do experimento (T1).



A: Lodo de esgoto 100%; B: Lodo de esgoto + Bagaço; C: Lodo de esgoto + Solo; D: Lodo de esgoto + Bagaço + Solo. 1: réplica 1 do ensaio correspondente; 2: réplica 2 do ensaio correspondente. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 6b: Germinação de sementes de *A. cepa*, referente aos tratamentos controles, após um mês do início do experimento (T1).



Amostras controles. A: Controle negativo; B: controle positivo, C: controle ambiental (solo). Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados do segundo bioensaio, correspondente a três meses após o início do experimento (T2), se mostraram, com relação ao comprimento das radículas, semelhantes entre os controles, porém diferentes entre os controles e as os tratamentos. Foi observado que as sementes submetidas aos tratamentos apresentaram um padrão de crescimento das radículas inferiores aos das amostras do controle (controle negativo, positivo e ambiental). Também foi observada uma sutil diferença no crescimento das radículas entre os tratamentos, sendo que as sementes expostas ao LE+S tiveram um crescimento radicular maior, quando comparadas aos demais tratamentos (LE 100%, LE+B, LE+B+S) (Figura 7). Esse ensaio mostrou resultados diferentes aos do primeiro bioensaio (T1), pois o maior padrão de crescimento da radícula foi observado para o tratamento de LE+S. Esta diferença pode ter ocorrido devido ao fato de algumas substâncias tóxicas do LE tornarem-se biodisponíveis para as sementes, após a biodegradação, inibindo o crescimento das suas radículas. Devido a essa inibição, as radículas de todos os tratamentos (LE 100%, LE+S, LE+B, LE+B+S) tiveram que ser coletadas dois dias após a coleta das radículas dos controles, por não exibirem tamanho adequado para a confecção das lâminas.

Figura 7a: Germinação de sementes de *A. cepa*, referente aos tratamentos realizados com LE, S e B, após três meses do início do experimento (T2).



A: Lodo de esgoto 100%; B: Lodo de esgoto + Bagaço; C: Lodo de esgoto + Solo; D: Lodo de esgoto + Bagaço + Solo. 1: réplica 1 do ensaio correspondente; 2: réplica 2 do ensaio correspondente. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 7b: Germinação de sementes de *A. cepa*, referente aos tratamentos controles, após três meses do início do experimento (T2).



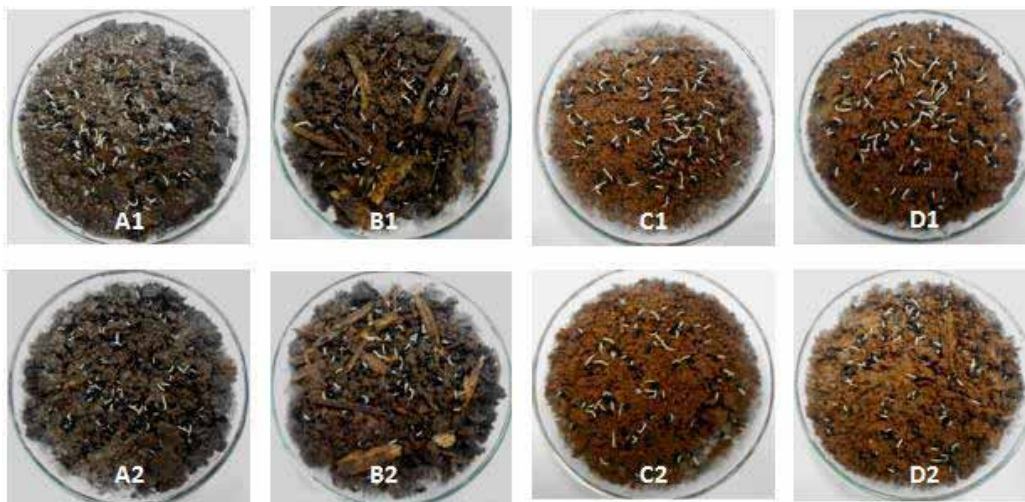
Amostras controles. A: Controle negativo; B: controle positivo, C: controle ambiental (solo). Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação aos resultados do terceiro tempo do bioensaio, correspondente a seis meses após o início do experimento (T3), pode-se observar um padrão de crescimento das radículas mais semelhante ao do segundo bioensaio. Os controles apresentaram um padrão de crescimento radicular muito parecido entre si, enquanto que os tratamentos apresentaram

um padrão de crescimento inferior aos dos controles e diferentes entre si. Para este período, as radículas expostas ao LE 100% e ao LE+B apresentaram um crescimento menor, quando comparadas aos controles, e às amostras de LE+S e LE+B+S (Figura 8). As coletas das radículas expostas aos tratamentos de LE+S e LE+B+S foram realizadas três dias após as coletas dos controles e as coletas das radículas submetidas aos tratamentos de LE 100% e LE+B foram realizadas seis dias após as coletas dos controles. Este atraso na coleta se deu devido à necessidade de espera para que as radículas atingissem um tamanho aceitável para a confecção das lâminas de *A. cepa*. Um aumento da resposta biológica em LE também foi relatado por Badia-Fabregat et al. (2012), após biodegradação fúngica, possivelmente em decorrência da bio-ativação dos compostos presentes neste LE pelo fungo empregado no processo.

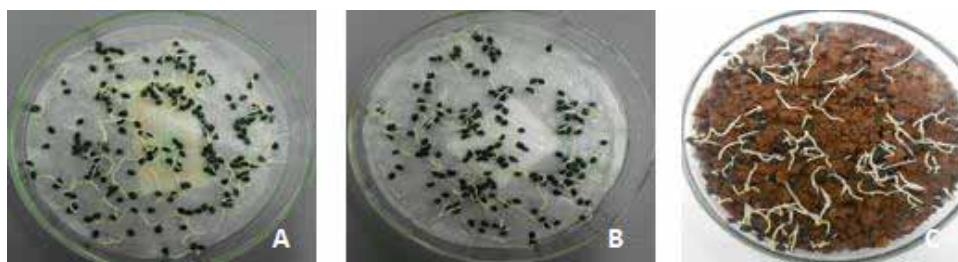
Segundo Oliveira (1998), com o tempo, ocorre uma decomposição natural da matéria orgânica presente no LE, havendo assim magnificação de substâncias tóxicas ao solo, liberadas do LE, como por exemplo, metais. Segundo o autor, devido a possibilidade de transferência de substâncias do LE para o solo, é muito importante conhecer, por meio de testes específicos, o grau de estabilidade ou a taxa de decomposição dos materiais orgânico presentes no LE. Este fato faz com que substâncias tóxicas, que antes estavam inertes ou complexadas à matéria orgânica, tornem-se livres no solo e, portanto, disponíveis aos organismos presentes no meio. Este fato pode ter levado a uma inibição no crescimento das radículas deste estudo.

Figura 8a: Germinação de sementes de *A. cepa*, referente aos tratamentos realizados com LE, S e B, após seis meses do início do experimento (T3).



A: Lodo de esgoto 100%; B: Lodo de esgoto + Bagaço; C: Lodo de esgoto + Solo; D: Lodo de esgoto + Bagaço + Solo. 1: réplica 1 do ensaio correspondente; 2: réplica 2 do ensaio correspondente. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 8b: Germinação de sementes de *A. cepa*, referente aos tratamentos controles, após seis meses do início do experimento (T3).



Amostras controle. A: Controle negativo; B: controle positivo, C: controle ambiental (solo). Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação às amostras aquosas (percolado do LE 100% e suas associações, assim como os solubilizados das mesmas), estas não apresentaram um padrão de crescimento das radículas tão destoantes quanto ao apresentado pelas amostras sólidas, evidenciando que as substâncias

responsáveis pela inibição do crescimento das raízes de *A. cepa* não estavam presentes nessas soluções aquosas testadas.

Em relação ao parâmetro de citotoxicidade para as amostras brutas (Tabela 3), avaliada pelas alterações no índice mitótico das raízes, foi observada uma redução na divisão celular para as amostras de LE, no decorrer dos períodos estudados, sendo este índice estatisticamente significativo somente para a amostra do T3. Também foi observado um decréscimo na divisão celular das amostras de LE+B ao longo dos períodos testados, neste caso estatisticamente significativos para os três períodos de biodegradação. Para as outras amostras, não foi observado nenhum resultado estatisticamente significativo. Esta redução na divisão celular pode ter ocorrido devido à concentração de substâncias tóxicas do LE, pois, no decorrer dos períodos, as amostras perderam massa, como pode ser observado na tabela 1, referente ao peso seco das amostras, na qual a maior perda de massa deu-se para o LE 100% e LE+B. Uma outra explicação pode ser dada pelo fato das substâncias tóxicas tornarem-se biodisponíveis após 6 meses, ou até mesmo algumas substâncias orgânicas terem sido parcialmente degradadas, em metabólitos mais tóxicos que os inicialmente presentes. Portanto, podemos inferir que o LE estudado nas amostras brutas e na sua mistura com bagaço, após os diferentes períodos de biodegradação, parece induzir citotoxicidade em células meristemáticas de *A. cepa*. No entanto, quando o LE é misturado ao solo na proporção de 3:1 (lodo:solo), esse efeito não é mais observado. Segundo Mazzeo (2013), associações do LE e solo diminuíram tanto a letalidade do LE para o organismo teste *Eisenia andrei* como também a sua toxicidade para *A. cepa*. Desta forma o acréscimo de solo ao LE parece ser um fator essencial para a diminuição do potencial tóxico deste resíduo.

Podemos observar ainda que a inibição do crescimento das radículas para as amostras de LE e LE+B coincidem com uma diminuição média das divisões celulares, para as mesmas amostras, nos períodos de três e seis meses.

Os resultados observados para citotoxicidade dos solubilizados de LE 100% e suas associações com solo e bagaço (Tabela 3) também apontam para um efeito citotóxico, pois foi registrada uma diminuição do índice mitótico das células meristemáticas de *A. cepa* submetidas à germinação às amostras dos

solubilizados. Embora apenas as amostras de solubilizado-LE+B em T1, solubilizado-LE 100% em T2 e solubilizado-LE+B+S em T3 apresentaram valores estatisticamente significativas para esse parâmetro, foi observado que o índice mitótico de todas as amostras (LE 100%, LE+B, LE+S, LE+B+S) apresentam valores menores que as do controle negativo. Para as amostras dos líquidos percolados do LE e suas misturas com bagaço e solo, foi possível observar também uma diminuição do índice de divisão celular (índice mitótico), com exceção das amostras de percolados de L+B+S. Embora tenha havido essa diminuição do índice mitótico, nenhum dos resultados foi estatisticamente significativo, quando comparado ao controle negativo.

Matta et al. (2009) realizaram, por meio de diferentes testes de toxicidades, uma tentativa de classificação da periculosidade de LEs, de cinco diferentes ETEs do Estado de São Paulo. A partir do método de difusão em Agar com a linhagem celular NCTC clone 929 (célula do tecido conjuntivo de camundongo), os autores também observaram que lodo *in natura* induziu a uma baixa citotoxicidade para as amostras de quatro das ETEs estudadas. Porém, o LE de um dos pontos foi classificado pelos autores como capaz de induzir uma citotoxicidade média. Pelos nossos resultados, podemos também inferir, que todos os lodos estudados induziram, mesmo que baixa, uma certa citotoxicidade, para as células meristemáticas analisadas.

Tabela 3: Índice mitótico de células meristemáticas de *A. cepa* submetidas à germinação em diferentes concentrações de LE, para os três diferentes períodos estudados.

Amostras	Amostra Bruta			Solubilizado			Percolado	
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2
CN	27,30 ± 9,48	18,08 ± 5,05	23,44 ± 4,84	18,46 ± 3,06	19,22 ± 3,81	18,59 ± 2,76	18,02 ± 1,83	21,30 ± 2,62
CP	28,71 ± 5,56	18,25 ± 7,72	23,23 ± 6,39	14,26 ± 3,93	18,49 ± 2,38	21,42 ± 1,87	21,93 ± 3,56	27,28 ± 8,02
Solo	26,00 ± 5,84	18,26 ± 6,15	19,82 ± 5,09	16,70 ± 1,97	16,92 ± 1,65	17,19 ± 1,92	---	---
LE 100%	26,04 ± 7,19	13,60 ± 7,16	8,24 ± 4,58 *	14,13 ± 3,75	7,44 ± 3,96 *	14,03 ± 2,74	17,70 ± 5,42	---
LE+B	15,46 ± 4,60 *	8,06 ± 4,85 *	12,71 ± 6,55 *	13,01 ± 3,79 *	15,54 ± 3,08	13,74 ± 3,61	14,34 ± 3,04	18,11 ± 2,76
LE+S	19,60 ± 3,90	10,95 ± 5,25	18,19 ± 5,21	14,73 ± 2,40	17,55 ± 2,89	14,24 ± 3,73	---	15,71 ± 4,34
LE+B+S	16,33 ± 3,82	14,00 ± 3,15	18,33 ± 4,70	17,82 ± 2,96	18,69 ± 4,08	13,08 ± 1,58 *	22,35 ± 4,03	22,54 ± 5,25

* estatisticamente significativo (p<0,05). Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação à análise dos efeitos genotóxicos, realizada pela quantificação de alterações cromossômicas e nucleares em células meristemáticas de *A. cepa* (Figura 9), foi observado, para as amostras sólidas um resultado estatisticamente significativo apenas para T3 da amostra de LE+B. Entretanto, é possível observar uma tendência clara de aumento da genotoxicidade, no decorrer dos períodos, para todas as amostras estudadas (Tabela 4). Se observarmos o tratamento de LE 100% no terceiro período, considerado não estatisticamente significativo para genotoxicidade, e analisarmos o índice mitótico para o mesmo material, verificamos que foram encontradas poucas células em divisão. Esta baixa frequência de divisão celular pode ter influenciado também os resultados de genotoxicidade, uma vez que a maioria das alterações genotóxicas contabilizadas são encontradas nas diferentes fases da divisão celular. Sendo assim, podemos sugerir que a biorremediação de seis meses ainda não foi eficiente para biodegradar as amostras de LE e suas associações, já que houve um aumento do potencial genotóxico para todas as amostras, embora este só tenha sido estatisticamente significativo para L+B no T3.

Estes resultados podem ser decorrentes da biodisponibilização de substâncias com potenciais genotóxicos, que acabaram ficando disponíveis aos organismos, após os períodos avaliados para a biodegradação, ou pelo fato de ter aumentado a concentração dessas substâncias, devido à perda de massa do LE, após a biodegradação. Portanto, a biorremediação das amostras de LE+B parece não ter sido eficiente para os tempos testados, e o acréscimo de bagaço de cana de açúcar, nesta amostra, parece ter favorecido o aumento da genotoxicidade da mesma. No entanto, talvez um período maior de biorremediação pudesse ser mais eficiente para a detoxificação da amostra.

Segundo a ISO 17402 de 2008, biodisponibilidade seria o grau em que uma substância química presente no solo podem ser absorvida, metabolizada por seres humanos ou receptores ecológicos, ou ainda transferidas por via trófica. Os testes que avaliam biodisponibilidade são essenciais para os estudos da determinação da toxicidade de contaminantes ambientais e para avaliar as possíveis acessibilidades aos micro-organismos e vegetais superiores (TELHADO, 2009), bem como a toda micro e macro fauna associada.

Devido à multiplicidade de parâmetros de avaliação que envolvem os estudos de biorremediação, podem haver dificuldade na interpretação do processo. Dentre as dificuldades encontradas, podemos citar o nível de toxicidade de cada contaminante, a possibilidade de haver diferentes respostas de biodegradação (ex. degradação incompleta dos compostos) e a diferente biodisponibilidade das substâncias (TELHADO, 2009).

Phillips e seus colaboradores, que monitoraram a biorremediação de três solos contaminados com creosotos, por meio de bioensaios e análises químicas, observaram em seus estudos que, apesar de ter havido uma diminuição dos hidrocarbonetos de petróleo no solo em questão, houve um aumento da toxicidade do mesmo, indicando que podem ter se formado metabólitos intermediários tóxicos durante o processo de biodegradação, conforme foi demonstrado por outros autores (ALEXANDER, 1999; RANDERATH et al., 1999; PHILLIPS et al., 2000). Desse modo, percebemos a importância da utilização dos bioensaios para avaliação da efetividade da detoxificação dos ambientes contaminados. Com isso, acreditamos que a biodisponibilização de certas substâncias, seja pela degradação da matéria orgânica ou pela ação dos micro-organismos, pode ter sido responsável pela genotoxicidade observada em alguns dos nossos tratamentos. Como pudemos notar, os micro-organismos presentes nas amostras podem variar quanto a diversidade e quantidade, tanto entre as amostras como entre os períodos avaliados, o que pode ter levado a uma utilização diferencial temporal das substâncias presentes no meio. Algumas substâncias podem ter se comportado como inertes para o organismo teste, mas, após a sua metabolização por micro-organismos, pode ter se tornado disponível. Outro fator que pode ter sido responsável pela genotoxicidade das amostras foi a diminuição do volume da amostra, decorrente da perda de água das mesmas, e o consequente aumento proporcional das substâncias tóxicas nessas amostras, como já discutido anteriormente.

Para os extratos aquosos (líquido percolado das amostras e o solubilizado) não houve resultados estatisticamente significativos, quando os resultados foram comparados com o controle negativo. Dessa forma, podemos inferir que os compostos potencialmente prejudiciais ao organismo teste *A. cepa* não foram carregados pela água. Portanto, os extratos aquosos do LE aqui

estudados não parecem apresentar riscos de contaminação aos recursos hídricos. A possibilidade de lixiviação química de solos que receberam LE é uma das maiores preocupações apontadas por alguns autores, por estes considerarem que pode haver, devido à percolação dos exudados do LE, uma contaminação das águas superficiais e subterrâneas dada pela ação de águas pluviais (KELLER; MCG8RATH; DUNHAM, 2002).

Tabela 4: Genotoxicidade observada para células meristemáticas de *A. cepa* submetidas à germinação em LE e suas associações.

Amostras	Amostra Bruta			Solubilizado			Percolado	
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2
CN	0,10 ± 0,31	0,18 ± 0,38	0,54 ± 0,65	0,19 ± 0,39	0,48 ± 0,51	0,19 ± 0,40	0,09 ± 0,28	0,29 ± 0,47
CP	4,64 ± 6,47 *	4,74 ± 3,53 *	5,45 ± 4,08 *	2,25 ± 1,08 *	3,35 ± 1,75 *	3,54 ± 1,92 *	3,12 ± 1,18 *	2,45 ± 1,31 *
Solo	0,09 ± 0,28	0,67 ± 0,46	0,85 ± 0,71	0,58 ± 0,68	0,86 ± 0,84	0,59 ± 0,51	---	---
LE 100%	0,66 ± 0,65	0,98 ± 1,04	1,39 ± 1,35	1,34 ± 1,39	1,37 ± 1,63	0,40 ± 0,51	1,46 ± 0,82	---
LE+B	0,49 ± 0,83	2,03 ± 2,69	3,02 ± 1,91 *	0,39 ± 0,67	0,68 ± 1,02	0,67 ± 0,78	0,89 ± 0,86	0,20 ± 0,42
LE+S	0,48 ± 0,69	0,48 ± 0,69	1,22 ± 1,33	0,20 ± 0,42	0,97 ± 0,63	0,39 ± 0,51	---	0,38 ± 0,50
LE+B+S	0,48 ± 0,68	1,07 ± 0,85	1,16 ± 0,62	0,58 ± 0,69	0,98 ± 0,65	0,58 ± 0,69	1,09 ± 1,59	0,20 ± 0,42

* estatisticamente significativo (p<0,05). Fonte: Elaborado pela autora.

Para o parâmetro de mutagenicidade, avaliado por meio do teste de MN e pela presença de quebras cromossômicas (Figura 9), os resultados não foram estatisticamente significativos para nenhuma das amostras testadas (Tabela 5). No entanto, sabe-se também que a composição do LE é muito variável, dependendo da sua origem, das suas características, da época do ano e da eficiência do tipo de tratamento empregado pela ETE (BETTIOL; CAMARGO, 2006; FYTILLI; ZABANIOTOU, 2008; SINGH; AGRAWAL, 2008).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os tratamentos de LE 100% e LE+B não devem ser utilizados como condicionantes de solos agrícolas, pois esses tratamentos induziram a uma diminuição do índice mitótico para ambos os tratamentos, além de um aumento significativo da genotoxicidade para a amostra de LE+B. Contudo, a amostra de LE+S, nas proporções aqui propostas, parece ter sido mais eficiente para a detoxificação do LE, já que não foi observado nenhum resultado estatisticamente significativo para esta amostra, para os 3 parâmetros avaliados (citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade), em nenhum dos tempos estudados, além dos seus valores terem sido, de maneira geral, os mais baixos observados para genotoxicidade e mutagenicidade.

Com relação aos extratos aquosos, nenhuma das amostras apresentou resultados estatisticamente significativos para os parâmetros de genotoxicidade e mutagenicidade, parecendo que o LE estudado não contribui para a contaminação de águas superficiais e subterrâneas.

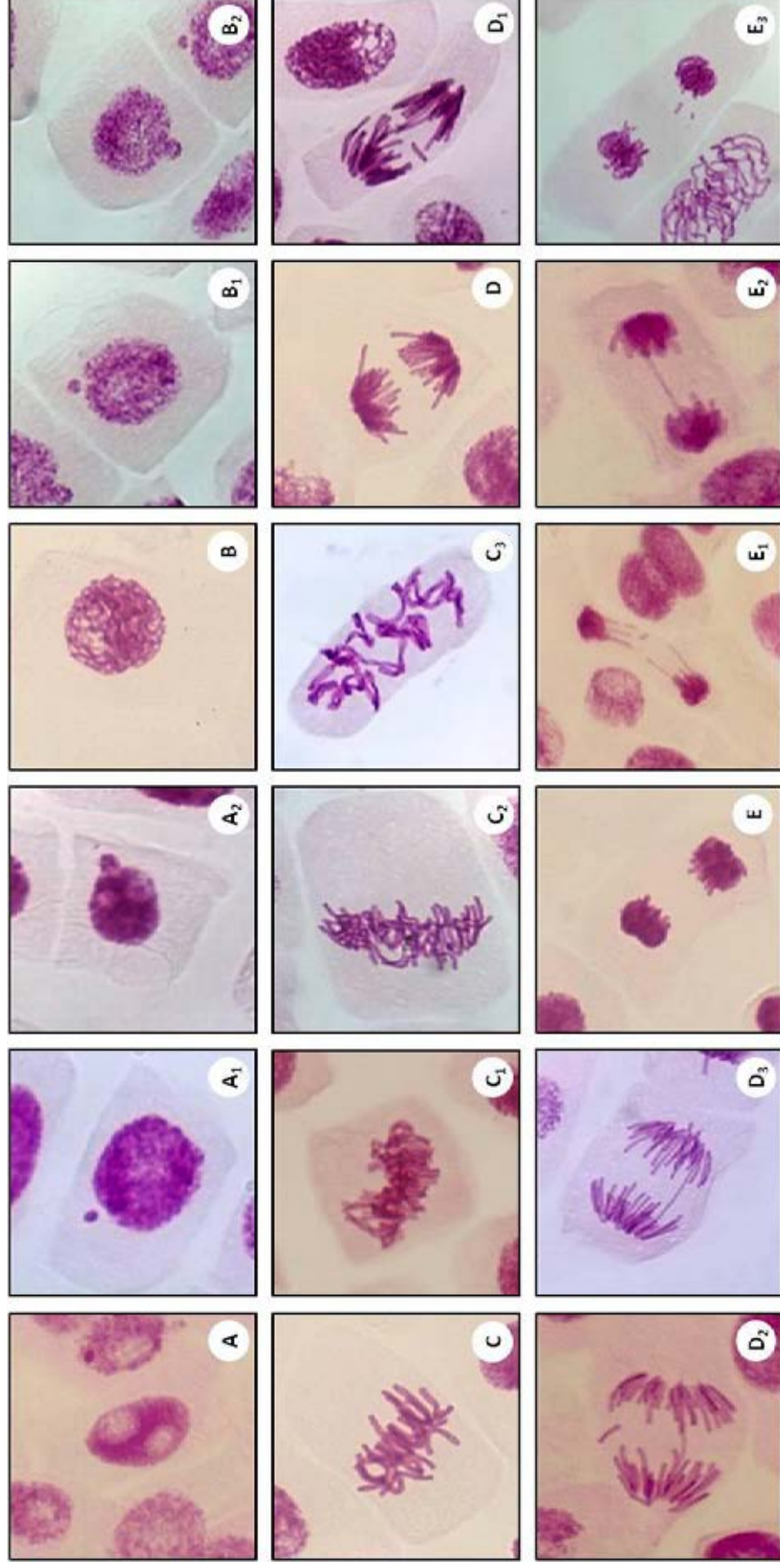
Possivelmente, o tempo definido neste trabalho para a diminuição da toxicidade do LE parece não ter sido suficiente, sendo interessante o acompanhamento de períodos mais longos de biorremediação. Dessa forma, percebe-se que o LE deve ser utilizado com cautela no meio ambiente, pois este pode ter origem bastante diversa e variar, quanto à presença de substâncias tóxicas, induzindo a diferentes resultados do que o observado no presente estudo. Sendo assim, é de crucial importância o estudo de novas tecnologias de biorremediação para a diminuição da toxicidade do LE, para então aplicá-lo de maneira segura no ambiente, propondo desta forma, a reutilização mais sustentável deste resíduo que tem sido cada vez mais produzido nas ETEs. Sugerimos ainda que, para cada LE produzido, antes do mesmo ser disponibilizado como condicionante de solo, ele deva passar por

uma bateria de testes, que incluía uma avaliação citotóxica, genotóxica e mutagênica do mesmo.

Tabela 5: Mutagenicidade observada para células meristemáticas de *A. cepa* submetidas à germinação em diferentes concentrações de LE.

Amostras	Amostra Bruta			Solubilizado			Percolado	
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2
CN	0,09 ±0,29	0,46 ± 0,65	0,10 ± 0,30	0,19 ± 0,40	0,38 ± 0,49	0,28 ± 0,45	0,28 ± 0,45	0,29 ± 0,47
CP	16,61 ±7,41 *	14,34 ± 12,15 *	21,85 ± 12,60 *	6,34 ± 2,28 *	13,57 ± 6,59 *	24,32 ± 3,67 *	8,31 ± 2,72 *	10,53 ± 4,31*
Solo	0,27 ±0,43	0,49 ± 0,70	0,19 ± 0,41	0,29 ± 0,47	0,58 ± 0,50	0,39 ± 0,50	---	---
LE 100%	0,82 ±0,76	0,20 ± 0,41	0,10 ± 0,31	0,68 ± 1,03	1,19 ± 1,47	0,19 ± 0,41	0,30 ± 0,48	---
LE+B	0,99±1,05	0,61 ± 0,56	0,19 ± 0,39	0,48 ± 1,21	0,58 ± 0,68	0,38 ± 0,49	0,79 ± 1,03	1,28 ± 0,83
LE+S	0,58 ±0,96	0,28 ± 0,63	0,10 ± 0,31	0,30 ± 0,48	0,49 ± 0,52	0,19 ± 0,61	---	0,29 ± 0,65
LE+B+S	0,74±0,85	0,48 ± 0,50	0,29 ± 0,66	0,39 ± 0,82	1,67 ± 1,33	0,19 ± 0,39	0,10 ± 0,31	0,58 ± 0,81

* estatisticamente significativo (p<0,05). Fonte: Elaborado pela autora.



A: Interfase normal; A₁: Interfase com micronúcleo (MN), A₂: Interfase com broto nuclear, B: Prófase normal, B₁: Prófase com MN, B₂: Prófase com broto, C: Metáfase normal, C₁: Metáfase com aderência cromossômica, C₂: Metáfase poliplóide, C₃: C-metáfase; D: Anáfase normal, D₁: Anáfase com quebra, D₂: Anáfase com perda e ponte, D₃: Anáfase com ponte, E: Telófase normal, E₁: Telófase com atraso e quebra cromossômica, E₂: Telófase com quebras cromossômica. Fonte: Elaborado pela autora.

5 CONCLUSÃO

Após a realização dos bioensaios obtidos com as amostras submetidas a períodos de um mês, três meses e seis meses de biorremediação pode-se concluir que:

- houve uma alternância na diversidade da microbiota das amostras, sendo que apenas o gênero *Bacillus sp* estava presente em todas as amostras do primeiro período (um mês). O gênero *Pseudomonas sp.* e a espécie *Ochrobactrum anthropi* estavam presentes em todas as amostras avaliadas, após três meses de biorremediação. Para o terceiro período avaliado (seis meses), as bactérias *Acaligenes faecalis* e *O. anthropi* e o fungo do gênero *Penicillium* estavam presentes em todas as amostras.

- nenhuma das amostras testadas foi tóxica para a espécie *A. cepa*. contudo, houve um atraso na germinação das amostras sólidas, para o segundo e terceiro períodos, quando comparados com a germinação dos controles.

- com relação ao índice mitótico, a amostra de LE 100% (no terceiro período de biorremediação) e as amostras de LE+B de todos os períodos estudados, apresentaram uma redução estatisticamente significativa da divisão celular.

- também foi observado um efeito citotóxico, estatisticamente significativo, para os solubilizados de LE+B em T1, LE em T2 e LE+B+S em T3.

- apenas a amostra de LE+B do terceiro período (seis meses de biorremediação) apresentou potencial genotóxico significativo.

- nenhuma das amostras testadas apresentaram potencial mutagênico.

- os extratos aquosos parecem não conter substâncias genotóxicas e mutagênicas solúveis em água, não havendo então, possibilidade de carreamento dessas substâncias para os recursos hídricos adjacentes, quando o LE é aplicado ao solo.

- os períodos de biorremediação testados parecem não ter sido suficiente para a total detoxificação do LE, pois parece ter havido uma biodisponibilização de substâncias tóxicas para o organismo teste *Allium cepa*.

- o bagaço de cana de açúcar pareceu não contribuir para a redução da toxicidade do LE e, em alguns casos, até favoreceu um aumento dos efeitos observados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10.006: 2004** - Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro: ABNT, 2004. 3 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10007: 2004** - Procedimentos para Amostragem de Resíduos, Rio de Janeiro: ABNT, 2004. 25 p.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. Academic Press, p. 453, 1999.

ALMEIDA, V. C.; LENZI, E.; BORTOTTI-FAVERO, L. O.; LUCHESE, E. B. Avaliação do teor de alguns metais e de nutrientes de lodos de estações de tratamento de Maringá. **Acta Scientiarum**, v. 20, p. 419-425, 1998.

ANDREOLI, C. V.; SPERLING, M. V.; FERNANDES, F. **Princípios do tratamento biológico de águas residuais**. Curitiba: FCO, v. 6, 2004.

BADIA-FABREGAT, M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; GAGO-FERRERO, P.; OLIVARES, A.; PIÑA, B.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; VICENT, T.; BARCELÓ, D.; CAMINAL, G. Degradation of UV filters in sewage sludge and 4-MBC in liquid medium by the ligninolytic fungus *Trametes versicolor*. **Journal of Environmental Management**, v. 104, p. 114-120, 2012.

BAMFORTH, S. M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 723–736, 2005.

BERTONCINI, E. I.; MATTIAZZO, M. E. Lixiviação de metais pesados em solos tratados com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 23, p. 737-744, 1999.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. A Disposição de Lodo de Esgoto em Solo Agrícola. In: **Lodo de Esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. 349p.

BOVI, M. L. A.; GODOY JÚNIOR, G.; COSTA, E. A. D.; BERTON, R. S.; SPIERING, S. H.; VEJA, F. V. A.; CEMBRANELLI, M. A. R.; MALDONADO, C. A. B. Lodo de esgoto e produção de palmito em pupunheira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 581-590, 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 375, de 29 de agosto de 2006**. Brasília, 2006.

BUSHRA ATEEQ, M.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, W. A. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2, 4-D and butachlor evaluated by Allium root tip test. **Mutation Research**, v. 514, p. 105-113, 2002.

CARITÁ, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de lodos provenientes de estações de tratamento de esgoto de grandes centros urbanos do Estado de São Paulo, pela metodologia de aberrações cromossômicas em *Allium cepa***. 2007. 63 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

CAVALLARO, N.; PADILLA, N.; VILLARRUBIA, J. Sewage sludge effects on chemical properties of acid soils. **Soil Science**, v. 156, p.63-70, 1993.

FARIA, L. C. **Uso do lodo de esgoto (biossólido) como fertilizante em eucaliptos: demanda, potencial e crescimento das árvores e viabilidade econômica**. 2007. 123 f. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent-Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, 2009.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test as a standart in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

FYTILI, D., ZABANIOTOU, A. Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods e a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 12, p. 116-140, 2008.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.

HENCKLEIN, F. A. **Estabilização de “landfarming” de refinaria de petróleo, mediante metabolismo microbiano, e aplicabilidade em solos pré-desertificados**. 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2008.

HOLMSTRUP, M.; KROGH, P.H.; LOKKE, H.; WOLF, W. de; MARSHALL, S.; FOX, K.; WOLF, W. Effect and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. 4. The influence of salt speciation, soil type, and sewage sludge on toxicity using the collembolan *Folsomia fimetaria* and the earthworm *Aporrectodea caliginosa* as test organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 1680-1689, 2001.

- JIANG, W.; FAN, W. Bioremediation of heavy metal-contaminated soils by sulfate-reducing bacteria. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1140, p. 446–54, 2008.
- KATAOKA, A. P. A. G. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “landfarming”. 2001. 202 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro
- KELLER, C.; MCGRATH, S. P.; DUNHAM, S. J. Trace metal leaching through a soil-grassland system after sewage sludge application. **Journal of environmental quality**, v. 31, n. 5, p. 1550–60, 2002.
- KURÁS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* Test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Chemosphere**, v. 107, p. 211-221, 2006.
- LANNO, R.; WELLS, J.; CONDER, J.; BRADHAM, K.; BASTA, N. Bioavailability of Chemicals in Soil for Earthworms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 39-47, 2003.
- LEITÃO, A. L. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. **International journal of environmental research and public health**, v. 6, n. 4, p. 1393–417, 2009.
- LOPES, J. C.; RIBEIRO, L. G.; ARAÚJO, M. G.; BERALDO, M. R. B. S. Produção de alface com doses de lodo de esgoto. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 143-147, 2005.
- LOPES, M. A. J. B. M. **Incorporação de lodo de esgoto e seus efeitos sobre alguns atributos do solo cultivado com rabanete (*Raphanus sativus* L.)**. 2008. 99 f. Dissertação. (Mestrado) Universidade Católica de Pernambuco: – Recife, 2008.
- LOURENÇO, R. S. **Utilização de lodo de esgoto aeróbio e calado em florestas**. Embrapa-PA, p.1-3. 1997 (Comunicado técnico, 18).
- MAIA, C. E.; MORAIS, E. R. C.; MEDEIROS, J. F. Capacidade de campo, ponto de murcha permanente e água disponível para as plantas em função de doses de vermicomposto. **Caatinga**, v. 18, n. 3, p.195-199, 2005.
- MAILA, M. P.; CLOETE, T. E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants—perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, n. 1, p. 1–8, 2005.
- MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of

water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n.1, p. 148-158, 2006.

MATTA, M. E. M.; KUMMROW, F.; UMBUZEIRO, G. A. Uma possível classificação da periculosidade de lodos de esgoto utilizando testes de toxicidade resultados preliminares. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica**, v. 2, n. 1, p. 49-55, 2009.

MAZZEO, D. E. C. **Avaliação da viabilidade do lodo de esgoto como recondicionante de solos agrícolas, após processo de atenuação natural, por meio de diferentes bioensaios**. 2013. 217 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2013.

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 15, n. 408, p. 4334-4340, 2011.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O. Potencial do lodo de esgoto como fonte de nutrientes para as plantas. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. Eds. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. p.109-141.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O.; MELO, V.P. O uso agrícola do biossólido e as propriedades do solo. In: TSUTIJA, M. T.; COMPARINI, J. B.; SOBRINHO, P. A. et al., (Eds.). **Biossólidos na agricultura**, p. 289–363, São Paulo, Brazil, 2001.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O.; SANTIAGO, G.; CHELLI, R. A. Efeito de doses crescentes de lodo de esgoto sobre frações da matéria orgânica e CTC de um Latossolo cultivado com cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 18, p. 449-455, 1994.

MOLINA-BARAHONA, L.; RODRIGUEZ-VAZQUEZ, R.; HERMANDEZ-VELASCO, M.; VEJA-JARQUIN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**, v. 27, p. 165-175, 2004.

MORAES, R. M.; DELITTI, W. B. C.; MORAES, J. A. P. V. Gas exchange, growth, and chemical parameters in a native Atlantic Forest tree species in polluted areas of Cubatão, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 339-345, 2003.

OLIVEIRA, C. **Avaliação do potencial de contaminação de dois solos agrícolas com lodo de esgoto enriquecido com Cádmio, Chumbo e Zinco**. 1998. 201f. Tese (Doutorado em Ciência do solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 1998.

OLIVEIRA, F. C. **Disposição de lodo de esgoto e composto de lixo urbano num latossolo vermelho- amarelo cultivado com cana-de-açúcar.** 2000. 247 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2000.

OLIVEIRA, F. C.; MATIAZZO, M. E.; MARCIANO, C. R.; ROSSETO, R. Efeitos de aplicações sucessivas de lodo de esgoto em Latossolo Amarelo distrófico cultivado com cana-de-açúcar: carbono orgânico, condutividade elétrica, pH e CTC. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 505-519, 2002.

OZDEMIR, G.; OZTURK, T.; CEYHAN, N.; ISLER, R.; COSAR, T. Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 71-74, 2003.

PANDEY, A.; SOCOOL, C. A.; NIGAM, P.; SOCOOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresouce technology**, v. 74, p. 69-80, 2000

PARAIBA, L. C.; SAITO, M. L. Distribuição ambiental de poluentes encontrados em lodos de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 9, p. 853-860, 2005.

PATRA, M.; SHARMA, A. Relative efficacy of *Allium cepa* and *Allium sativum* in anaphase-telophase test screening metal genotoxicity. **Biologia**, v. 57, p. 409-414, 2002.

PEDROZO, M. F. M. **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo.** Salvador: Centro de Recursos Ambientais, 2002. 246p.

PEREZ-ARMENDÁRIZ, B.; LOERA-CORRAL, O.; FERNANDEZ-LINARES, L.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RODRIGUES-VARQUES, R. Biostimulation of micro-organisms from sugarcane bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. **Letter in Applied Microbiology**, v. 38, p. 373-377, 2004.

PHILLIPS, T. M.; LIU, D.; SEECH, A. G.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 132-139, 2000.

PIRES, A. M. M. **Uso agrícola do lodo de esgoto: Aspectos legais.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Jaguariúna, 4p, 2006.

PLAZA, G.; NALECZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R. L. Assessment of genotoxic activity of petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 415- 420, 2005.

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercâmbios entre cromátidas hermanas.** 1987. 276 f. Tese (Doutorado), Universidade de Complutense, Madrid, 1987.

RANDERATH, K., RANDERATH, E., ZHOU, G. D., SUPONPONG, N., HE, L. Y., RANK, J.; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphasetelophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v. 418, p. 113-119, 1999.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphasetelophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v. 418, p. 113-119, 1998.

RHYKERD, R. L.; CREWS, B.; MCINNES, K. J.; WEAVER, R. W. Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 67, p. 279-285, 1999.

RODRIGUES, G. S. **Bioensaios de toxicidade genética com plantas superiores *Tradescantia* (MCN e SHM), milho e soja.** Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, São Paulo, 56 p., 1999.

RODRIGUES, R. C. L. B. **Influência da disponibilidade de oxigênio no processo descontínuo de obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana.** 2005. 246 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SILVA, E. P.; MOTA, S.; AQUINO, B. F. Potencial de utilização do lodo de esgoto de indústria têxtil como fertilizante agrícola. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. Ceará, v. 8, n.1-2, p. 69-76, 2003.

SILVA, F. C.; BOARETTO, A. E.; BERTON, R. S.; ZOTELLI, H. B.; PEXE, C. A.; BERNARDES, E. M. Efeito do lodo de esgoto na fertilidade de um Argissolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 5, p. 831-840, 2001.

SILVA, J. E.; RESCK, D. V. S.; SHARMA, R. D. Alternativa agrônômica para o bio-sólido produzido no Distrito Federal. I – Efeito na produção de milho e adição de metais pesados em Latossolo no cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 487- 495, 2002.

SIMONETE, M. A.; KIEHL, J. C.; ANDRADE, C. A.; TEIXEIRA, C. F. A. Efeito do lodo de esgoto em um Argissolo e no crescimento e nutrição de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 10, p. 1187-1195, 2003.

SING, H. Mycoremediation. **John Wiley & Sons**, Inc.: New Jersey, USA, 2006. SINGH, A., PARMAR, N., KUHAD, R. C. Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol. **Springer**, v. 28, p. 364, 2011.

SINGH, R. P.; AGRAWAL, M. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. **Waste Management**, v. 28, p. 347-358, 2008.

SOUZA, T. S.; HENCKLEIN, F. A.; ANGELIS, D. F.; GONÇALVES, R. A.; FONTANETTI, C. S. The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1363-1368, 2009.

TEIXEIRA, F. A.; PIRES, A. V.; NASCIMENTO, P. V. N. Bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos. **Revista eletrônica de veterinária**, Itapetinga, v. 8, n. 6. 2007.

TELHADO, M.C.S.C.L. Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo contaminado. 2009. 134f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2009.

URRUTIA M.M. Biosorbent for Metal Ions (Wase J and Forster C, eds.), **Taylor and Francis Publishers** , London, 1997.

URURAHY, A. F. P. Biodegradação de Resíduo Oleoso Proveniente de Refinaria de Petróleo. 344f. Tese DSc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 1998.

VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge contaminated soil. **Environmental international** v.26, p.409-411, 2001.

WHITE, P.A.; CLAXTON, L.D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation Research**, v. 567, p. 227–345, 2004.

XU, Y.; LU, M. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **Journal of hazardous materials**, v. 183, n. 1-3, p. 395–401, 2010.

YALLOUZ, A. V.; CESAR, R. G.; EGLER, S. G. Potential Application of a Semi-quantitative Method for Mercury Determination in Soils, Sediments and Gold Mining Residues. **Environmental Pollution**, v. 151, p. 429-433, 2008.