

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ATRIBUTOS QUÍMICOS, BIOQUÍMICOS E
MICROBIOLÓGICOS EM SOLOS COM 18 ANOS DE
APLICAÇÕES ANUAIS DE LODO DE ESGOTO**

Letícia Fernanda Lavezzo
Zootecnista

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ATRIBUTOS QUÍMICOS, BIOQUÍMICOS E
MICROBIOLÓGICOS EM SOLOS COM 18 ANOS DE
APLICAÇÕES ANUAIS DE LODO DE ESGOTO**

Letícia Fernanda Lavezzo

Orientador: Prof. Dr. Wanderley José de Melo

Coorientadora: Profa. Dr. Lúcia Maria Carareto Alves

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Ciência do solo).

2016

Lavezzo, Letícia Fernanda
L399a Atributos químicos, bioquímicos e microbiológicos em solos com 18
anos de aplicações anuais de lodo de esgoto / Letícia Fernanda
Lavezzo. -- Jaboticabal, 2016
xvi, 71 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Wanderley José de Melo
Banca examinadora: Estavam Guilherme Lux Hope, Thiago Assis
Rodrigues Nogueira
Bibliografia

1. Biossólido. 2. Qualidade microbiológica. 3. Qualidade do solo. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.879.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTORA

Letícia Fernanda Lavezzo, nascida na cidade de Votuporanga, SP, no dia 21 de outubro de 2016. É formada em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Jaboticabal, SP. Durante a graduação, foi bolsista de extensão pelo grupo Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM), realizando intercâmbio para a província de San Miguel de Tucumán, Argentina, onde cursou um semestre de Zootecnia na Universidad Nacional de Tucumán – UNT. Também durante a graduação participou de congressos, cursos, estágios para aprimoramento e realizou iniciação científica no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, na FCAV, sendo orientada pelo Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Júnior. Em maio de 2013, o curso de especialização em saneamento e meio ambiente, pelo Centro Universitário de Votuporanga, SP – UNIFEV, terminando em julho de 2015. Em 2014, ingressou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Ciência do Solo) pela UNESP, Campus de Jaboticabal, SP (bolsista CAPES), sendo orientada pelo Prof. Dr. Wanderley José de Melo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e eterno ensinamento.

Aos meus pais, Any e Lavezzo e a minha irmã Ligia Lavezzo por toda a paciência, apoio e carinho. Por terem feito de meus sonhos, seus sonhos, mesmo distantes, sempre presentes e participativos e por acreditarem na minha capacidade. Obrigada por terem sido meu exemplo, motivo de orgulho e de motivação. A Paulo, por toda a paciência e carinho.

À UNESP, Campus de Jaboticabal-SP, por fornecer toda a infraestrutura essencial para o desenvolvimento desse trabalho. A todos os funcionários da fazenda, obrigada.

Ao Prof. Dr. Wanderley José de Melo, pela oportunidade concedida, pela orientação, pelos ensinamentos e por sempre estar disposto a ajudar, fazendo seu melhor. A Dona Laura, meus sinceros agradecimentos.

À Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves, pela coorientação e por ter disponibilizado seu laboratório para realizar parte desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior, Capes, pela concessão da bolsa de estudos pelo Programa em Agronomia – Ciência do Solo.

Ao Luciano da SABESP de Franca, SP, pela disponibilização do lodo de esgoto.

Aos membros da banca do Exame Geral de Qualificação, Prof. Dr. Wanderley José de Melo, Profa. Dra. Marcela Midori Yada e Prof. Dr. Ricardo Molto Pereira. Aos membros da Comissão Examinadora, Prof. Dr. Wanderley José de Melo, Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hope e Prof. Dr. Thiago Assis Rodrigues Nogueira, pelas valiosas sugestões.

A toda a nossa equipe e amigos do laboratório de biogeoquímica, Digão, Caio, Danilo, Roberta, Antonio, Greyci, Suellen, por toda colaboração, ensinamentos compartilhados, pelas histórias, risadas, pela amizade e troca de receitas, por todos os momentos agradáveis que vocês proporcionam todos os dias no nosso ambiente de trabalho. Juntos somos um “time”!

A Denise e Riviane, braço direito e também protagonistas para a realização desse trabalho. Tive a sorte de encontrar mais do que companheiras de pós-graduação, mas sim amigas, que me deram o exemplo de força e inteligência, além de me mostrarem que somos sempre capazes, principalmente, quando o assunto é ir trabalhar no campo. Às minhas queridas amigas Lary e Mury e ao meu querido amigo Raphael, que sempre estavam dispostos a ajudar, ensinar e a colaborar não só com o meu crescimento profissional, como também o pessoal, vocês são demais.

Ao Prof. Dr. Estevam Guilherme Lux Hoppe, a doutoranda Ana Carolina e ao técnico José por todo apoio laboratorial, troca de conhecimentos e ensinamentos fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho. À técnica Andressa, também do laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, pela ajuda oferecida.

E a todos aqueles que me ajudaram direta e indiretamente, muito obrigada!

“O papel dos infinitamente pequenos na natureza é infinitamente grande”.

Louis Pasteur

SUMÁRIO

Assunto	Página
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE GRÁFICOS	X
SIGLAS	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Reciclagem do lodo de esgoto na agricultura.....	2
2.2. Indicadores biológicos de contaminação do lodo e do solo.....	5
2.2.1. Helmintos.....	5
2.2.2. Coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i>	9
2.3. Atividade enzimática.....	13
2.3.1. Protease.....	15
2.3.2. Redutase do Nitrato.....	16
2.3.3. Urease.....	17
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	18
3.1. Hipótese.....	18
3.2. Objetivos gerais.....	18
3.3. Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Local e histórico do experimento.....	19
4.2. Delineamento experimental e tratamentos.....	23
4.3. Lodo de esgoto.....	24
4.4. Implantação do experimento.....	25
4.5. Coleta das amostras.....	27

4.6. Metodologia empregada.....	29
4.6.1. Quantificação de ovos viáveis de helmintos.....	29
4.6.2. Preparo das diluições das amostras.....	31
4.6.3. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes totais/grama.....	31
4.6.4. Determinação do NMP de Coliformes termotolerantes.....	32
4.6.5. Extração de DNA.....	32
4.6.6. Análise molecular para identificação de genes de toxinas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	32
4.6.7. Análise da atividade da enzima protease.....	34
4.6.8. Análise da atividade da enzima redutase do nitrato.....	34
4.6.9. Análise da atividade da enzima urease.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. Fertilidade do solo.....	35
5.2. Indicadores biológicos do lodo e do solo.....	39
5.2.1. Helmintos.....	39
5.2.2. Coliformes e <i>Escherichia coli</i>	41
5.3. Atividade enzimática no solo.....	46
5.3.1. Atividade da enzima protease no solo.....	46
5.3.2. Atividade da enzima redutase do nitrato no solo.....	48
5.3.3. Atividade da enzima urease no solo.....	50
6. CONCLUSÃO.....	52
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1.	Culturas utilizadas nos dezoito anos de experimento cultivadas em área de Latossolo Vermelho distrófico e Latossolo Vermelho eutroférico.	21
2.	Origem do lodo de esgoto utilizado nos 18 anos de experimento.	21
3.	Atributos químicos do lodo de esgoto proveniente da SABESP de Franca, São Paulo.	25
4.	Caracterização química da área de Latossolo Vermelho eutroférico (LVef) na profundidade de 0-20 cm.	26
5.	Caracterização química da área de Latossolo Vermelho eutroférico (LVd) na profundidade de 0-20 cm.	26
6.	Período e número de amostras coletadas para a realização da PCR.	28
7.	Sequência de nucleotídeos iniciadores para os genes Stx1, Stx2, eae, tamanho do produto de amplificação e sua respectiva temperatura de pareamento.	33
8.	Fertilidade da área de Latossolo Vermelho eutroférico (LVef) na profundidade de 0-20 cm.	36
9.	Fertilidade da área de Latossolo Vermelho distrófico (LVd) na profundidade de 0-20 cm.	36

- | | | |
|------------|--|----|
| 10. | Número mais provável (NMP) de coliformes totais em amostras de Latossolo Vermelho eutroférico e Latossolo Vermelho distrófico tratados com lodo de esgoto por 18 anos consecutivos. | 42 |
| 11. | Número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes em amostras de Latossolo Vermelho eutroférico e Latossolo Vermelho distrófico tratados com lodo de esgoto por 18 anos consecutivos. | 43 |

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Imagem aérea da área no qual foi realizada aplicação do lodo de esgoto no Latossolo Vermelho eutroférico (LVef).	20
2.	Imagem aérea da área no qual foi realizada aplicação de lodo de esgoto no Latossolo Vermelho distrófico (LVd).	20
3.	Índice de insolação mensal durante o período experimental.	22
4.	Índice da precipitação mensal durante o período experimental.	22
5.	Croqui da área de Latossolo Vermelho eutroférico (LVef).	23
6.	Croqui da área de Latossolo Vermelho distrófico (LVd).	24
6.	Índice de insolação mensal durante o período do experimento	34
7.	Sobrenadante de lodo de esgoto e água após duas horas de sedimentação.	29
8.	Separação do lodo de esgoto após a centrifugação.	30
9.	Reação em cadeia da polimerase (PCR) do lodo de esgoto e do solo para diagnóstico da EHEC, EPEC E STEC, através dos genes stx1, stx2 e eae.	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico		Página
1.	Atividade da protease em solo que recebeu a aplicação de 5 Mg ha ⁻¹ de lodo de esgoto no Latossolo Vermelho eutroférico.	47
2.	Média da atividade da enzima protease no solo na área de Latossolo Vermelho eutroférico e Latossolo Vermelho distrófico.	47
3.	Média da atividade da enzima redutase do nitrato no solo na área de Latossolo Vermelho eutroférico e Latossolo Vermelho distrófico.	49
4.	Média da atividade da enzima urease no solo na área de Latossolo Vermelho eutroférico e Latossolo Vermelho distrófico.	51

SIGLAS

°C – grau Celsius

> - Maior

< - Menor

n° - Número

% - Porcentagem

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ATP – Trifosfato de Adenosina

C - Carbono

Ca – Cálcio

cm – centímetro

CO₂ – Gás Carbônico

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

Cr- Cromo

CTC – Capacidade de Troca Catiônica

Cu - Cobre

DAEC - *E. coli* que adere a células epiteliais

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo Trifosfato

EAEC - *E. coli* enteroagregativa

EHEC - *E. coli* enterohemorrágica

EIEC - *E. coli* enteroinvasora

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPEC - *E. coli* enteropatogênica

ETEC - *E. coli* enterotoxigênica

ETE – Estações de Tratamento de Esgoto

g – Gramas

GEE – Gases de Efeito Estufa

g/MS – Gramas por matéria seca

h – Hora

ha – Hectare

H+Al – Acidez potencial

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

K⁺ - Potássio

KCl – Cloreto de Potássio

Kg – Quilograma

KNO₃ – Nitrato de Potássio

LVd – Latossolo Vermelho distrófico

LE – Lodo de Esgoto

LVEf – Latossolo Vermelho eutroférico

m – Metros

Mg²⁺ - Magnésio

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

Mg- Megagrama

min – Minutos

mL – Mililitros

mmolc – Milimol de carga

MO – Matéria Orgânica

N – Nitrogênio

Ni – Níquel

NMP – Número Mais Provável

NR – Nitrato Redutase

NH₃ – Amônia

NH₄ – Amônio

N₂O – Óxido Nitroso

NO₃⁻ - Nitrato

O₂⁻ - Nitrito

P – Fósforo

pH – Potencial Hidrogeniônico

ATRIBUTOS QUÍMICOS, BIOQUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS EM SOLOS COM 18 ANOS DE APLICAÇÕES ANUAIS DE LODO DE ESGOTO

RESUMO - O lodo de esgoto é uma alternativa como fertilizante orgânico na agricultura, porém em sua composição pode apresentar patógenos que oferecem risco ao homem e ao ambiente. Objetivou-se, com o presente estudo, avaliar a fertilidade do solo, e a presença de ovos viáveis de helmintos, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* para os patótipos EHEC, EPEC e STEC e a atividade enzimática das enzimas protease, redutase do nitrato e urease no solo após dezoito anos de aplicações anuais de lodo de esgoto em um Latossolo Vermelho eutroférico (LVef) e Latossolo Vermelho distrófico (LVd). O lodo utilizado foi obtido na SABESP de Franca, São Paulo e o experimento foi instalado em delineamento de blocos casualizados, sendo 4 tratamentos e 5 repetições. Os tratamentos foram T1: controle, apenas com aplicação de adubação mineral, T2: 5, T3: 10 e T4: 20 Mg ha⁻¹ de LE. Antes de ser incorporado ao solo, realizou-se análise do lodo para ovos viáveis de helmintos e coliformes termotolerantes. Aos 40 dias, coletou-se amostras de solo na profundidade de 0-10 cm para avaliação de ovos viáveis de helmintos no solo. Aos 70 dias, coletou-se amostras de solo na profundidade de 0-20cm para a análise da fertilidade. Para a análise de coliformes termotolerantes, seguindo a técnica de tubos múltiplos, as amostras foram coletadas no dia 0, 26, 40 e aos 78 dias. Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar a presença de *Escherichia coli*, coletou-se amostras de solo antes do início do experimento, no dia 0, aos 26 dias, 40, 58, 78, 110 e 146 dias. Para a avaliação da atividade enzimática, as amostras foram coletadas em profundidade de 0-10cm, nos dias 0, 40, 78 e aos 146 dias. Os atributos químicos do solo apresentaram efeito significativo entre os tratamentos utilizados. A análise do solo incorporado com o resíduo apresentou ausência total de ovos viáveis de helmintos no solo após 40 dias da aplicação do LE. Os valores de termotolerantes nos solos variaram entre zero a 1,1x10⁶ Número Mais Provável de Sólidos Totais durante o período de 0 a 26 dias. Para análise de *Escherichia coli* do lodo e do solo, mostrou ausência dos patótipos de EHEC, EPEC e STEC por meio dos primers para os genes stx1, stx2 e aea. A atividade enzimática das enzimas proteases, redutase do nitrato e urease, ao longo do experimento, não apresentaram diferença estatística entre tratamentos. A aplicação do lodo de esgoto por 18 anos consecutivos influenciou nos atributos químicos do solo, não apresentou risco potencial de contaminação do solo por ovos de helmintos e *Escherichia coli* e não diferiu na atividade enzimática do solo.

Palavras-chave: biossólido, qualidade microbiológica, EHEC, STEC, EPEC

CHEMICAL, BIOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL ATTRIBUTES IN SOIL WITH 18 YEARS OF ANNUAL APPLICATION OF SEWAGE SLUDGE

ABSTRACT - The sewage sludge is an alternative as organic fertilizer to use in agriculture, but in its composition may have pathogens that offer to humans and the environment risks. The present study objective was to evaluate soil fertility, and the presence of viable helminth eggs, fecal coliforms, *Escherichia coli* for pathotypes EHEC, EPEC and STEC and the enzymatic activity of protease enzymes, nitrate reductase and urease in the soil after eighteen years of annual applications of sewage sludge in an Oxisol (LVef) and Oxisol (LVd). The sludge used was obtained in SABESP Franca, São Paulo and the experiment was installed in designing randomized blocks, 4 treatments and 5 repetitions. Treatments were T1: control, only with application of mineral fertilizer, T2: 5, T3: T4 10 and 20 Mg ha⁻¹ LE. Before being incorporated into the soil, there was sludge analysis for viable helminth eggs and fecal coliforms. At 40 days, it is collected soil samples at a depth of 0-10 cm for viable helminth eggs evaluation in the soil. After 70 days it is collected soil samples at a depth of 0-20cm for fertility analysis. For fecal coliforms analysis, following the technique of multiple pipes, the samples were collected at day 0, 26, 40 and 78 days. To carry out the polymerase chain reaction (PCR) for the presence of *Escherichia coli* was collected from soil samples before the beginning of the experiment at day 0, after 26 days 40, 58, 78, 110 and 146 days. For the evaluation of enzyme activity, samples were collected at a depth of 0-10cm, on days 0, 40, 78 and 146 days. The soil chemical properties showed significant effects between treatments. Soil testing embedded with the residue showed complete absence of viable helminth eggs in the soil 40 days after the application of the LE. The values in thermotolerant soil ranged from zero to 1,1x10⁶ Most Probable Number of total solids during the period from 0 to 26 days. For *Escherichia coli* analysis sludge and soil, showed absence of pathotypes EHEC, EPEC and STEC through primers for stx1, stx2 and aea. The enzymatic activity of protease enzymes, nitrate reductase and urease to the experiment, showed no statistical difference between treatments. The application for 18 consecutive years sewage sludge influenced the soil chemical properties, showed no potential risk of soil contamination by helminth eggs and *Escherichia coli* and did not differ in the enzymatic activity of the soil.

Keywords: biosolid, microbiological quality, EHEC, STEC, EPEC

1. INTRODUÇÃO

O aumento populacional urbano gera maior produção de resíduos, que se não forem manejados de forma adequada, apresentam potencial carga poluidora, podendo resultar em contaminação de corpos de água, do solo e do ar, gerando problemas socioambientais. Uma preocupação crescente é a disposição desses resíduos, pois necessita de grandes áreas, produz metano e gás carbônico, componentes do efeito estufa, poder ter em sua composição organismos potencialmente patogênicos e elementos traço, que podem entrar na cadeia alimentar humana e de animais, podendo causar danos à saúde. Com isso, a procura por soluções sustentáveis tem sido constantemente estudada.

As Estações de Tratamento de Esgoto (ETE's) são responsáveis pela gestão dos resíduos sólidos urbanos a fim de minimizar os impactos ambientais, sendo o lodo de esgoto (LE), resíduo final gerado no processo de tratamento que pode ter como destino final o aterro sanitário e incineração, porém, o uso na agricultura é uma alternativa atraente. No entanto, sua aplicação na agricultura deve ser avaliada para que o seu uso não se transforme em um problema ambiental.

De acordo com a resolução nº 375, de 2006 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), o lodo apresenta potencial risco à saúde pública e ao ambiente, proliferando patógenos como fungos, vírus, bactérias e helmintos prejudiciais a humanos e ao ecossistema, além de poder conter metais pesados, mas que se manejado da forma adequada pode ser aplicado no solo como alternativa de fertilização orgânica por conter material orgânico e elementos essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas

Tendo em vista a preocupação e busca por sistemas de produção sustentáveis, com uso de tecnologias e medidas práticas que minimizem os impactos ambientais, objetivou-se analisar a qualidade do lodo de esgoto e do solo onde o mesmo foi aplicado por 18 anos consecutivos, avaliando a fertilidade do solo, a presença de indicadores biológicos contaminantes do lodo e do solo, como helmintos, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, como também avaliar

indicativos da qualidade do solo por meio da atividade enzimática da protease, da redutase do nitrato e da urease.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Reciclagem do lodo na agricultura

Devido ao crescimento populacional urbano há aumento da produção de resíduos que caso sejam manejados de forma inadequada, podem ser fontes de patógenos como fungos, vírus e bactérias, com risco de contaminação do ar, água e do solo. O lodo de esgoto, produto final das ETE's, é fonte de matéria orgânica e nutrientes como nitrogênio e fósforo, primordiais ao desenvolvimento das plantas o qual pode reduzir o uso de fertilizantes. O país ocupa o quarto lugar no consumo mundial de fertilizantes, além de ficar susceptível a disponibilidade e variações de preços de insumos (OLIVEIRA et al., 2014).

No Brasil, o principal destino do LE é em aterro sanitário, no qual não há medidas para tratar os problemas de elementos traço, patógenos e o elevado teor de matéria orgânica presente no resíduo (ROCHA et al., 2013), por isso, alternativas adequadas para o descarte do lodo é importante para evitar impactos negativos ao ambiente e problemas de saúde pública. Uma medida interessante para descartar o lodo e reduzir o risco de contaminação ambiental, é adicioná-lo, em pequenas quantidades, à mistura de cimento, como também, pode ser adicionado com carvão sem que haja perda de energia liberada durante o processo de combustão (MALLIOU et al., 2007; ISCHIA et al., 2007).

O LE, se manejado e monitorado de forma adequada, pode ser utilizado como fertilizante orgânico, melhorando a qualidade do solo consequentemente favorecendo a produção agrícola. Também pode contribuir com a diminuição da carga orgânica e microbiológica lançada nos corpos hídricos e no ambiente. Por ser fonte de matéria orgânica, favorece melhorias na estrutura do solo, minimizando

processos erosivos, além de reduzir a extração de minérios para a fabricação de adubos minerais, preservando as jazidas, tornando-se papel importante para a sustentabilidade ambiental (MALTA, 2001; DYNIA et al., 2006). No entanto, o efeito no solo, devido a aplicação do lodo, depende da origem do esgoto tratado, do tipo de tratamento por qual passou e da quantidade aplicada no solo (BUENO et al., 2011).

Quando incorporado ao solo, o lodo de esgoto proporciona alterações em propriedades físicas, como densidade, tamanho dos agregados e capacidade de retenção de água, além de alterações químicas como pH, condutividade elétrica, capacidade de troca de cátions (CTC) e aumento dos teores de fósforo (P), nitrogênio (N) e outros nutrientes. No entanto, os teores de potássio (K) do lodo são baixos, pois é altamente solúvel em água, por isso é perdido no efluente líquido ao longo do tratamento.

A aplicação do LE também altera as propriedades biológicas, geralmente incrementando a atividade microbiana do solo, quando não apresenta limitações com elementos tóxicos em sua composição (MELO et al., 2001; TSUTIYA, 2001). Além disso, com o passar do tempo, o lodo, ao contrário dos fertilizantes minerais, libera de forma contínua e lenta os nutrientes para o solo e as plantas, tornando-o ainda mais vantajoso (POGGIANI et al., 2000).

A aplicação do bio sólido por 5 anos consecutivos em área de Latossolo Vermelho eutrófico e área de Latossolo Vermelho distrófico, favoreceu significativamente no teor de matéria orgânica na camada de 0-10cm de profundidade, resultando em maior estabilidade de agregados do solo nas duas áreas (ZIGOMAR et al., 2005). O uso do lodo também favoreceu a absorção significativa de Ca, P, N e Mg por plantas de sorgo grânifero (OLIVEIRA et al., 1993) e o aumento da dose aplicada melhorou a qualidade e o teor de matéria orgânica do solo devido ao incremento de ácidos húmicos, consequentemente melhorando a fertilidade do solo (TRANNIN et al., 2008; RIVERO et al., 2004).

A aplicação do lodo de esgoto na agricultura tem mostrado melhorias na produtividade, porém, faz-se necessário o conhecimento de sua composição para que sejam calculadas as doses ideais para cada tipo de solo e cultura, evitando que

ocorra a toxicidade das plantas e do meio por excesso ou falta de nutrientes, como também, evitar contaminação por elementos tóxicos.

A reciclagem do LE pode proporcionar benefícios na agricultura, substituindo o uso de fertilizantes, fornecendo matéria orgânica, agentes cimentantes e nutrientes essenciais para o desenvolvimento de cultura, principalmente nitrogênio e fósforo, melhorando as propriedades químicas, físicas e biológicas dos solos, sendo sua aplicação, uma alternativa possível e econômica, reduzindo seu descarte em aterros sanitários os quais requerem áreas muito grandes para serem depositados, altos custos de manutenção, além de ser necessário o monitoramento dessas áreas para que não ocorra contaminação ambiental.

A produção de LE é inevitável e a tendência é aumentar, por isso, alternativas de descarte tem sido estudadas em vários países. Na Europa foi avaliado que o manejo do resíduo em 27 países, tem como principal destino, a aplicação na agricultura (KELESSIDIS: STASINAKIS, 2012). Diante do exposto, o lodo de esgoto como adubo orgânico é uma alternativa economicamente viável e sua reciclagem na agricultura ainda precisa quebrar barreiras de preconceito, devido a origem de sua matéria orgânica, para que sua aplicação na agricultura seja difundida, e assim, desde que manejo do dentro dos padrões estabelecidos, o uso tende a ser uma possível alternativa e sucesso, além de reduzir impactos ambientais.

Por isso, faz-se necessário maiores estudos para embasar e fortalecer a legislação, afim de fiscalizar e controlar o manejo de resíduos e o efeito residual de aplicações sucessivas na agricultura para que haja uma relação solo-planta-homem positiva. Também é válido a criação de políticas que fomentem e estimulem a reciclagem de biossólidos na agricultura e assim reduzir a carga poluente descartada, melhorando aspectos higiênicos, sanitários e ambientais.

2.2. Indicadores biológicos de contaminação do lodo de esgoto

2.2.1. Helmintos

Os helmintos são de grande interesse, pois são capazes de se desenvolver mesmo nos processos de tratamento de esgoto, porém são eventualmente destruídos quando há perda de umidade em processos que utilizam a temperatura, sendo o tratamento químico considerado mais eficiente na eliminação dos ovos helmintos mais resistentes.

Com o intuito de reutilizar o lodo de esgoto na agricultura como adubo orgânico, há necessidade de adoção de práticas eficazes de estabilização do lodo para que ocorra a redução da carga de patógenos, podendo assim ser utilizado com sucesso na agricultura, favorecendo não só o produtor como também o ambiente.

Alguns gêneros como *Ascaris*, *Toxocara*, *Taenia*, *Cryptosporidium* e *Trichuris* são resistentes à ampla variedade de condições físicas e químicas, sendo capazes de sobreviver por vários anos no solo, assim como outros patógenos. São considerados problema de saúde pública e sua presença indica falhas no processo de tratamento (BLACK,1999; CASSINI, 2003).

Segundo a United States Environmental Protection Agency (USEPA, 1992) quando em contato com o solo, os ovos viáveis podem sobreviver de dois a sete anos em condições de sombra e teor de água adequado. As parasitoses ocasionam quadros de diarreia, anemia, debilitando e enfraquecendo o hospedeiro, sendo mais frequentes em populações de baixa renda, as quais não tem contato com saneamento básico. Afetam principalmente crianças devido à falta de hábitos de higiene adequados, pois sua contaminação ocorre devido à ingestão de água e alimentos contaminados.

Em estudo realizado por Cardoso et al. (2005), ao avaliarem a presença de enteroparasitoses entre os usuários de Unidades Básicas de Saúde do município de Campinas, SP, constataram presença de parasitas em 1.255 das 5.925 amostras avaliadas, ou seja, 21,20% das amostras confirmaram presença de patógenos,

sendo maior a prevalência em crianças na idade escolar. A prevalência de enteroparasitas em crianças de 0 a 12 anos nos municípios do Estado de São Paulo variou de 11,5 a 60,7%, 61,3% no município de Niterói, Rio de Janeiro e variando de 53 a 62% no estado de Minas Gerais (FERREIRA; ANDRADE, 2005; MACEDO, 2005; TASHIMA; SIMÕES, 2005; UCHOA et al., 2009; ARAUJO FILHO et al., 2011).

Apesar desses índices terem diminuído nos últimos tempos, as parasitoses ainda são consideradas um problema de saúde pública, principalmente nos estados mais pobres e nas periferias das grandes cidades (ALVES; FILHO, 2005). O saneamento básico precário confirma o descaso socioambiental do país, afetando diretamente a qualidade de vida, além de provocar danos ao ambiente, ferindo a dignidade humana com falta de atendimento mínimo necessário para viver (ROHR: MIRANDA, 2010).

As espécies de helmintos encontrados com maior frequência no lodo de esgoto são *Ascairs* sp., ancilostomídeos, *Taenia* sp., *Toxocara* sp., *Trichuris trichiura*, *Giardia* sp., *Entamoeba spp.* (EPA,1992; GONÇALVES, 2003) sendo o *Ascairs* sp. o mais resistente e com maior taxa de sobrevivência durante o tratamento dos efluentes (KONÉ et al., 2007), quando adulto dentro do hospedeiro, localizam-se no intestino delgado e são capazes de contaminar o ambiente com 200 mil ovos por dia eliminados por cada fêmea (TAYLOR, 2010). Os gêneros e espécies do *T. trichiura*, *A. lumbricoides*, *S. stercoralis* e ancilostomídeos, são geohelmintos, característicos por apresentar obrigatoriamente um ciclo de vida dos helmintos no solo (COURA et al., 2005).

A tricuriase ocorre pela ingestão dos ovos embrionários do parasito pelo hospedeiro, que após 90 dias, começa a eliminar novos ovos com as fezes. O ciclo no ambiente do *T. trichiura*, depende de fatores como umidade e temperatura entre 20 e 30°C e de condições de solo arenoso. A intensidade da infecção vai depender do estado nutricional, idade do hospedeiro e incidência de infecção por outros patógenos intestinais. Pode causar, desde perda de apetite, dor abdominal a congestão discreta da mucosa, hemorragias petequiais, diarreia intensa, diarreia sanguinolenta, tenesmo e dor abdominal difusa (COURA et al., 2005).

A ascaridíase ocorre pela ingestão de ovos do *A. lumbricoides* e começa a ser eliminado pelo hospedeiro após 60 dias da ingestão do ovo do parasito. São

resistentes a fatores edáficos, podendo sobreviver em solos arenosos e argilosos úmidos por até 7 anos o que favorece a sua disseminação. A contaminação pelo hospedeiro pode ocorrer via pulmonar, por meio da inalação dos ovos suspensos na poeira, ou ingeridos por água e alimentos contaminados, podendo o verme adulto sobreviver por até 2 anos no intestino (PESSOA; MARTINS, 1973; MORAES et al., 2000; COURA et al., 2005). Na fase pulmonar pode causar tosse e desconforto, a infecção por grande número de vermes pode levar a casos de diarreia, dor intestinal, pancreatite, cólica biliar e até abscessos intra-hepáticos (WELLER; NUTMAN, 2014).

Ao contrário das geohelmintíases mencionadas, a estrogiloidíase, é causada pela penetração da larva do *S. stercoralis*, que habita o solo, pela pele. Pode causar prurido intenso, lesões urticariformes na pele. Na fase pulmonar pode tosse com expectoração mucopurulenta e diarreia, dor abdominal e sensação de sabor amargo na boca na fase intestinal. Da mesma forma, as ancilostomíases, podem causar infecções via cutânea com penetração da larva, ou também, pela via digestiva. Os ovos e larvas desenvolvem-se melhor em solo arenoso do que argiloso e em temperatura entre 20 e 30°C. O sintoma mais característico da ancilostomíase é o quadro de anemia (COURA et al., 2005).

Por isso, a utilização do LE na agricultura, como fertilizante orgânico, deve seguir as recomendações propostas pela legislação vigente no Brasil, para evitar risco de contaminação ambiental que conseqüentemente pode chegar a humanos e animais.

Segundo a Resolução nº 375, de 2006 do CONAMA, o LE é classificado como lodo Tipo A, quando apresenta ovos de viáveis de helmintos $< 0,25$ ovos g^{-1} de Sólidos Totais (ST), podendo ser utilizado em quaisquer culturas, desde que respeite as restrições previstas na legislação. É considerado Tipo B aqueles LE que apresentam ovos viáveis de helmintos < 10 ovos g^{-1} de ST podendo ser aplicado em culturas restritas, como café, silvicultura e em culturas ligadas a produção de óleos e fibras, sendo obrigatório a aplicação mecanizada. Ainda, conforme a legislação, fica expressamente proibido o uso de qualquer tipo de lodo de esgoto em culturas cuja a parte comestível da planta fica em contato com o solo, cultivo de raízes e tubérculos, olerícolas e pastagens.

Para que LE possa ser utilizado na agricultura é preciso que ele passe por um processo de estabilização para a redução de patógenos e odores. Esse processo pode ser a vermicompostagem, compostagem, caleação que consiste na adição de cal virgem ou cal hidratada ao lodo, exposição do biossólido a elevadas temperaturas e à radiação, digestão aeróbica e anaeróbica, além de hipercloração (SINHA et al., 2010; SPINOSA, 2011; KELESSIDIS; STASINAKIS, 2012).

O sistema de tratamento anaeróbico (UASB) tem se mostrado bastante eficiente para a eliminação de coliformes e sólidos suspensos, porém, ainda há poucos estudos com relação a eliminação de ovos de helmintos (PINTO, 2012). Diversos são os processos para a estabilização e redução de agentes patogênicos do lodo, no entanto, não há nenhum procedimento padrão aceito mundialmente como há para o tratamento da água.

Em estudo realizado por Andreoli et al. (2003), foi demonstrada a eficiência da temperatura na inviabilização dos ovos de helmintos em lodo de esgoto secado com uso de biogás comparado com o tratamento controle. A amostra inicial apresentou 46,26 ovos viáveis, sofrendo redução no oitavo dia para 0,44 ovos viáveis g/MS no tratamento com biogás contra 4 ovos viáveis g/MS do controle com predominância de 85% de ovos de *Ascaris* sp. em relação aos outros gêneros.

De acordo com Vanzo et al. (2001) o lodo proveniente da ETE de Franca no ano 2000 apresentou 3,15 ovos viáveis aumentando para 8,05 viáveis g/MS no ano seguinte, evidenciando falhas no processo de tratamento e estabilização do LE sendo necessário maior controle e medidas eficientes para minimizar o problema. As análises de amostras de lodo de esgoto da Estação de Reciclagem de Nutrientes do Sertão da Carangola, Rio de Janeiro, utilizado como adubo em couve em estudo realizado por Rocha (2003), indicaram presença de 85% de amostras contaminadas com *Toxocara* sp., 80% contendo *Ascaris* sp., 75% de *Ancylostoma* sp. e 60% contaminadas com *Trichuris* sp., sugerindo alto nível de parasitose na população local.

Resultados opostos foram encontrados por Reinaldo et al. (2014) que não identificaram a presença de nenhum ovo ou larva de helminto no lodo de esgoto puro ou submetido a diferentes tratamentos com adição de fontes de carbono,

sugerindo que a compostagem realizada como forma de estabilização, tenha sido eficiente para a eliminação de parasitas que ofereçam risco a saúde pública.

O tratamento e disponibilização do LE requer medidas profiláticas e de combate do foco de micro-organismos, como também é necessário a adoção de ações para a redução da carga contaminante. É válido, a atuação em conjunto da Estação de Tratamento com a rede pública e particular de atendimento médico local para a identificação do padrão de parasitas de maior incidência populacional para que a ETE, conhecendo os patógenos mais frequentes, consiga tratar com eficácia os resíduos que até a ela chegam.

É importante também, a adoção de medidas profiláticas para minimizar a infecção por enteroparasitas, através de campanhas de conscientização da população sobre a importância da higiene mínima das mãos antes de qualquer refeição e após utilizarem o banheiro, principalmente nas populações com acesso ao saneamento básico deficitário e crianças, pois estão mais suscetíveis devido a maior exposição a cargas contaminantes.

2.2.2. Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

Os coliformes são bactérias do grupo Gram-negativos, não formam esporos, são aeróbios facultativos e fermentadores de lactose em até 48 h com ótimo de 35°C. Fazem parte da microbiota intestinal dos seres humanos e animais homeotérmicos por isso, podem indicar a presença de contaminação fecal de origem humana ou animal, sendo que *Escherichia coli* indica a ocorrência recente da contaminação. O uso de antibióticos de amplo espectro favorece o desenvolvimento de micro-organismos prejudiciais, afetando a microbiota intestinal (INGERSON-MAHAD; REID, 2011). Além de serem naturalmente encontrados no ambiente como o solo, vegetais e nos insetos (SILVA et al., 1997; LOPES; AMARAL, 2008), os coliformes termotolerantes não são causadores de doenças ao homem, no entanto a sua presença indica que há contaminação fecal, podendo chegar até a água e alimentos que poderão receber micro-organismos patogênicos.

A presença desses micro-organismos é importante para a avaliação de aspectos higiênicos e sanitários, funcionando como indicativo da qualidade e eficiência de tratamentos que visam à eliminação de agentes patogênicos ao homem e animais. A avaliação de coliformes totais também é importante pois sua presença funciona como um indicativo de crescimento microbiano e por isso não devem ser menosprezados, sendo necessária análise para coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, segundo a Portaria MS nº 518/2004 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

A contaminação pelos sorotipos patogênicos de *Escherichia*, um dos principais gêneros do grupo dos coliformes, da família Enterobacteriaceae, pode causar sintomas como náuseas, vômitos, dor abdominal, desidratação e diarreia, que podem ocorrer em 12 a 24 h após o contato com esses micro-organismos (FORSYTHE, 2002; WHO, 2002).

As linhagens de *E. coli* causadoras de diarreia são classificadas de acordo com sua patogenicidade ou síndromes que causam e estão distribuídas em seis patótipos, *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* que adere a células epiteliais (DAEC) e *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) (GERMANI; LE BOUGUENÉC, 2008; CROXEN; FINLAY, 2010; CLEMENTS et al., 2012). A presença desses genes não indica que a cepa é necessariamente patogênica, mas sim que há condição de combinação apropriada com genes de virulência capazes de ocasionar doenças (GILMORE; FERRETI, 2003).

A incidência de infecções por esse grupo de coliformes, assim como dos helmintos, também pode estar relacionada a condições higiênicas e sanitárias deficientes da população, assim como a contaminação da água com material de origem fecal (KONEMAN et al., 2001). Para que essas bactérias causem infecções intestinais, necessariamente deve haver atendimento a três características: devem ser capazes de entrar no intestino por meio da ingestão de água e ou alimentos contaminados, permanecer nesse ambiente e ser capaz de interferir nas atividades celulares normais deste órgão (INGERSON-MAHAD; REID, 2011).

O isolamento de cepas de *E. coli* tem sido recorrente em laboratórios e considerada doença infecciosa que acomete praticamente todos os sistemas orgânicos e tecidos humanos (WINN et al., 2008) sendo o grupo EPEC, *E. coli* enteropatogênica, o mais isolado no Brasil, causador de diarreia aguda em 30% de crianças de baixa renda (FRANZOLIN et al., 2005; GIRÃO et al., 2006), sua transmissão, assim como nas *E. coli*, ocorre pela via oral fecal.

A EPEC não produz toxina Shiga e é dividida em EPEC típica, portadora do plasmídeo de virulência responsável pela adesão nas células epiteliais e comumente causadoras de diarreia em países em desenvolvimento e EPEC atípica, que não possui o plasmídeo, mais comum em países industrializados (TRABULSI et al., 2002).

O grupo EHEC, *E. coli* enterohemorrágica, acomete indivíduos de qualquer idade, são associadas a casos de diarreia com sangue devido a danos que causam nos vasos sanguíneos que recobrem o intestino, gastroenterites e síndrome hemolítica urêmica, podendo até causar falência renal em crianças (KARMALI, 1989; NATARO; KAPER, 1998; AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; TORRES, 2010). O sorotipo O157:H7 é a EHEC mais frequentemente encontrada (MARTINS et al., 2003).

A STEC, produtora da toxina Shiga, tem como principal reservatório os ruminantes, podendo ser transmitida através do contato direto com pessoas e animais infectados e por meio do consumo de água e alimentos contaminados com fezes contendo as cepas da bactéria (KARMALI, 1989).

Micro-organismos patogênicos estão presentes em resíduos sólidos sendo capazes de sobreviver nesse meio, disseminar através do solo e serem inseridos na cadeia humana via alimentos contaminados por dejetos aplicados ao solo como fertilizantes (ISLAM et al., 2004).

A reciclagem do lodo de esgoto na agricultura, como fertilizante orgânico, deve atender a critérios estabelecidos de acordo com a Resolução nº 375, de 2006 do CONAMA, que propõe contaminação de coliformes termotolerantes $< 10^3$ NMP g⁻¹ ST, para lodo Tipo A e considera lodo Tipo B aquele que apresenta coliformes termotolerantes $< 10^6$ NMP g⁻¹ de ST com uso restrito como já descrito anteriormente.

Em relação à saúde pública, a utilização de efluentes para fins produtivos ainda é controverso na comunidade técnico-científica internacional quanto a qualidade dos efluentes (ZACARIAS et al., 2014). Em caso de manejo inadequado, são fontes de vetores patogênicos como fungos, vírus e bactérias, com risco de contaminação do ar, a água e o solo.

O não atendimento às exigências estabelecidas pela legislação, pode causar danos ambientais que chegarão ao homem e animais ocasionando um problema de saúde pública, pois esses micro-organismos podem permanecer no solo e na água durante dias e até anos, variando de acordo as condições de temperatura, umidade, incidência de radiação solar, disponibilidade de matéria orgânica, pH do solo, competição e predação pela microbiota local.

Segundo Andrade-Neto (1997), associado a esse conjunto de fatores ligados a sobrevivência dos micro-organismos no solo, está a dose infectiva, ou seja, é a quantidade mínima necessária de micro-organismos que são capazes de ocasionar infecção em uma pessoa, além da rota de transmissão prioritária dos mesmos. O sequenciamento de cepas de *E. coli* associadas a virulência, é um recurso disponível para identificar o potencial patogênico dos micro-organismos.

Diversos são os tratamentos de estabilização para redução da carga microbiana do LE, sendo eles a compostagem e vermicompostagem que são processos biológicos, adição de cal virgem como processo químico e processos físicos, como a secagem térmica e solarização. Almeida et al. (2007) mostraram eficiência do tratamento do lodo com adição de cal virgem na dose de 25% do peso seco do LE incubado por 60 dias, reduzindo de $1,4 \times 10^7$ NMP de coliformes totais e $1,3 \times 10^7$ NMP de coliformes termotolerantes no tratamento controle para $1,7 \times 10^3$ e 2×10^2 NMP de coliformes totais e termotolerantes, respectivamente, no tratamento químico, com adição de cal.

Em estudo realizado por Rocha et al. (2003), não foi identificada a presença de coliformes termotolerantes após 54 dias da aplicação do LE tratado proveniente do Instituto Ambiental de Petrópolis, Rio de Janeiro. Santos (2004), analisando a presença de coliformes termotolerantes em solo fertirrigado com esgoto sanitário tratado com intervalos de aplicação de mais de uma semana, verificou ausência total

desses micro-organismos, porém quando a fertirrigação era suspensa apenas por uma semana, encontrou a presença de coliformes até a profundidade de 20 cm.

Frente a esse desafio, o uso do LE na agricultura é uma alternativa economicamente viável, que proporciona menor dano ambiental para sua deposição final, além de favorecer a redução do uso de fertilizante mineral, pois é fonte de adubo orgânico e nutrientes essenciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas. No entanto, ainda há necessidade de maiores estudos para estabelecer um tratamento padrão para a estabilização desse material, afim de que haja eficiente eliminação de patógenos do homem e animais e assim, possa haver maior fiscalização e controle dos órgãos competentes para que a aplicação do lodo de esgoto possa ocorrer de forma efetiva e ambientalmente correta.

2.3. Atividade enzimática no solo

Além de acomodar micro-organismos patogênicos, o solo é um ambiente heterogêneo, rico em micro-organismos essenciais para a manutenção e desenvolvimento do sistema solo-planta. Os micro-organismos do solo são responsáveis pela disponibilidade e qualidade dos nutrientes, além de servir como indicador biológico. Nesse sentido, atuam nos processos de decomposição da matéria orgânica, participando diretamente no ciclo biogeoquímico dos nutrientes e, consequentemente, mediando a sua disponibilidade no solo (ANDREOLA; FERNANDES, 2007).

As enzimas são proteínas capazes de acelerar as reações metabólicas e conhecidas por possuir eficiência catalítica, também estão presentes no solo e são responsáveis por degradar resíduos orgânicos, como as proteases, por exemplo, fazem parte da ciclagem de nutrientes, como é o caso da urease, assim como estão envolvidas na formação da matéria orgânica e estruturação do solo, além de atuarem no funcionamento e manutenção dos seres vivos (MENDES; VIVALDI, 2001).

O solo é essencial para sequestrar gases de efeito estufa, sendo uma das principais fontes de óxido nitroso (N_2O), responsável pela qualidade da água e do ar,

assim como pelo ciclo hidrológico e remediar contaminações por compostos químicos, como pesticidas, inseticidas, entre outros (BURNS et al., 2006; RODRIGUES; MELLO, 2012), por isso, a análise da atividade enzimática serve como indicativo da qualidade do solo, devido ao fato das enzimas serem sensíveis a mudanças ocorridas no meio e devem ser analisadas de forma individual, uma vez que cada enzima é responsável por uma função específica. Pode-se dizer que a atividade microbiana é responsável por mais de 60% das emissões de óxido nitroso (IPCC, 2001).

O nitrogênio (N), elemento essencial para o desenvolvimento de plantas, aumentando a produtividade dos grãos e o acúmulo de proteínas para a cultura de milho (PAVINATO et al., 2008). É absorvido na forma inorgânica N-NH_4^+ e N-NO_3^- , podendo ser fornecido ao solo, por meio de fertilizantes ou minerais orgânicos, ou fixação biológica de N_2 atmosférico. O N pode ser perdido por volatilização da amônia do solo, aumentando os teores de NH_3 atmosférico (SUTTON et al., 1993; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Por ser nutriente fundamental para o crescimento das plantas, a demanda por fertilizantes nitrogenados na agricultura tem aumentado, liberando compostos nitrogenados para o ambiente, por ter baixo aproveitamento pelas culturas (GARCIA et al., 2013), então, o que não é assimilado pelos micro-organismos e plantas é perdido para o solo, água e atmosfera, intensificando as taxas de emissões de gases de efeito estufa (GEE).

Mesmo em pequenas concentrações, o óxido nitroso (N_2O), tem potencial de aquecimento 300 vezes maior que o CO_2 , podendo ser considerado um dos principais GEE, contribuindo para o consumo de ozônio (O_3) (RODRIGUES; MELLO, 2012). Estima-se que até 2020 a emissão de gases de efeito estufa será de $3,23 \text{ t g}^{-1} \text{ CO}_2 \text{ eq}$ (MCTI, 2013).

O aproveitamento do N no solo depende de processos físicos, químicos e biológicos, relacionados a mineralização e imobilização, nitrificação e desnitrificação, lixiviação e volatilização, que irão permitir que o nitrogênio permaneça adsorvido na camada agricultável do solo, que seja aproveitado pelas plantas ou que se moverá no perfil do solo, chegando a atingir camadas mais profundas (SPADOTTO, 2002; BONO et al., 2008).

A nitrificação é o processo que envolve ação de bactérias que transformarão a amônia em nitrato, forma assimilável pelas plantas. Esse processo sofre interferência da umidade do solo, apresentando maior eficiência da oxidação da amônia em solo com menor teor de água, sendo a atividade praticamente inexistente em solos saturados devido à falta de oxigênio no meio, ocorrendo desnitrificação da amônia que será transformada em N_2O por ação das bactérias (DITTERT; MUHLING, 2009; SANGER, 2011).

De acordo com Hoffman (2001), a emissão do óxido nitroso pode ser acentuada quando há algum tipo de alteração da atividade natural do solo, como por exemplo, a adição de fertilizantes, preparo do solo para o plantio e revolvimento durante a colheita, mesmo em baixas temperaturas. Em contrapartida, Skiba e Smith (2000), indicam que elevadas temperaturas favorecem o processo de nitrificação e desnitrificação, consumindo mais oxigênio durante a atividade, tornando o solo favorável a condições de anaerobiose, que irá aumentar a emissão do óxido nitroso.

O manejo e propriedades do solo, variações sazonais, vegetação de cobertura e ações antrópicas, interferem diretamente na atividade biológica do solo, afetando no processo bioquímico dos nutrientes, logo, sua disponibilidade para as plantas e liberação para o meio. Em vista disso, a quantificação da atividade enzimática no solo, pode identificar alterações nos processos metabólicos, fundamentais para avaliar os efeitos das práticas de manejo adotadas (CARNEIRO et al., 2008).

2.3.1. Protease

A protease, enzima envolvida no ciclo do N e na decomposição da matéria orgânica do solo, é responsável pela mineralização do N orgânico (MONDINI et al., 2006), convertendo-o em forma inorgânica disponível para as plantas. A imobilização do nitrogênio é o processo reverso da mineralização e ocorre a conversão da forma do N inorgânico para a orgânico. Esses dois processos dependem da relação C: N da MO do resíduo no solo, quando alta, 30:1, favorece a

imobilização, quando menor do que 20:1, favorece uma mineralização mais rápida (LOPES,1989).

A atividade da protease, varia de acordo com a dose de resíduos aplicados no solo, mostrando leve aumento com aplicação de 12t ha⁻¹ de LE, reduzindo significativamente com a aplicação de doses mais elevadas de 24 t ha⁻¹, segundo estudos realizado por Crecchio et al. (2004). Ao contrário de resultados encontrados por Alves et al. (2010) que avaliaram diferentes doses de lodo de esgoto proveniente da ETE de Barueri, São Paulo, aplicado em área de Latossolo Vermelho distrófico e em área de Latossolo Vermelho eutroférico, identificando aumento da atividade da protease com o aumento da dose de LE aplicada no solo.

De acordo com Melo et al. (2002), a atividade da protease foi mais elevada, principalmente na camada de 0-10cm devido a aplicação de adubo orgânico constituído por 80% de pupa cítrica e 20% de esterco de galinha, favorecendo a atividade microbiana, logo, aumentando a atividade enzimática, fato que também foi observado por Kandeler et al. (1999).

2.3.2. Redutase do nitrato

É a primeira enzima que catalisa a redução do nitrato (NO₃⁻) para nitrito (NO₂⁻) sob condições anaeróbicas, denominado processo de nitrificação, seguido de nitrificação, que é oxidação dos nitritos em nitratos. No processo de nitrificação pode ocorrer também, a produção de N₂O, por meio do nitrito redutase, agindo na redução de NO₂⁻ a NO e do óxido nítrico redutase, catalisando a redução do NO a N₂O (KLOTZ; STEIN, 2008).

A nitrato redutase (NR) é uma enzima cuja atividade é influenciada por fatores climáticos como temperatura e pluviosidade, sendo a fixação do nitrogênio prejudicada por temperaturas do solo abaixo de 7°C e em solos encharcados. As propriedades físico-químicas dos solos também influenciam na quantidade de N fixado, com baixa fixação em solo compactados por apresentarem falta de oxigênio, inibindo a atividade biológica. O pH do solo é fator crítico para o desenvolvimento da

atividade microbiana, sendo considerado ideal na faixa de 6,0 a 6,5, além de influenciar a disponibilidade de potássio, fósforo, molibdênio e cobalto necessários em quantidades adequadas, para a fixação de nitrogênio no solo (BOOM, 2002).

Em estudo realizado por Purcino et al. (1994), utilizando doses de 20 e 60 kg ha⁻¹ de ureia em cultura de milho, foi demonstrado que a atividade da NR não sofreu interferência com as diferentes doses de aplicação da ureia, no entanto, em cultura de milho quando aplicada com potássio, na dose de 100 kg ha⁻¹ de N e 40 kg ha⁻¹ de K, houve melhora na atividade da enzima (SILVA et al., 2011).

2.3.3. Urease

É a enzima responsável pela hidrólise da ureia liberando amônia (NH₃⁺) e gás carbônico (CO₂). A velocidade com que ocorre essa reação depende da quantidade de ureia que foi aplicado no solo, do tipo de vegetação e da disponibilidade e facilidade de decomposição da matéria orgânica como fonte de energia para micro-organismos do solo. Sua atividade no solo estima o quanto de N orgânico pode ser convertido em inorgânico, iniciando o processo de mineralização (DICK et al., 1996; SANTOS: CAMARGO, 1999; VICTORIA et al., 1992) e sua atividade é maior quando maior for o teor de matéria orgânica presente no solo (ROLDÁN et al., 2003).

Em estudo realizado por Trannin et al. (2007), foi demonstrado que a atividade da urease sob aplicação de LE e adubo mineral em cultura de milho, não diferiu entre os tratamentos e apenas apresentou maiores resultados que o controle, sem adubação, quando foi aplicado dose máxima de LE, ao contrário dos resultados obtidos por Garcia-Gil et al (2000), que identificaram redução da atividade da urease de 20 e 28% com a aplicação de lodo de esgoto compostado na dose de 20 e 80 t ha⁻¹, respectivamente, fato que pode ser explicado pela presença de elementos traço que inibem a atividade desta enzima.

Sabe-se que a agricultura é um potencial poluidor do ambiente e que algumas práticas agrícolas favorecem a emissão de gases de efeito estufa. Diante disso, o entendimento do comportamento da atividade enzimática no solo é um dos

importantes fatores para identificar quais são os melhores tipos de manejo e uso do solo que devem ser adotados, a fim de ter melhor aproveitamento da adubação, consequentemente, obter melhor produtividade, reduzindo os impactos ambientais, uma vez que no Brasil, 94% do total da emissão de óxido nítrico, é oriundo de mudanças de uso e manejo dos solos (CERRI; CERRI, 2007).

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1. Hipótese

Devido ao elevado teor de matéria orgânica do lodo de esgoto, origem da mesma, ser fonte de nitrogênio e haver a possibilidade do processo de tratamento do LE ser ineficiente, esperava-se:

- Melhora da qualidade do solo.
- Contaminação do solo com micro-organismos patogênicos e outros fatores maléficos que poderão ser inseridos na cadeia alimentar além de causar danos ambientais.
- Intensificação da atividade enzimática das enzimas relacionadas com o ciclo do nitrogênio.

3.2. Objetivos gerais

Analisar a qualidade do lodo de esgoto obtido na ETE de Franca, SP, operada pela SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo).

Analisar o solo de uma área de Latossolo Vermelho eutrófico e de uma área de Latossolo Vermelho distrófico, que há 18 anos recebe aplicações sucessivas de LE, avaliando a qualidade, a presença de micro-organismos patogênicos e a atividade enzimática.

3.3. Objetivos específicos

- a. Avaliar o teor de matéria orgânica, pH, micronutrientes, capacidade de troca catiônica (CTC) e saturação por bases (V%) do solo.
- b. Avaliar a presença ovos viáveis de helmintos em amostras de lodo e solo.
- c. Determinar a presença de patótipos de *Escherichia coli* (STEC, EPEC, EHEC) no lodo e solo, por meio de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).
- d. Avaliar a atividade enzimática: Protease, Nitrato Redutase e Urease

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local e histórico do experimento

O experimento foi instalado em novembro de 1997 e há 18 anos recebe doses anuais de LE na área experimental da Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da UNESP, Campus de Jaboticabal – SP, (21°15'22" S e 48°15'18" W, altitude 618m), cujo clima é Aw segundo classificação de Köppen (VOLPE, 2008).

O solo de uma área é Latossolo Vermelho eutroférico (LVef) e o da outra área é Latossolo Vermelho distrófico (LVd), representadas na Figura 1 e 2 (EMBRAPA, 2006). Adotou-se o delineamento experimental em blocos casualizados com 4 tratamentos e 5 repetições.



Figura 1. Imagem aérea da área no qual foi realizada aplicação do lodo de esgoto no Latossolo Vermelho eutroférico (LVef).

Fonte: Google Maps



Figura 2. Imagem aérea da área no qual foi aplicado lodo de esgoto no Latossolo Vermelho distrófico (LVd).

Fonte: Google Maps

As culturas utilizadas no decorrer dos dezoito anos de experimento estão descritas na Tabela 1, assim como a origem do lodo de esgoto que foi obtido de diferentes Estações de Tratamento de Esgoto operadas pela SABESP está descrito na Tabela 2. As médias de insolação e precipitação mensal durante o período experimental estão representados na Figura 3 e 4.

Tabela 1. Culturas utilizadas nos dezoito anos de experimento cultivadas em área de Latossolo Vermelho distrófico e Latossolo Vermelho eutroférico.

Ano agrícola	Cultura
1996/1997 a 2001/2002	Milho
2002/2003	Girassol
2003/2004	Crotalária
2004/2005 a 2007/2008	Milho
2008/2009	Girassol
2009/2010 a 2012/2015	Milho

Tabela 2. Origem do lodo de esgoto utilizado nos 18 anos de experimento.

Ano Agrícola	Origem do Lodo
1996/1997 a 2004/2005	Barueri
2005/2006 a 2006/2007	Franca
2007/2008 a 2008/2009	Barueri
2010/2011 a 2012/2013	Monte Alto
2014/2015	Franca

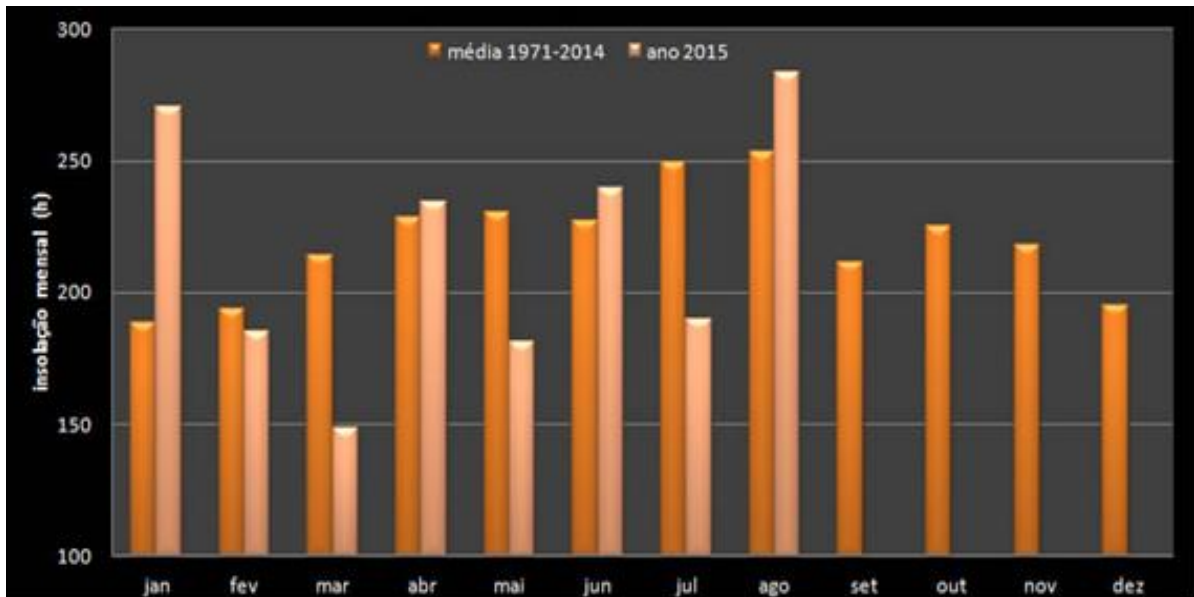


Figura 3. Índice de insolação mensal durante o período experimental.

Fonte: Estação Agroclimatológica da Unesp, Jaboticabal, São Paulo.

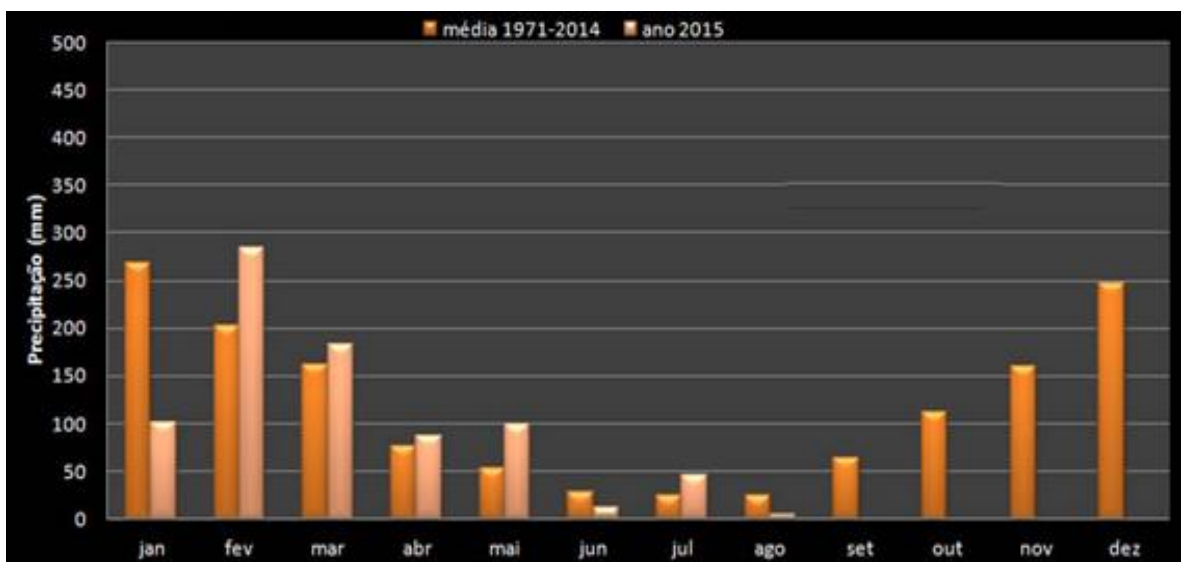


Figura 4. Índice de precipitação mensal durante o período experimental.

Fonte: Estação Agroclimatológica da Unesp, Jaboticabal, São Paulo.

4.2. Delineamento experimental e tratamentos no ano agrícola 2014/2015

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro tratamentos e cinco repetições, aplicados nas mesmas parcelas dos anos anteriores (Figura 5 e 6).

Os tratamentos foram divididos em:

T1 - controle: não foi realizada a aplicação de lodo de esgoto, apenas fertilização mineral baseada na análise de solo e indicações de Raij et al. (1997).

T2 - 5 Mg ha⁻¹ de lodo de esgoto, base seca.

T3 - 10 Mg ha⁻¹ de lodo de esgoto, base seca.

T4 - 20 Mg ha⁻¹ de lodo de esgoto, base seca.

Os tratamentos com LE receberam aplicação de fertilizantes minerais, N-P-K, afim de receberem as mesmas quantidades de nutrientes que a parcela testemunha.

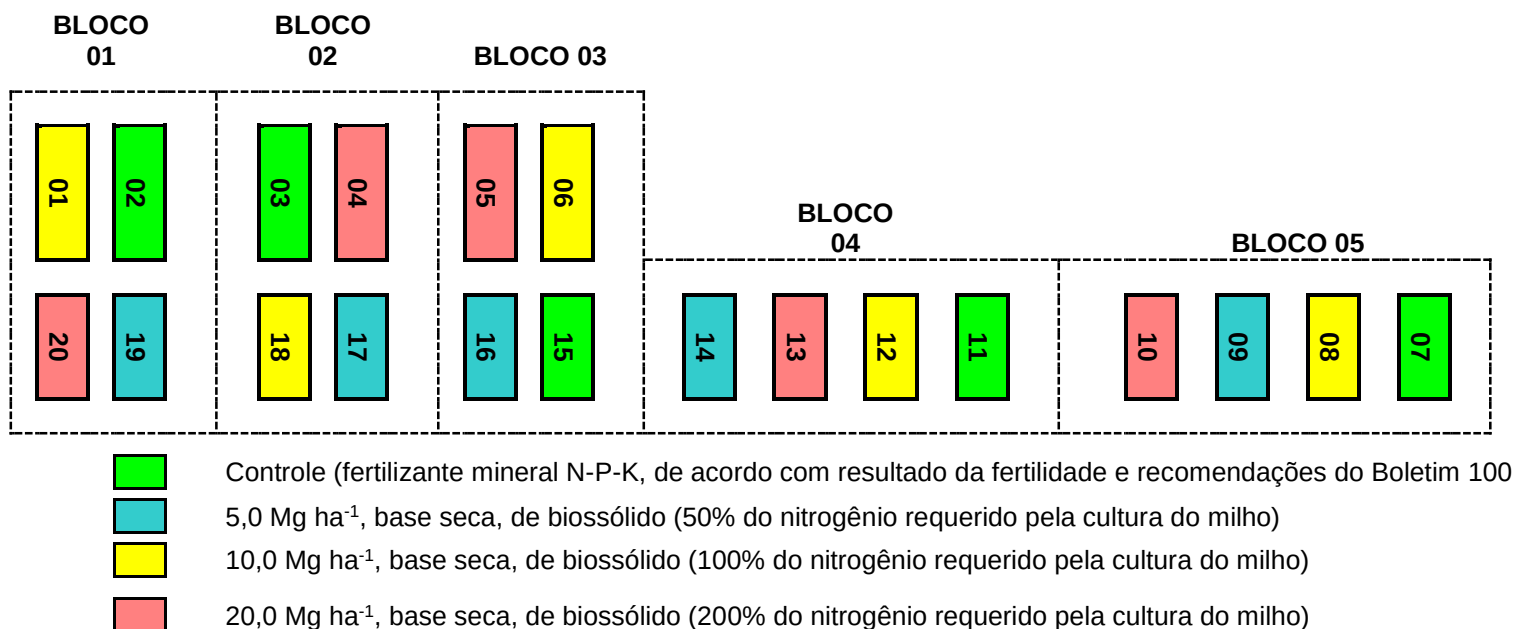


Figura 5. Croqui da área de Latossolo Vermelho eutrófico (LVef).

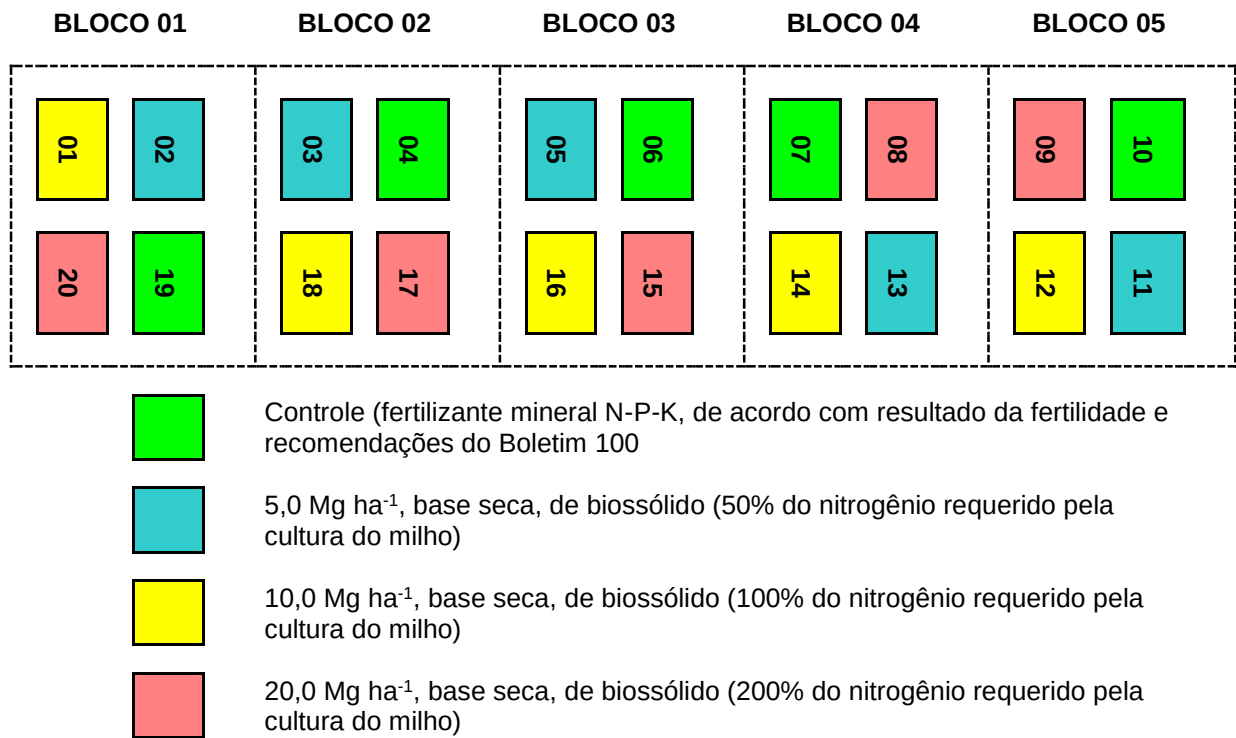


Figura 6. Croqui da área de Latossolo Vermelho distrófico (LVd).

4.3. Lodo de esgoto

O lodo de esgoto utilizado foi proveniente da Estação de Tratamento de Esgoto de Franca, São Paulo, operada pela SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo).

Antes do lodo ser aplicado no solo, foi realizada uma amostra composta formada por seis amostras simples, coletadas em diferentes pontos da massa do resíduo (ABNT, 2004) para a análise dos atributos químicos (Tabela 3), para avaliação de ovos viáveis de helmintos acordo com a metodologia descrita por Bailenger (1979) modificado por Ayres e Mara (1996) e avaliação de coliformes termotolerantes segundo a técnica de tubos múltiplos (APHA,2001).

Tabela 3. Atributos químicos do lodo de esgoto proveniente da SABESP de Franca, São Paulo.

		Cd	Cu	Cr	Ni	Zn	Pb	N	P	K
Lodo	de	-----mg.Kg ⁻¹ -----								
Esgoto										
SABESP										
FRANCA 2014		0,94	164,8	159,2	89,4	500	37,6	328,5	473,34	4,3
Resol.										
375/2006										
CONAMA		39	1500	1000	420	2800	300	-	-	-

4.4. Implantação do experimento

O experimento foi instalado em 11 de dezembro de 2014 nas mesmas parcelas. A aplicação do lodo foi feita a lanço de forma manual, com a umidade com que chegou da ETE (80 %), seguida de incorporação com grade leve a cerca de 10 cm de profundidade. A cultura avaliada foi a cultura do milho, semeado aos 5 dias da aplicação do lodo e logo após ter recebido a adubação de semeadura, em espaçamento de 0,9 m entre linhas, com 7-9 plantas por metro linear, em parcelas de 60 m² de área (6 x 10 m). A dose da adubação de cobertura foi calculada de acordo com a fertilidade das amostras do solo coletados antes do início do experimento (Tabela 4 e 5), e então realizada a primeira dose da adubação de cobertura aos 48 dias após o plantio com aplicação da segunda dose aos 59 dias.

Tabela 4. Caracterização química da área de Latossolo Vermelho eutroférico (LVef) na profundidade de 0-20 cm.

Tratamentos	P resina	MO	pH	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	H+Al	SB	CTC	V
	mg/dm ³	g/dm ³	CaCl ₂	mmolc/dm ³						%
0	57,8	27,0	5,3	5,1	26,4	18,0	35,2	50,0	85,0	58,0
5	74,4	26,6	5,0	5,0	26,4	14,6	42,6	46,0	89,0	52,0
10	83,0	26,4	5,3	5,2	27,2	17,8	35,6	50,0	86,0	59,0
20	86,2	27,4	5,2	5,5	25,8	15,2	40,4	47,0	87,0	54,0

Tabela 5. Caracterização química da área de Latossolo Vermelho eutroférico (LVd) na profundidade de 0-20 cm.

P										
Tratamentos	resina	MO	pH	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	H+Al	SB	CTC	V
	mg/dm ³	g/dm ³	CaCl ₂	mmolc/dm ³						%
0	71,0	21,2	5,3	3,0	22,4	15,2	25,2	41,0	66,0	60,0
5	91,0	23,2	5,1	2,6	19,6	11,2	28,2	33,0	62,0	55,0
10	109,0	25,8	5,2	2,8	23,6	12,6	28,0	39,0	67,0	58,0
20	118,4	25,4	5,1	2,4	23,4	14,0	29,8	40,0	70,0	57,0

4.5. Coleta das amostras de solo

Aos 70 dias, as amostras de solo foram coletadas com trado tipo holandês na camada de 0-20 cm para análise da fertilidade (RAIJ et al., 2001). De cada parcela, foram retirados dez pontos de amostras simples da linha e entre linha, que foram misturadas para formar uma amostra composta e encaminhadas imediatamente para o laboratório, onde foram passadas em peneira com 2 mm de malha (TFSA), secas ao ar e a sombra para as análises químicas, analisando o pH, teores de matéria orgânica, fósforo, enxofre, cálcio, magnésio, potássio, alumínio, H+Al, a capacidade de troca catiônica (CTC) e saturação por bases (V%). Os resultados foram submetidos às análises estatísticas utilizando-se o programa estatístico SAS - System for Windows 9.2 (SAS, 2008). A análise de variância foi realizada de acordo com o nível de significância no teste F para os tratamentos e realizada a comparação de médias por (Tukey, $P < 0,05$).

Aos 40 dias, coletou-se amostras compostas de solo, na profundidade de 0-10cm com auxílio do trado tipo holandês, para a avaliação de ovos viáveis de helmintos no solo. As amostras foram coletadas em 10 pontos, heterogêneos de cada parcela formando uma amostra simples, as quais foram misturadas de acordo com o mesmo tratamento, formando um total de oito amostras compostas, sendo quatro da área de Latossolo Vermelho eutrófico e quatro da área de Latossolo Vermelho distrófico. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos estéreis, guardadas em caixa térmica com gelo e encaminhadas imediatamente para análise no departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UNESP, Campus de Jaboticabal - SP

Para a análise de coliformes termotolerantes no solo, coletou-se da mesma forma como descrito para a avaliação de helmintos no solo, amostras compostas no dia 0, 26, 40 e aos 78 dias (retirados após aplicação da segunda dose da adubação de cobertura), sendo 16 amostras compostas do LVef e 16 amostras do LVD, totalizando 32 amostras compostas, as quais foram encaminhadas ao Departamento

de Tecnologia da UNESP, Campus de Jaboticabal – SP onde foram submetidas às análises microbiológicas.

Para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizou-se as amostras compostas de solo coletadas de acordo com a tabela 6.

Tabela 6. Período e número de amostras coletadas para a realização da PCR.

Coletas (Dias)	LVef	LVd
Número de amostras compostas coletadas		
Antes da aplicação do LE	4	4
0*	4	4
26	4	4
40	4	4
58	4	4
78	4	4
110	4	4
146	4	4
Amostragem de LE	1	
Total	65	

*Dia 0 foi considerado o dia de aplicação e incorporação do LE que foi em 11/12/2014

Para avaliação da atividade enzimática foram utilizadas as amostras compostas coletadas no dia zero, dia de aplicação e incorporação do lodo, com 40 dias, 78 e 146 dias após o início do experimento e armazenadas em freezer a -20 °C, totalizando 64 amostras para cada atividade enzimática específica. A análise estatística da atividade enzimática foi realizada por meio do Proc Reg do software SAS para a análise de regressão polinomial (SAS, 2008).

As análises, de modo geral, foram realizadas em períodos diferentes ao longo do experimento para que fosse possível avaliar a sobrevivência dos micro-organismos no solo, uma vez que se trata de uma área que há 18 anos recebe aplicações anuais de lodo de esgoto.

4.6. Metodologia empregada

4.6.1 Quantificação de ovos viáveis de helmintos

Para a análise do lodo de esgoto, utilizou-se o método modificado de Bailenger (1979) modificado por Ayres e Mara (1996) o qual é eficiente para a detecção de ovos de helmintos em lodo. Na amostra de lodo foi adicionada água e deixado sedimentar por 2 h. Após esse tempo, coletou-se 90% do sobrenadante com a ajuda de um sifão (Figura 7).



Figura 7. Sobrenadante de lodo de esgoto e água após duas horas de sedimentação.

As alíquotas foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL com adição de solução de detergente Triton X-100 e centrifugadas a velocidade de 1000 g por 15 min. O sobrenadante foi removido e o conteúdo restante foi centrifugado novamente

pelo mesmo tempo e velocidade descritos anteriormente. O pellet formado foi suspenso em solução tampão de ácido acético (pH 4,5) e éter etílico, agitados em vórtex e novamente encaminhados para a centrifugação (Figura 8).



Figura 8. Separação do lodo de esgoto após a centrifugação.

Após a remoção do sobrenadante, adicionou-se solução de sulfato de zinco e agitadas em vórtex. Dessa solução, foram transferidas alíquotas para câmaras de McMaster e deixadas em repouso por 5 min para a leitura final em microscópio com objetiva de 10x.

O cálculo de ovos encontrados por litro foi realizado de acordo com seguinte equação:

$$N = AX/PV$$

Onde:

N= número de ovos por litro de amostra

A= número de ovos encontrados na câmara de McMaster

X= volume do produto final (mL)

P= volume da câmara de McMaster (0,3mL)

V= volume inicial da amostra (em litros)

Para a análise de helmintos no solo, utilizou-se a mesma metodologia para o LE, descrita anteriormente, porém, devido a elevada turbidez das amostras, para confirmação dos resultados, também foram realizadas as metodologias de sedimentação espontânea de Hoffman et al. (1934), Yanko (1987), técnica de Willis (1921) e Gordon e Whitlock (1939), uma vez que o material estudado é de origem fecal.

4.6.2. Preparo das diluições das amostras.

De cada amostra foram pesados, de forma asséptica, 25 gramas de solo e colocados em 225 mL de água peptonada a 0,1% esterilizada e após homogeneização em agitador por meia hora, foi obtida diluição inicial 10^{-1} . A seguir, foram preparadas diluições decimais até 10^{-5} (APHA 2001).

4.6.3. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais/grama.

Teste presuntivo: três tubos de caldo lauril sulfato triptose com tubo de Durhan invertido foram inoculados com 1 mL a partir das diluições 10^{-1} a 10^{-5} . Após foram incubados a 35 °C por 24 a 48 h e considerados positivos aqueles com multiplicação bacteriana e produção de gás (APHA 2001).

Teste confirmativo: de cada tubo com resultado positivo no teste presuntivo foi transferido, com alçada de níquel-cromo de 3 mm de diâmetro, uma alçada da cultura para tubos correspondentes contendo caldo lactose-bile-verde brilhante a 2% e tubo de Durhan invertido. A incubação foi realizada a 35 °C por 24 a 48 h e considerados positivos os que revelavam multiplicação bacteriana e produção de gás (APHA 2001).

4.6.4 Determinação do NMP de Coliformes termotolerantes.

A partir de cada tubo de caldo lauril sulfato triptose com resultado positivo no teste presuntivo para coliformes totais, inoculou-se com alça tubos correspondentes contendo caldo EC e tubo de Durhan invertido. A incubação foi realizada em banho-maria a $45,5 \pm 0,2$ °C por 24 ± 2 h e considerados positivos tubos com desenvolvimento bacteriano e presença de gás (APHA 2001)..

4.6.5. Extração de DNA.

O DNA microbiano do solo foi extraído usando o Power Soil® DNA Isolation kit seguindo e cumprindo as especificações do fabricante.

4.6.6. Análise Molecular para Identificação de Genes de Toxinas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A determinação dos patótipos de *E. coli*, EHEC, EPEC e STEC foi realizada por meio da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), por meio dos primers para os genes stx1, stx2 e eae (Tabela 7).

Tabela 7. Sequência de nucleotídeos iniciadores para os genes Stx1, Stx2, eae, tamanho do produto de amplificação e sua respectiva temperatura de pareamento.

Iniciador	Sequência	Produto de amplificação (pb)	Temperatura pareamento (C)
Stx1For	TTA GAC TTC TCG ACT GCA AAG	531	55
Stx1Rev	TGT TGT ACG AAA TCC CCT CTG5		
Stx2 For	TTA TAT CTG CGC CGG GTC TG	327	55
Stx2 Rev	AGA CGA AGA TGG TCA AAA CG		
Eae For	CAT TAT GGA ACG GCA GAG GT	791	55
Eae Rev	ATC TTC TGC GTA CTG CGT TCA		

Para tanto, cada reação de amplificação foi conduzida em volume de 20 μ L contendo: 1 μ L de DNA molde; 0,5 μ L de solução de dNTPs (10 mM); 1.0 μ L de cada iniciador a 5 pM (Tabela 5); 0,6 μ L da enzima Taq DNA polimerase (1.5 U/ μ L); 2,0 μ L de solução tampão (10 X) para a reação de PCR com 0.8 μ L de $MgCl_2$ (50 mM) e o restante, até completar 20 μ L, de água ultra-pura (Milli Q) previamente esterelizada.

Esta mistura foi submetida a um termociclador a 94°C por 4 min (desnaturação); seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturação), temperatura de pareamento (específica para cada oligonucleotídeo iniciador) por 1 min (pareamento) e 72°C por 1,5 min (extensão). O último ciclo foi realizado a 72°C por 7 min para completa extensão da Taq DNA polimerase.

Uma alíquota desta reação contendo apenas água, sem DNA, foi usada como controle negativo e uma alíquota usada com DNA da cepa padrão de *Escherichia coli*, foi utilizada como controle positivo. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, corado com Safe Imager 2.0 Blue-Light Transilluminator (Invitrogen). Foi usado como referência um marcador de peso molecular conhecido (100 pb DNA Ladder - Invitrogen).

4.6.7. Análise da atividade da enzima protease

Para a avaliação da atividade da protease, adicionou-se solução tampão, caseína como substrato em 1g de solo e incubadas a uma temperatura de 50 °C sob agitação por 2 h. Então, adicionou-se 5 mL de TCA, seguido de centrifugação por 10 min a 10.000 rpm. Retirou-se 5 mL do sobrenadante no qual foi adicionado 7,5 mL de reagente alcalino, incubados por 15 min a temperatura ambiente. Após a incubação, adicionou-se 5 mL de reagente de Folin e filtradas as amostras, permanecendo em repouso por 1 h para realização da leitura em espectrofotômetro a absorbância de 700 nm (LADO; BUTLER, 1972).

4.6.8. Análise da atividade da enzima redutase do nitrato

Para a atividade da redutase do nitrato, utilizou-se o método descrito por Abdelmagid e Tabatabai (1987), o qual consiste na adição de solução 2 mL de DNP em 5 g de solo sendo seco com ventilador por 2 h e então, adicionado 10 de KNO_3 nas amostras e 10 mL de água deionizada nos brancos e incubadas a uma temperatura de 30°C por 24 h. Em seguida, adicionou-se 25 mL de KCl nos frascos, agitados por 30 min e passado todo o conteúdo em papel filtro. Retirou-se 10 mL do filtrado e adicionado 0,2 mL de sulfanilamida a 0,5% e 0,2 mL de N-Naftil Etilenediamine a 0,3%. Após 20 min, realizou-se a leitura a absorbância de 540 nm.

4.6.9. Análise da atividade da enzima urease

Para a atividade da urease, seguiu-se o método de May: Douglas (1976), com a adição de 0,5 mL de toluol em 3 g de solo e 12 mL de água deionizada, ficando em repouso por 10 min na BOD. Então, adicionou-se 3 mL de uréia nas amostras que foram incubadas a 30°C por 1 h e adicionado 15 mL de KCl+ Acetato de Difenil de Mercúrio em todos os frascos, seguido de leitura através da titulação com H₂SO₄.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Fertilidade do solo

Os tratamentos utilizados em 18 anos consecutivos de aplicação de lodo de esgoto apresentaram diferença nos teores de fósforo (P), potássio (K⁺) e acidez potencial (H+Al) no L_{Vef} (Tabela 8). No L_{Vd}, os atributos químicos pH, matéria orgânica (MO), P, magnésio (Mg²⁺), H+Al e capacidade de troca catiônica (CTC), apresentaram efeito significativo.

Tabela 8. Fertilidade da área de Latossolo Vermelho eutroférico (LVef) na profundidade de 0-20 cm.

Tratamentos	pH	MO	P	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	H+Al	CTC
Mg ha ⁻¹ de LE	CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	-----mmolc dm ⁻³ -----				
0	4,70a	27,66a	72,33b	31,67a	13,30a	3,20a	44,00ab	91,50a
5	4,80a	27,00a	52,66b	36,67a	12,60a	2,03b	40,33b	86,60a
10	4,83a	29,00a	93,66b	41,67a	14,60a	2,53b	46,67ab	101,16a
20	4,56a	31,00a	206,00a	39,33a	13,60a	3,20a	52,67a	95,23a

(*) valores seguidos de mesma letra na coluna não apresentam diferença significativa entre si, ao nível de probabilidade de 5% (Tukey, P<0,05).

Tabela 9. Fertilidade da área de Latossolo Vermelho distrófico (LVd) na profundidade de 0-20 cm.

Tratamentos	pH	MO	P	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	H+Al	CTC
Mg ha ⁻¹ de LE	CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	-----mmolc dm ⁻³ -----				
0	4,96a	22,00c	23,00c	31,00a	11,00b	1,93a	30,33c	76,00c
5	5,16a	24,00c	24,00bc	33,00a	14,33a	2,23a	33,00bc	80,06bc
10	5,03a	26,30bc	26,33ab	33,00a	11,66ab	1,96a	37,66b	83,40b
20	4,33a	29,00a	29,00a	31,00a	10,66b	1,96a	48,66a	93,33a

(*) valores seguidos de mesma letra na coluna não apresentam diferença significativa entre si, ao nível de probabilidade de 5% (Tukey, P<0,05).

A diferença encontrada no teor de P, extraído pelo método da resina, nas duas áreas já era esperada pois o LE é fonte desse nutriente. Os valores variam de 52,66 a 206,00 mmolc dm⁻³ no LVef e de 23,00 a 29 mmolc dm⁻³ no LVd. Nota-se que na maior a dose de LE aplicado, maior foi o teor de P no solo, assim como, com o aumento da dose, aumentou o teor de matéria orgânica favorecendo a retenção e disponibilidade desse macro nutriente no solo (MARIA et al., 2007).

Em estudo realizado por Marques et al. (2007), que avaliaram diferentes doses de LE proveniente da ETE de Suzano, São Paulo, aplicados no solo destinado ao plantio de cana-de-açúcar, também identificaram maiores teores de P

com o aumento da dose de LE fornecida. Resultados semelhantes foram constados Bonini et al. (2015), que aplicaram LE obtido na SANEAR de Araçatuba, São Paulo, em solo cultivado com eucalipto e braquiária, obtendo efeito significativo no teor de P sendo maior conforme o aumento da dose aplicada.

Segundo Costa et al. (2014), resultados positivos nos atributos químicos como teor de P, MO, pH e CTC foram obtidos em solo que recebeu durante 6 anos aplicações de lodo de esgoto procedente da ETE de Jundiaí, São Paulo. Em outro estudo, também de longo prazo realizado por Yada (2014), evidenciou diferenças nos teores de P e K⁺ em LVef e LVd que há 16 receberam aplicações anuais de LE.

A acidez potencial das duas áreas apresentou diferença entre os tratamentos avaliados, variando de 40,33 a 52,67 e 30,33 a 48,66 mmolc dm⁻³ no LVef e LVd, respectivamente. Em estudo realizado por Kitamura et al. (2008) corrobora com o presente trabalho, identificando diferença nos valores de H+Al no tratamento que recebeu aplicação de LE. Aplicações de diferentes doses de LE de indústria de fibras e resinas por dois anos consecutivos em solo destinado ao cultivo de milho, também causaram aumento da H+Al no solo. Resultados opostos foram encontrados por Yada (2014) e Guedes et al. (2006) que identificaram redução dos valores da acidez potencial em áreas que receberam diferentes doses de lodo de esgoto.

Os teores de K⁺ foram significativos apenas no LVef, variando de 2,03 a 3,20 mmolc dm⁻³. Por facilmente solúvel em água, a quantidade de K⁺ encontrada no LE é baixa, ficando mais concentrado na fase líquida do tratamento da ETE (TSUTIYA, 2000; MELO, et al., 2004), indicando que deve haver suplementação desse nutriente por meio de adubação mineral (MELO et al., 2007). A concentração de potássio após a aplicação do resíduo diminuiu quando comparado com a concentração encontrada antes da adubação do solo com o LE (Tabela 4). Essa redução pode ter sido ocasionada pela absorção desse nutriente pelas plantas (FIA et al., 2005).

Resultados opostos foram encontrados por Chiba et al. (2008) ao avaliar o efeito da aplicação de LE proveniente da Companhia de Saneamento de Jundiaí, SP, em solo com cultivado com cana-de-açúcar, e Barbosa et al. (2008), ao avaliar o efeito da aplicação do LE em área de LVef por dois anos consecutivos, não obtendo efeito significativo no teor de K⁺ solo. Nogueira et al. (2006) identificaram aumento

no teor de K^+ após a aplicação do LE quando comparado com o teor inicial antes da aplicação do resíduo no solo, resultado contrário ao encontrado no presente estudo.

A capacidade de troca catiônica (CTC) do LVd mostrou efeito significativo, variando de 76 a 93,33 mmolc dm⁻³ sendo o maior teor no tratamento que recebeu 20 Mg t⁻¹. O lodo favorece o teor de matéria orgânica no solo, gerando a presença de cargas negativas que promoverão o aumento do teor da CTC no solo (SILVA et al., 1995). Pode-se considerar que os solos das duas áreas avaliadas atendem as necessidades nutricionais das plantas pois maior parte da CTC foi ocupada por Ca^{2+} , K^+ e Mg^{2+} , indicando a qualidade do solo (RONQUIM, 2010).

Após dois anos de aplicação consecutiva de diferentes doses de LE, Barbosa et al. (2008) também identificaram efeito significativo no teor da CTC, aumentando conforme aumentou a dose utilizada. A adubação do solo com LE digerido anaerobicamente para cultivo de milho safrinha, favoreceu a CTC do solo, principalmente nos tratamentos que receberam maior concentração de LE, segundo estudo realizado por Barbosa et al. (2007).

Resultados opostos foram encontrados por Yada (2014), ao avaliar a aplicação de LE por 16 anos consecutivos em áreas de LVef e LVd, não identificando diferença nos atributos de CTC, Ca^{2+} e Mg^{2+} para os tratamentos avaliados. Estudo realizado por Oliveira et al. (2002), com aplicação de LE por dois anos consecutivos em área LVd, também não encontrando alterações expressivas para o teor de CTC.

Nota-se que o solo após a incorporação do resíduo, apresentou maior acidez quando comparado com o solo antes do início do experimento e foi identificado efeito significativo no pH do LVd. Costa et al. (2008) sugerem que a dissociação do amônio da matéria orgânica, favorece a acidificação do solo, dissociação a qual atua como carreador de cátions para camadas subsuperficiais que acabam sendo removidos, consequentemente, acidificam os solos.

Resultados encontrados por Kitamura et al. (2008) corroboram com o presente estudo, identificando diferença no pH, MO e Mg^{2+} em solo que por dois anos consecutivos recebeu doses de LE. A acidez alta encontrada nos solos pode ser devido a biodecomposição da MO que ocasionou poder de acidificação dos solos (CAMARGO et al., 1999; FRANCHINI et al., 2001). Decréscimos significativos no valor do pH também foram identificados por Nascimento et al. (2004) com o aumento

da dose de LE aplicada no solo. Por outro lado, Ricci et al. (2010) identificaram diferença ao avaliar o pH do solo após receber aplicações de diferentes doses de LE, porém observaram aumento do pH com o aumento da dose utilizada.

Os teores de MO encontrados no LVd variaram entre 22 a 29 g dm⁻³, que foi maior no tratamento que recebeu 20 Mg ha⁻¹ de LE. A dose mais alta de LE também proporcionou efeitos expressivos no teor de MO do solo de acordo com Nascimento et al. (2004). Da mesma forma, Yada (2014) ao estudar o efeito de 16 anos de aplicações de LE em LVe e LVd, identificou diferença no teor de MO do LVd entre o tratamento de 20 Mg ha⁻¹ de LE em relação ao tratamento controle, que recebeu apenas adubação mineral. Resultado oposto foi identificado por Nogueira et al. (2006) que não encontraram diferença estatística para o teor de MO para os diferentes tratamentos de LE.

O teor de Mg²⁺ no LVd, variou de 10,66 a 14,33 mmolc dm⁻³, apresentando melhor resultado para o tratamento de 5 Mg ha⁻¹. Efeito significativo no teor de Mg²⁺ também foi encontrado por Barbosa et al. (2008), ao avaliar a aplicação de LE no solo por dois anos consecutivos, que identificaram melhores resultados para as doses de 24 e 36 Mg ha⁻¹ por ano. Corroborando com esses resultados, Ricci et al. (2010) identificaram efeito significativo para Mg²⁺ nos diferentes tratamentos avaliados.

5.2. Indicadores biológicos do lodo e do solo

5.2.1. Helmintos

A amostra de LE, no momento de ser aplicado no solo, apresentou 10,06 ovos viáveis de helmintos g⁻¹ de ST e segundo o CONAMA, não está classificado como lodo Tipo A nem B que admite valores inferiores a 0,25 ovos g⁻¹ de ST e menor do que 10 ovos g⁻¹ de ST, respectivamente, por isso, não deveria ser utilizado na agricultura sendo considerado potencial poluidor do ambiente, recursos hídricos e

causar danos à saúde do homem e animais por meio da ingestão de água e alimentos contaminados por esses parasitas, fato que levaria a reciclagem desse bio-sólido, ao fracasso. Porém, as amostras compostas de solo incorporado com o LE após 40 dias, não apresentaram presença de ovos viáveis de helmintos.

O elevado número de ovos de helmintos no lodo pode indicar falhas do sistema de tratamento e período de estabilização insuficiente, como também pode estar associado a precariedade de saneamento básico oferecido a população, gerando maior exposição e contato com a carga parasitária, o que será fator condicionante para o desenvolvimento de doenças causadas por parasitas.

Segundo Borges et al. (2011) a ocorrência de enteroparasitose está associada a aspectos socio-econômicos e educacionais, agravados com a falta de saneamento básico, ineficiência do tratamento da água e contaminação do solo e dos alimentos. Resultado semelhante foi encontrado por Silva et al. (2010) em estudo realizado com lodo de esgoto doméstico, no qual identificou a presença de 4,70 ovos viáveis de helmintos g^{-1} de ST, diminuindo a zero após 60 dias de vermicompostagem.

Em outro estudo, Dores-Silva et al. (2011) também encontrou no primeiro dia de coleta, a presença de 10 ovos viáveis de helmintos g^{-1} de ST em amostras de vermicomposto com matriz de 100% de lodo de esgoto doméstico, tornando-se inferiores a 0,25 ovos g^{-1} de ST após 30 dias do início da vermicompostagem. Rossman et al. (2014), encontraram 28 ovos viáveis por grama de sólidos totais de LE, proporcionando a contagem zero após 72 h da caleação do lodo. Segundo o mesmo autor, 99% dos ovos ficam inviáveis entre 105 e 117 de dias armazenamento do lodo com variação do pH entre 9,4 a 11,6.

Resultados opostos foram encontrados por Nogueira et al. (2007) que não identificaram a presença de ovos de helmintos em LE não higienizado, proveniente da ETE de Juramento, Minas Gerais, destinado a aplicação em solo para o cultivo de milho e feijão. De acordo com Modesto et al. (2009), ao avaliar o LE obtido na SANEAR, Saneamento de Araçatuba, foi identificado a presença de 0,04 ovos g^{-1} de ST, podendo ser utilizado em quaisquer culturas.

A ausência de helmintos encontradas após 40 dias da aplicação do LE no solo, pode ser decorrente da insolação e pouco volume de chuva que o solo foi

exposto (FERREIRA, 2001), ocasionando redução da umidade inicial do lodo, consequentemente, afetando a atividade dos micro e macro-organismos (Figura 3 e 4). Quando esse tipo de material é aplicado e incorporado ao solo, ele sofre processos de inativação dos patógenos através da dessecação e exposição a raios de ultravioleta, além disso, a alteração do pH, temperatura, competição pela disponibilidade de alimentos são responsáveis pela redução da carga de patógenos do solo (LU et al., 2012).

Com a adoção de práticas preventivas, maior eficiência dos tratamentos dos efluentes e manejo adequado do lodo de esgoto, o reuso na agricultura é uma alternativa economicamente viável e seu uso tende a ser bem-sucedido, favorecendo não só o produtor, mas, principalmente, o ambiente devido à redução dos agentes contaminantes, além minimizar a aplicação de fertilizantes minerais. Porém, a persistência destes micro-organismos, após sucessivas aplicações de LE no solo destinado a agricultura, ainda deve ser melhor estudada para que haja adoção de manejo adequado afim de que o seu uso traga total benefício para o produtor além de reduzir danos ambientais.

5.2.2. Coliformes e *Escherichia coli*

Na análise do lodo de esgoto, o valor de coliformes termotolerantes foi de $2,1 \times 10^4$ NMP g⁻¹ de ST. A resolução CONAMA nº375 de 2006 classifica como lodo Tipo A aquele que apresentar $<10^3$ NMP g⁻¹ de ST e lodo Tipo B $< 10^6$ g⁻¹ de ST, por isso, o lodo do presente trabalho foi considerado lodo Tipo B, podendo ser utilizado em culturas específicas. Os resultados obtidos para coliformes totais, encontram-se na Tabela 10 e variou de $1,1 \times 10^6$ NMP g⁻¹ no dia 0 a ausência a partir de 25 dias de incorporação do lodo no solo. Os valores de coliformes termotolerantes nas amostras de solo variaram de $3,6 \times 10^3$ a $1,1 \times 10^6$ NMP g⁻¹ no LVef e de $3,0 \times 10^3$ a $2,4 \times 10^5$ NMP g⁻¹ no LVd (Tabela 11) com ausência total a partir de 40 dias do dia zero. Aos 58 dias de experimento, realizou-se segunda adubação de cobertura, fornecendo os nutrientes K e P, não influenciando o desenvolvimento desses micro-

organismos.

Tabela 10. Número mais provável (NMP) de coliformes totais em amostras de Latossolo Vermelho eutroférico e Latossolo Vermelho distrófico tratados com lodo de esgoto por 18 anos consecutivos.

Tratamentos Mg ha	Número Mais Provável (NMP)			
	Dias			
	0	25	39	77
Latossolo Vermelho eutroférico				
0	$3,6 \times 10^3$	0	0	0
5	$3,6 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$	0	0
10	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$
20	$4,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$	$9,3 \times 10^4$	$9,1 \times 10^3$
Latossolo Vermelho distrófico				
0	$1,5 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	0	$3,6 \times 10^3$
5	$2,4 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$>1,1 \times 10^6$	$7,3 \times 10^3$
10	$4,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$>1,1 \times 10^6$	$2,3 \times 10^4$
20	$2,4 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	0

Tabela 11. Número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes em amostras de Latossolo Vermelho eutrófico e Latossolo Vermelho distrófico tratados com lodo de esgoto por 17 anos consecutivos no dia seguinte à aplicação do resíduo.

Tratamentos Mg ha	Número Mais Provável			
	Dias			
	0	26	40	78
Latossolo Vermelho eutrófico				
0	3,6x10 ³	0	0	0
5	3,6x10 ³	0	0	0
10	1,1x10 ⁶	0	0	0
20	4,3x10 ⁴	6,2x10 ³	0	0
Latossolo Vermelho distrófico				
0	1,5x10 ⁴	3,0x10 ³	0	0
5	2,4x10 ⁵	7,3x10 ³	0	0
10	4,3x10 ⁴	6,2x10 ³	0	0
20	2,4x10 ⁵	6,1x10 ³	0	0

Mesmo no tratamento sem adição de LE, há coliformes termotolerantes, podendo sugerir que houve contaminação cruzada com seu uso. Ocorreu redução nos valores de termotolerantes em menos de um mês em ambas as áreas, sendo mais acentuada na área de LVef.

Além da disponibilidade de matéria orgânica, que apresentou efeito significativo no LVd, diversos são os fatores que podem ter influenciado na redução da população de coliformes, como a competição e estresse dos organismos autóctones, variação da temperatura, umidade durante o experimento (Figura 3 e 4) e pH do solo, uma vez que esses micro-organismos são sensíveis às condições edáficas (SILVA et al., 2010).

Os coliformes totais e termotolerantes sobrevivem no ambiente por menor tempo que os demais micro-organismos, porém são fáceis de serem isolados e seu cultivo garante a identificação de ambientes com contaminação de origem fecal (RODRIGUES, 2003). A exposição do solo a elevadas temperaturas e a radiação solar, podem reduzir a sobrevivência destes micro-organismos, uma vez que a solarização do solo é considerada um método simples e fácil, utilizado para provocar a morte de patógenos, apresentando resultados positivos para o controle de agentes patogênicos veiculados pelo solo (KATAN; DEVAVY, 1991; SOUZA, 1994; GHINI, 1997) e que pode ter influenciado na redução da carga microbiana do presente estudo, uma vez que após a aplicação, o solo ficou diretamente exposto a radiação solar até o crescimento das plantas de milho, as quais fizeram sombra na parte inferior das mesmas e do solo.

Corroborando com o presente estudo, Mazzotti et al. (2008), em amostras de solo tratado com LE, identificaram variação média na concentração de coliformes termotolerantes de $6,29 \times 10^2$ NMP g^{-1} de ST no primeiro dia de aplicação e de $2,12 \times 10^3$ NMP. g^{-1} de ST no trigésimo dia, porém, em quantidades inferiores ao do presente trabalho. De acordo com estudo feito por Ribas; Neto (2008), não houve existência de coliformes termotolerantes no solo aos 20 e 40 dias após a aplicação de efluente de esgoto.

A presença de coliformes termotolerantes no solo após 54 dias de aplicação de LE tratado, não foi mais identificada segundo estudo realizado Rocha et al. (2003). Por outro lado, Andraus et al. (2001) verificaram a presença de coliformes termotolerantes nas concentrações de $4,04 \times 10^2$ NMP. g^{-1} de ST aos 28 dias, $2,27 \times 10^4$ em 42 dias, $2,64 \times 10^2$ aos 56 dias, $1,32 \times 10^2$ em 70 dias e depois de 80 dias, $5,73 \times 10^3$ NMP. g^{-1} de ST em solo tratado com lodo aeróbico digerido.

Estudos realizados por Qian et al. (1996), Moolenaar et al. (1997), Moreno et al. (1998), mostram que o lodo de esgoto é responsável por favorecer concentrações de elementos traços no solo, podendo colocar em risco a relação solo-planta-animal. De acordo com Yada (2014), a análise do solo do décimo sexto ano, sob sucessivas aplicações de lodo na mesma área experimental, mostrou teores de Cromo (Cr) acima dos valores de referência de qualidade (VRQ), indicando contaminação, mesmo nas áreas de testemunha, onde não foram aplicadas, assim como as doses

de 10 e 20 Mg ha⁻¹ aumentaram os teores de Cobre (Cu), Níquel (Ni), Chumbo (Pb) e Zinco (Zn) na área de LVd e Cu no LVef.

A presença desses elementos no solo possui efeito cumulativo e é um processo praticamente irreversível, estando cada vez mais disponíveis no perfil dos solos e absorvidos pelas raízes das plantas, consumidas pelos animais e homens, os quais também absorverão esses elementos, podendo causar sérios danos à saúde. A presença de elementos traço pode interferir na atividade e crescimento da microbiota, impactando na sua diversidade, além de causar danos à estrutura celular e à conformação do DNA, impossibilitando sua reprodução (ROANE et al., 2000; BRUINS et al., 2000).

Na avaliação de patótipos de *E. coli*, EHEC, EPEC e STEC por meio da PCR, não foi identificada a presença de nenhum dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* na amostra do lodo de esgoto e nas amostras de solo incorporado com o LE, mesmo naquelas que apresentaram presença de coliformes termotolerantes (Figura 9).

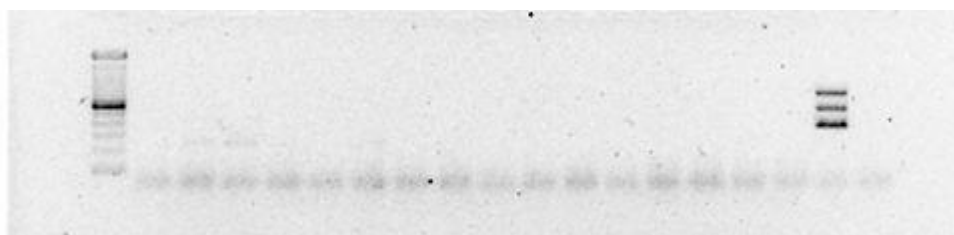


Figura 9. Reação em cadeia da polimerase (PCR) do lodo de esgoto e do solo para diagnóstico da EHEC, EPEC E STEC, através dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*.

As entereobactérias encontram-se espalhadas por toda natureza e podem ser encontradas no solo, água, alimentos e em uma diversidade de ambientes, sendo conhecidas como patógenos humano (COONER et al., 2011). O desenvolvimento das entereobactérias pode ter sido inibido pelo pH do solo, elevadas temperaturas e baixa umidade ao longo do experimento, elevadas concentrações de elementos-traço no solo, competição e estresse, assim como descrito para os coliformes. A relação C:N da matéria orgânica, pode influenciar na sobrevivência da microbiota do solo, pois quanto maior o teor de carbono (C) mais rápido será o consumo da fonte energética, consequentemente, mais rápido ela se esgotará.

Mesmo que o resultado fosse positivo, a presença de micro-organismos no lodo aplicado na agricultura, não é necessariamente indicativo de transmissão de doenças, sendo considerado apenas como risco potencial. O risco real de infecção está ligado a combinação de uma série de fatores, as quais dependem do sistema imunológico do indivíduo, da dose infectante, do grau de patogenicidade, da exposição a focos patogênicos, assim como depende das condições ambientais e da resistência dos micro-organismos ao tratamento de águas residuais. Então, para que um micro-organismos, presente no lodo de esgoto utilizado na agricultura, chegue a causar alguma doença, ele terá que resistir aos processos de tratamento, além disso, terá que sobreviver no ambiente em concentração suficiente para causar infecção em um indivíduo suscetível (TONON, 2007).

Às ETE's compete a adoção de medidas e manejos que minimizem a carga microbiana e melhorem a qualidade dos resíduos e efluentes que voltarão para o ambiente, atendendo os padrões e condições especificados pela Legislação. Aos órgãos de inspeção, cabe a observância no atendimento aos preceitos técnicos impostos, assegurando as condições propostas no momento do seu aproveitamento. Entretanto, a legislação não menciona padrão bacteriológico para coliformes totais e termotolerantes no solo, com aplicação de LE, destinado à agricultura, que avaliaria aspectos sanitários e não de qualidade do solo no geral, por isso, há a necessidade de maiores estudos para avaliar possíveis danos ao homem e ambiente para sustentar a legislação afim de que haja fiscalização e destino adequado desse resíduo sem prejudicar o meio ambiente.

5.3. Atividade enzimática no solo

5.3.1. Atividade da enzima protease no solo

A atividade da enzima protease no solo no qual foi aplicado 18 anos consecutivos de diferentes doses de LE, apresentou diferença significativa apenas no tratamento de 5 Mg ha⁻¹ de LE no LVef (Gráfico 1), os demais tratamentos aos 0,

40, 78 e 146 dias não apresentaram diferença, de acordo com o teste t, em função das doses de LE aplicadas (Gráfico 2).

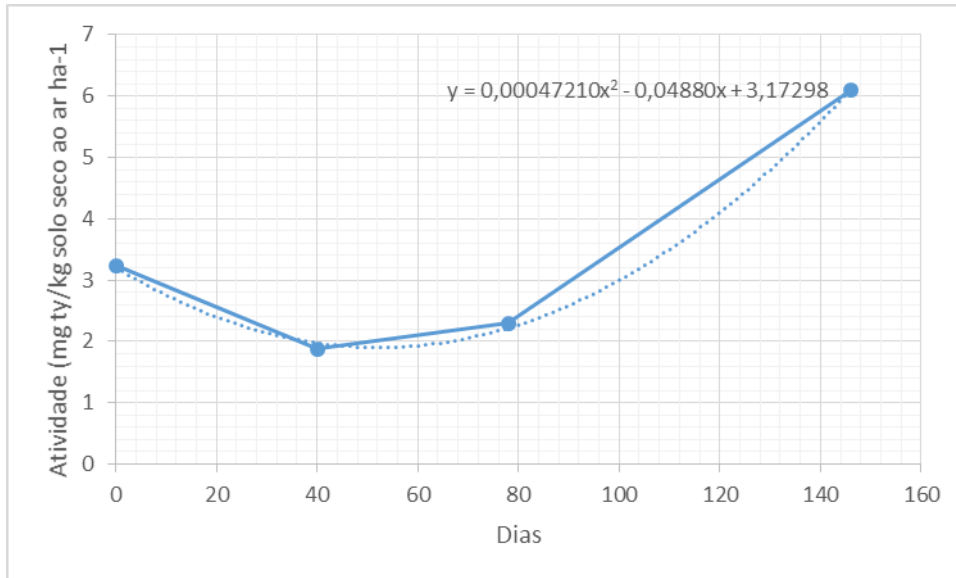


Gráfico 1. Atividade da protease em solo que recebeu a aplicação de 5 Mg ha⁻¹ de lodo de esgoto no Latossolo Vermelho eutroférico.

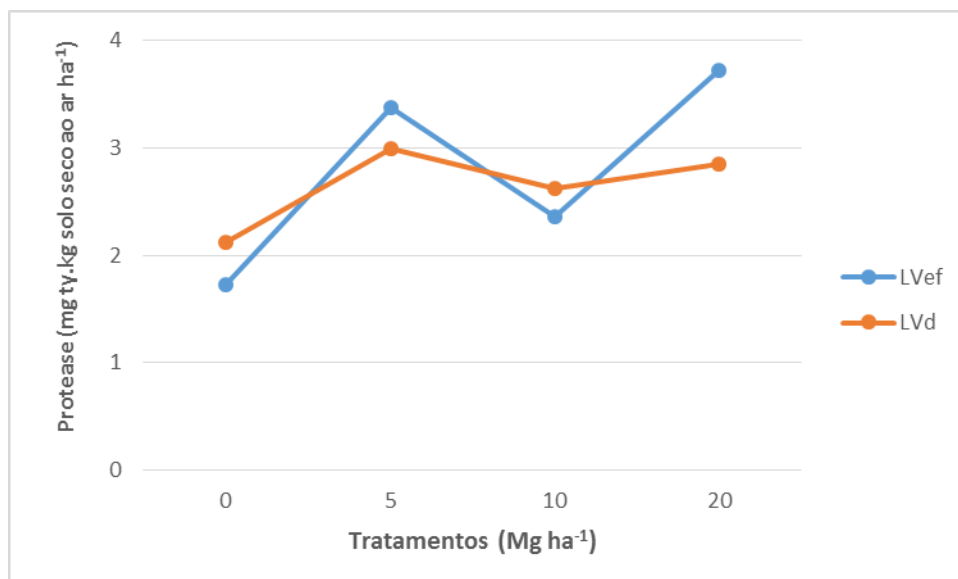


Gráfico 2. Média da atividade da enzima protease no solo na área de Latossolo Vermelho eutroférico e Latossolo Vermelho distrófico.

Em estudo realizado por Crecchio et al. (2004) a atividade da enzima protease no solo, variou de acordo com a dose de resíduos aplicados, mostrando leve aumento com aplicação de 12 Mg ha⁻¹ de LE, reduzindo significativamente com a aplicação de doses mais elevadas de 24 Mg ha⁻¹. A temperatura e o pH também são fatores que interferem na atividade das enzimas. Segundo Merheb (2007), a atividade proteolítica apresentou-se máxima em pH de 5,5 a 60°C, mantendo-se estável em pH de 3,0 a 9,5 a 60°C por até uma hora, estando o pH do solo das duas áreas dentro do intervalo de variação, pH de 4,83 no LVd e 4,59 no LVef.

Ainda de acordo com Merheb (2007), a presença de níquel, bário e magnésio, foram os elementos que menos afetaram a atividade da protease, por isso a atividade proteolítica não foi inibida nos tratamentos que receberam doses de lodo de esgoto.

A termoestabilidade da protease varia de acordo com a sua origem, se bacteriana ou fúngica, uma vez que se trata de uma enzima extracelular, por isso sua atividade não foi inibida, sugerindo constante mineralização do nitrogênio no solo que poderá ser aproveitado pelas plantas evitando perdas para o ambiente.

5.3.2. Atividade da redutase do nitrato no solo

A atividade da enzima redutase do nitrato no solo não apresentou efeito significativo, de acordo com o teste t, em nenhum dos tratamentos no decorrer do tempo (Gráfico 3).

A redutase do nitrato (NR) é uma enzima cuja atividade é estimulada pela presença de nitrato, ou seja, quanto menor a quantidade de N-nítrico, menor será a atividade da NR, além disso, seu desempenho também depende do pH, da temperatura e do ritmo diurno de atividade (BERGES, 1997; LEE; TITUS, 1992). Sua atividade é importante pois está relacionada ao aproveitamento do nitrogênio inorgânico pelas plantas favorecendo maior produtividade.

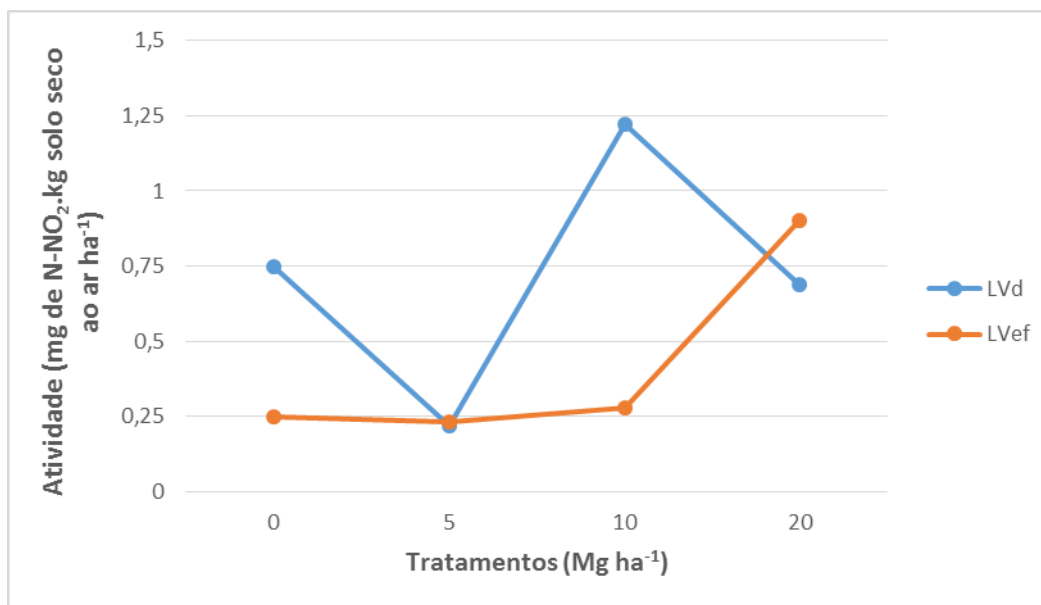


Gráfico 3. Média da atividade da enzima redutase do nitrato no solo na área de Latossolo Vermelho eutroférico e Latossolo Vermelho distrófico.

A redução da atividade da NR ao longo do experimento pode estar associada ao baixo volume de chuvas e baixo pH do solo. Rhein et al. (2011), aos 60 dias de experimento, constataram intensa redução da NR em solo sob deficiência hídrica e baixo pH, assim como também foi constatado por Naik et al. (2002) menor atividade da redutase do nitrato em solo cultivado com cana de açúcar sob deficiência hídrica e acidez moderada do solo.

A atividade da NR é muito sensível aos fatores ambientais e também depende da disponibilidade de uma fonte nitrogenada, sendo melhor aquelas consideradas de liberação lenta. A redução ou inibição da atividade da enzima NR deve-se ao baixo teor de água no solo, limitando a disponibilidade de NO_3^- em solução e consequentemente, limitando a mineralização (KOZOVITS, 1997), podendo ter levado a inibição da atividade enzimática, a partir dos 78 dias, em ambas as áreas do presente estudo.

Martins et al. (2009) observaram maior atividade da NR com a presença de fosfato no meio, essencial para a formação da ATP que fornecerá energia para a absorção do nitrato que é um processo ativo (ARAÚJO; MACHADO, 2006). O lodo de esgoto aplicado é excelente fonte de N e P, por isso, beneficiou o

desenvolvimento inicial da redutase do nitrato, levando ao esgotamento da fonte de energia prontamente assimilável reduzindo a atividade dessa enzima no solo. Além disso, a NR é mais ativa quando jovem e em tecido de crescimento, sendo maior a demanda de nitrato (LARCHER, 2006).

Elevadas concentrações de cobre no solo reduzem a ação dessa enzima e consequentemente a produção de clorofila e crescimento das plantas (LUNA et al., 1997). A presença de elemento traço no solo pode inibir a atividade enzimática por meio da substituição de uma metal proteína essencial para o desenvolvimento enzimático, por um metal tóxico, substituindo o metal deficiente (OMAR, 2002).

O Ni, apesar de ser elemento essencial para algumas plantas, é capaz de inibir enzimas ligadas ao ciclo do nitrogênio, assim como pode interferir na absorção, no transporte do nitrato (NO_3^-) e na atividade da redutase do nitrato (BOUSSAMA et al., 1999; PALACIOS; MATAIX, 1999) e por ter apresentado maiores valores nas doses de 10 e 20 t ha⁻¹ (YADA, 2014), pode ter favorecido ao decréscimo da atividade a partir dos 26 dias, chegando a inibição NR.

5.3.3. Atividade da enzima urease no solo

A atividade da enzima urease no solo, ao longo dos dias e entre diferentes tratamentos, também não apresentou diferença pelo teste t (Gráfico 4), mostrando-se ativa, até os 146 dias, em ambas as áreas e em todos os tratamentos.

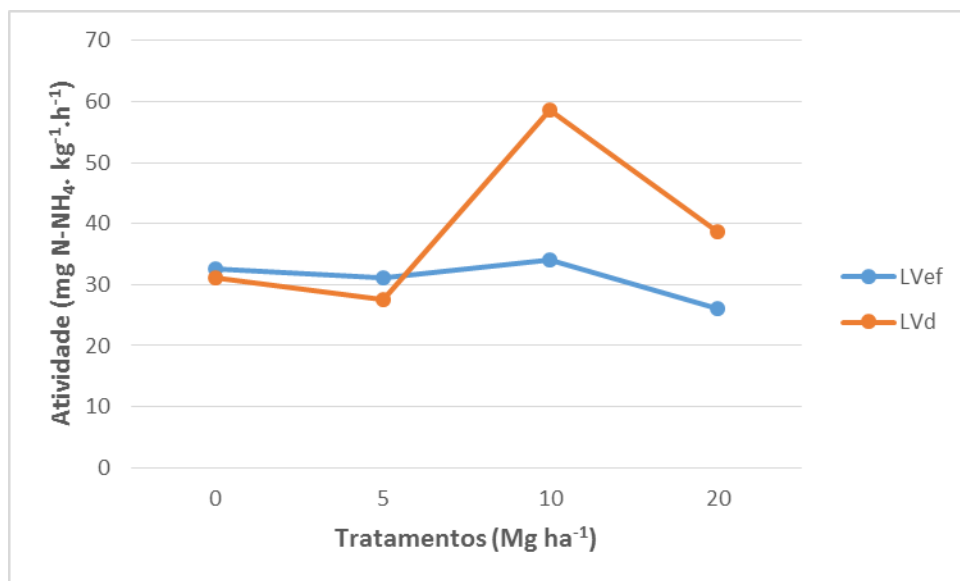


Gráfico 4. Média da atividade da enzima urease no solo na área de Latossolo Vermelho eutroférico e Latossolo Vermelho distrófico.

A velocidade com que ocorre essa reação depende da quantidade de ureia que foi aplicado no solo, do tipo de vegetação e da disponibilidade e facilidade de decomposição da matéria orgânica como fonte de energia para micro-organismos do solo. Sua atividade no solo estima o quanto de N orgânico pode ser convertido em inorgânico, iniciando o processo de mineralização (DICK et al., 1996; SANTOS; CAMARGO, 1999; VICTORIA et al., 1992) e sua atividade é maior quando maior for o teor de matéria orgânica presente no solo (ROLDÁN et al., 2003).

De acordo com Trannin et al. (2007), ao avaliar o efeito da atividade da urease em solo sob aplicação de LE e adubo mineral em cultura de milho, não foi identificado efeito significativo entre os tratamentos e apenas apresentou maiores resultados que o controle, sem adubação, na maior dose de LE aplicado.

Resultados opostos foram obtidos por Garcia-Gil et al (2000), que identificaram queda da atividade da urease de 20 e 28% com a aplicação de lodo de esgoto compostado na dose de 20 e 80 t ha⁻¹, respectivamente, fato que pode ser explicado pela presença de elementos traço que inibem a atividade desta enzima.

Fatores como o pH e a umidade do solo também podem interferir na atividade da urease, que se mostrou menor quando em período de seca durante o experimento. Quanto maior o teor de água no solo, mais rápida será a hidrólise e

maior será a perda de amônia por volatilização ou lixiviação. A volatilização de amônia, também é afetada pela temperatura, pelo poder tampão do solo, pela capacidade de troca catiônica (CTC), pelo teor de argila do solo, entre outros. (HARGROVE, 1988; BYRNES, 2000).

6. CONCLUSÃO

Concluiu-se que a aplicação do lodo de esgoto por 18 anos consecutivos em área de Latossolo Vermelho eutrófico e área de Latossolo Vermelho distrófico:

- Influenciou nos atributos químicos: pH, matéria orgânica, fósforo, potássio, magnésio, acidez potencial e capacidade de troca catiônica do solo.
- Não apresentou risco potencial de contaminação do solo por ovos viáveis de helmintos, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*.
- Não influenciou nas atividades das enzimas protease, redutase do nitrato e urease do solo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não há, para o lodo de esgoto, tratamento mundialmente aceito como ideal, o que dificulta o embasamento das normas vigentes e estímulo de seu uso como adubo orgânico, devido ao preconceito da origem da sua origem.

Também, não há padrões estabelecidos para a presença de ovos viáveis de helmintos e coliformes termotolerantes no solo destinado a agricultura, mostrando a necessidade de maiores estudos para avaliar os possíveis danos ao homem, animais e ambiente com o uso contínuo do lodo de esgoto, para que então, a legislação possa ser sustentada afim de que haja correta fiscalização e manejo adequado desse resíduo, sem prejudicar o ambiente.

8. REFERÊNCIAS

ABDELMAGID, H. M.; TABATABAI, M. A. Nitrate reductase activity of soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 4, p. 421-442, 1987.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR 10004. **Resíduos Sólidos - Classificação**, 2004.

AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A.; ONUMA, D. L.; SILVEIRA, W. D.; PESTANA de CASTRO, A. F. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from claves in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 297-306, 2007.

ALMEIDA, G. C.; FANHANI, J. C.; D'OLIVEIRA, P. S.; DIAS FILHO, B. P. Eficiência dos processos químicos e térmicos na higienização de lodo de esgoto. **Iniciação Científica Cesumar**, v. 8, n. 1, p. 95-99, 2007.

ALVES, J. A. R.; FILHO, E. S. Parasitoses intestinais na infância. **Revista Pediatria Moderna**, São Paulo, v.41, n. 1, p. 7-15, 2005.

ALVES, J. M.; OLIVEIRA, L. R.; GONTIJO, E. L.; CAMPOS, V. T.; BRITO, L. F.; MELO, V. P.; MELO, W. J.; MELO, G. M. P. Bioatividades das proteases e arisulfatases em solos tratados com biossólidos e cultivados com girassol. **Revista Ceciliana**, Santos, SP, 2010. Disponível em: http://sites.unisanta.br/revistaceciliana/edicao_03/1-2010-27-29.pdf. Acesso em: 07 de mar de 2016.

ANDRADE-NETO, C. O. **Sistemas Simples para Tratamento de Esgotos Sanitários – Experiência Brasileira**. Rio de Janeiro, ABES, 1997. p.301

ANDRAUS, S.; MEDEIROS, M. L. B. de; BORGES, J. C.; SILVA, S. M. C. P. da; TOLEDO, E. B. S. **Agentes patogênicos: bactérias entéricas**: In: ANDREOLI, C. V.; LARA, I. A.; FERNANDES, F., 2ªed. Reciclagem de biossólido: transformando problemas em soluções. Curitiba, Sanepar Finep, 2001. p. 126-155.

ANDREOLA, F.; FERNANDES, S. A. P. A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo das culturas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 21-39, 2007.

ANDREOLI, C. V.; FERREIRA, A. C.; FRANÇA, M.; TAMANINI, C. Uso do biogás na secagem e higienização de lodo de esgoto em leito de secagem. In: I SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE BIOSSÓLIDOS. **Anais do I Simpósio Latino Americano sobre BioSSólidos**. São Paulo, 2003.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 2001. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: APHA. 676 p.

ARAUJO FILHO, H. B; CARMO-RODRIGUES, M. S.; MELLO, C. S.; MELLI, L. C. F. L.; TAHAN, S., MORAIS, M. B. Parasitoses intestinais se associam a menores índices de peso e estatura em escolares de baixo estrato socioeconômico. **Revista Paulista de Pediatria**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 521-528, 2011.

ARAÚJO, A. P.; MACHADO, C. T. T. Fósforo. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 59-78, 2006.

AYRES R., MARA, D. Analysis of wastewater for use in agriculture. A laboratory manual of parasitological and bacteriological techniques. Geneva: WHO, 1996. 31p.
BLACK, M. I. Survival rates of parasite eggs in sludge during aerobic and anaerobic digestion. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 44, p.1138-1143, 1982.

BAILENGER, J. Mechanisms of parasitological concentration in coprology and their practical consequences. **Journal of American Medical Technology**, n. 41, p. 65-71, 1979.

BARBOSA, G. M. C.; TAVARES FILHO, J.; BRITO, O. R.; FONSECA, I. C. B. Efeito residual do lodo de esgoto na produtividade do milho safrinha. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 3, p. 601-605, 2007.

BARBOSA, G. M. C.; TAVARES FILHO, J.; FONSECA, I. C. B. Propriedades químicas de um Latossolo Vermelho eutroférico após aplicação por dois anos consecutivos de lodo de esgoto. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 24, p. 1501-1505, 2008.

BERGES, J. A. Algal nitrate reductases. **European Journal of Phycology**, London, v. 32, p. 3-8, 1997.

BIONDO, M. C.; SILVA, R. J. Verificação da presença de helmintos no lodo de esgoto compostado. Botucatu, SP, 2014. Disponível em http://prope.unesp.br/cic_isbn/busca.php Acesso em: 12 nov. 2015.

BONINI, C. S. B.; ALVES, M. C.; MONTANARI, R. Sewage sludge and mineral fertilization on recovery of chemical properties of a degraded soil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 19, n. 4, p. 388-393. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662015000400388&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 09 mar. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v19n4p388-393>.

BONO, J. A. M.; CONTREIRAS, D. P. A.; MAUAD, R. M.; ALBUQUERQUE, J. C.; YAMAMOTO, C. R.; CHERMOUTH, K. S; FREITAS, M. E. Modo de aplicação de fertilizantes nitrogenados na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Agrarian**, v. 1, n. 2, p. 91-102, 2008.

BOOM, R. Solo saudável, pasto saudável, rebanho saudável: a abordagem equilibrada. In: CONFERÊNCIA VIRTUAL GLOBAL SOBRE PRODUÇÃO ORGÂNICA DE BOVINOS DE CORTE, 1 ed, 2002, Concórdia. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/agencia/congressovirtual/pdf/portugues/03pt03.pdf>. Acesso em 07 de mar de 2016.

BORGES, W. F.; MARCIANO, F. M.; OLIVEIRA, H. B. Parasitos intestinais: elevada prevalência de *Giardia lamblia* em pacientes atendidos pelo serviço público de saúde na região sudeste de Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 2, p. 149 – 157, 2011.

BOUSSAMA, N.; OUARITI, O.; GHORBAL, M. H. Changes in growth and nitrogen assimilation in barley seedlings under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 22, p. 731-752, 1999.

BLACK, J. G. **Microbiologia – fundamentos e perspectivas**. 4 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, p.829, 1999.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, p. 198-207, 2000.

BUENO, J. R. P.; BERTON, R. S.; SILVEIRA, A. P. D.; CHIBA, M. K.; ANDRADE, C. A.; MARIA, I. C. Chemical and microbiological attributes of an oxisol treated with successive applications of sewage sludge. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1461-1470, 2011.

BURNS, R. G.; NANNIPIERI, P.; BENEDETTI, A.; HOPKINS, D. W. Defining Soil Quality. In: BLOEM, J.; HOPKINS, D. W.; BENEDETTI, A. (Eds.) Microbiological methods for assessing soil quality. **CABi Pub., Oxfordshire**, p. 15-22, 2006.

BYRNES, B. H. Liquid fertilizers and nitrogen solutions. In: International fertilizer development center. **Fertilizer manual**. Alabama: Kluwer Academic, p. 20- 44, 2000.

CAMARGO, F. A. O.; GIANELLO, C.; TEDESCO, M. J.; VIDOR, C. Nitrogênio orgânico do solo. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Ed.). Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre: Gênese, 1999, p. 117-137.

CARDOSO, F. M.; MORCILLO, A. M.; ZEFERINO, A. M. B.; MONTEIRO, M. A. R. G. Enteroparasitoses em usuários da rede municipal de saúde de Campinas, São Paulo. **Revista de Ciências Médicas**, v. 14, n. 4, 2012.

CARNEIRO, M. C.; ASSIS, P. C. R.; MELO, L. B. C.; PEREIRA, H. S.; PAULINO, H. B.; SILVEIRA NETO, A. N. Atributos bioquímicos em dois solos de cerrado sob diferentes sistemas de manejo e uso. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 38, p. 276- 283, 2008.

CASSINI, S. T. Digestão de resíduos orgânicos e aproveitamento do biogás. **Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro: Ed. ABES (Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental), p. 210, 2003.

CERRI, C. C.; CERRI, C. E. P. Agricultura e aquecimento global. **Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, n. 23, p. 40-44, 2007.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas**. São Paulo, 2001.

CHIBA, M. K.; MATTIAZZO, M. E.; OLIVEIRA, F. C. Cultivo de cana-de-açúcar em Argissolo tratado com lodo de esgoto. II. fertilidade do solo e nutrição da planta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 2, p. 653-662, 2008.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J. C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, p. 71-87, 2012.

CONAMA. Regulamentação do uso agrícola de lodo de esgoto. **RESOLUÇÃO nº 375, de 29 de agosto de 2006**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2014.

COONER, S.; IVERSEN, C.; HEALY, B.; O'BRIEN, S.; FANNING, S. Enterobacter spp. **Encyclopedia of Dairy Sci.** 2. ed. Boston: Elsevier; 2011.

COURA, L. C.; CONCEIÇÃO, M. J.; LANFREDI, R. Geo-helminthíases – Enterobíase. In: **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda., 2005, v.1, cap. 86, p. 1027-1056.

CRECCHIO, C.; CURCI, M.; PIZZIGALLO, M. D. R.; RICCIUTI, P.; RUGGIERO, P. Effects of municipal solid waste compost amendments on soil enzyme activities and bacterial genetic diversity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 10, p.1595-1605, 2004.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B., B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 26-38, 2010.

COSTA, K. A. P.; FAQUIN, V.; OLIVEIRA, I. P.; RODRIGUES, C.; SEVERIANO, E. C. Doses e fontes de nitrogênio em pastagem de capim-marandu. I - Alterações nas características químicas do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 4, p. 1591-1599, 2008.

COSTA, V. L.; MARIA, I. C.; CAMARGO, O. A.; GREGO, C. R.; MELO, L. C. A. Distribuição espacial de fósforo em Latossolo tratado com lodo de esgoto e adubação mineral. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, p. 287-293, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662014000300007&lng=pt&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 09 de mar. de 2016.

CRECCHIO, C.; CURCI, M.; PIZZIGALLO, M. D. R.; RICCIUTI, P.; RUGGIERO, P. Effects of municipal solid waste compost amendments on soil enzyme activities and bacterial genetic diversity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 1595-1605, 2004.

DICK, R. P.; BREAKWELL, D. P.; TURCO, R. F. Soil enzyme activities and biodiversity as integrative microbiological indicators. In: DORAN, J. W.; JONES, A. J. Methods for assessing soil quality. Madison, **Soil Science Society of America**, p. 247-272, 1996.

DORES-SILVA; P. R., LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Acompanhamento químico da vermicompostagem de lodo de esgoto doméstico. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 956-961, 2011.

DYNIA, J. F.; SOUZA, M. D.; BOEIRA, R. C. Lixiviação de nitrato em Latossolo cultivado com milho após aplicações sucessivas de lodo de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 855-862, 2006.

EMBRAPA, **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Serviço de Produção de Informação, Brasília: Embrapa, 2006. 306 p.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Control of Pathogens and vector attraction in sewage sludge under 40CFR part 503**. Washington: Office of Water/ Office of Science and Technology Sludge/ Risk Assessment Branch, 1992.

ERNANI, P. R. **Disponibilidade de nitrogênio e adubação nitrogenada para a macieira**. Lages, 2003, 76 p.

FERREIRA, A. C. **Monitoramento da Secagem e Desinfecção de Lodo Anaeróbio em Leito de Secagem com Uso de Estufa Plástica e Biogás**. 2001. 97f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

FERREIRA, G. R.; ANDRADE, C. F. S. Alguns aspectos socioeconômicos relacionados a parasitoses e avaliação de uma intervenção educativa em escolares de Estiva Gerbi, São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba – MG, v. 38, n. 5, p. 402-405, 2005.

FIA, R.; MATOS, A. T.; AGUIRRE, C. I. Características químicas de solo adubado com doses crescentes de lodo de esgoto caleado. **Engenharia na Agricultura**, v. 13, n. 4, p. 287-299, 2005.

FRANCHINI, J. C.; GONZALEZ-VILA, F. J.; CABRERA, F.; MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A. Rapid transformations of plant water-soluble organic compounds in relation to cation mobilization in an acid Oxisol. **Plant and Soil**, v. 231, n. 1, p. 55-63, 2001.

FRANZOLIN, M. R.; ALVES, R. C.; KELLER, R.; GOMES, T. A.; BEUTIN, L.; BARRETO, M. L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L. R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 359-363, 2005.

GARCIA, G.; CARDOSO, A. A.; SANTOS, O. A. M. Da escassez ao estresse do planeta: um século de mudanças no ciclo do nitrogênio. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1468-1476, 2013.

GARCÍA-GIL, J. C.; PLAZA, C.; SOLER-ROVIRA, P.; POLO, A. Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 13, p. 1907-1913, 2000.

GERMANI, Y.; LE BOUGUÉNEC, C. Diagnostic des *E. coli* agents de diarrhée chez l'homme. **Revue Francophone des Laboratoires**, Paris, v. 2008, n. 400, p. 67-76, 2008.

GHINI, R. Desinfestação do solo com uso de energia solar: solarização e coletor solar. Jaguariúna, SP. EMBRAPA-CNPDA, 1997.

GILMORE, M. S.; FERRETTI, J. J. The thin line between gut commensal and pathogen. **Science**, v. 299, n. 5615, p. 1999-2002, 2003.

GIRÃO, D. M.; GIRÃO, V. B. C.; IRINO, K.; GOMES, T. A. T. Classifying *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1297-1298, 2006.

GONÇALVES, M. L.; ARAÚJO, A.; FERREIRA, L. F. Human intestinal parasites in the past: new finds and a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro – RJ, v. 98, n. 1, p. 103-118, 2003.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A. New technique for counting nematodes eggs in sheep faeces. **Journal of the Council of Scientific and Industrial Research**, v. 12, n. 1, p. 50-52, 1939.

GUEDES, M. C.; ANDRADE, C. A.; POGGIANI, F.; MATTIAZZO, M. E. Propriedades químicas do solo e nutrição do eucalipto em função da aplicação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 2, p. 267-280, 2006.

HARGROVE, W. I. Soil environmental and management factors influencing ammonia volatilization under field conditions. In: BOCK, B. R.; KISSEL, D. E. (Ed). **Ammonia volatilization from urea fertilizers**. Alabama; NFDC, TVA, 1988. cap. 2 p.17-36.

HOFFMANN C, ANGER M, KÜHBAUCH W. N₂O Freisetzung auf gemähtem Dauergrünland in Abhängigkeit von Standort und N-Düngung. **Journal of Agronomy**. Crop Science, 2001.

HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. Sedimentation concentration method in schistosomiasis. **Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v. 6, p. 283-298, 1934.

INGERSON-MAHAD, M.; REID, A. *E.coli*: Good, bad, & deadly. **American Academy of Microbiology**, p. 1-13, 2011.

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. Climate change 2001: the scientific basis. United Kingdom: Cambridge University, 2001. 881 p.

ISCHIA, M.; PERAZZOLLI, C.; DAL MASCHIO, R.; CAMPOSTRINI, R. Pyrolysis study of sewage sludge by TG-MS and TG-GC-MS coupled analyses. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 2, p. 567-574, 2007.

ISLAM, M.; MORGAN, J.; DOYLE, M. P.; PHATAK, S. C.; MILLNER, P.; JIANG, X. Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts for irrigation water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 4, p. 2497-2502, 2004.

JIMÉNEZ, B. Helminth ova control in sludge: a review. **Water Science and Technology**, v. 56, n. 9, p. 147-155, 2007.

KANDELER, E.; PALLI, S.; STEMMER, M.; GERZABEK, M. H. Tillage changes, microbial biomass and enzyme activities in particle-size fractions of a Haplic Chernozem. **Soil Biology Biochemistry**, v. 31, n. 9, p. 1253-1264, 1999.

KARMALI, M. A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiological Reviews**, v. 2, n. 1, p. 5-38, 1989.

KATAN, J.; DEVAVY, J. E. Soil solarization historical perspectives, principles and uses. In: KATAN, J.; DEVAVY, J. E. (Eds.). **Soil solarization**. Boca Raton. CRC Press. 1991, p. 103-129.

KELESSIDIS, A.; STASINAKIS, A. S. Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. **Waste Management**, v. 32, n. 6, p. 1186-1195, 2012.

KITAMURA, A. E.; ALVES, M. C.; SUZUKI, L. G. A. S.; PAZ GONZALEZ, A. Recuperação de um solo degradado com a aplicação de adubos verdes e lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, p. 405-416, 2008.

KLOTZ, M. G.; STEIN, L. Y. Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 2, p. 146-56, 2008.

KONÉ, D.; COFIE, O.; ZURBRÜGG, Z.; GALLIZI, K.; MOSER, D.; DRESCHER, S.; STRAUSS, M. Helminth eggs inactivation efficiency by faecal sludge dewatering and co-composting in tropical climates. **Water Research**, v. 41, p. 4397-4402, 2007.

KOZOVITS, A. R. **Assimilação de nitrogênio em espécies lenhosas do cerrado**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Ecologia – Universidade de Brasília. 47 p., 1997.

LADO, J. N.; BUTLER, J. H. A. Short term assays of soil proteolytic enzyme activities using protein and dipeptides derivatives as substrates. **Soil Biology Biochemistry**, v. 4, n. 1, p. 19-30, 1972.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos, RiMa, p. 531, 2006.

LASCALA J.; BOLONHEZI, D.; PEREIRA, G. T. Short-term soil CO₂ emission after conventional and reduced tillage of a no till sugar cane area in Southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 91, n. 1, p. 244-248, 2006.

LEE, H. J.; TITUS, J. S. Factors affecting the in vivo nitrate reductase assay for MM. 106 apple trees. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 23, n. 9-10, p. 981-991, 1992.

LEITE, L. F. C.; OLIVEIRA, F. C.; ARAUJO, A. S. F.; GALVÃO, S. R. S.; LEMOS, J. O.; SILVA, E. F. L. Soil organic carbon and biological indicators in an Acrisol under tillage systems and organic management in north-eastern Brazil. **Australian Journal of Soil Research**, v. 48, n. 3, p. 258-265, 2010.

LOPES, A. S. **Manual de fertilidade do solo**. São Paulo, ANDA/POTAFOS, p.155, 1989.

LOPES, L. G.; AMARAL, L. A. Qualidade Microbiológica e Nitrato em Águas Minerais e de Poços de Jaboticabal-SP. **Nucleus**, v. 5, n. 1, 2008.

LU, Q.; HE, Z. L.; STOFFELLA, J. Land application of biosolids in the USA: A review. **Applied and Environmental Soil Science**, 2012.

LUNA, C. M.; CASANO, I. M.; TRIPPI, V. S. Nitrate reductase is inhibited in leaves of *Tricum aestivum* treated with high levels of copper. **Physiology Plant**, v. 101, n. 1, p. 103-108, 1997.

MACEDO, H. S. Prevalência de parasitos e comensais intestinais em crianças de escolas de rede pública municipal de Paracatu, Minas Gerias. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 4, p. 209-213, 2005.

MALLIOU, O.; KATSIOTI, M.; GEORGIADIS, A.; KATSIRI, A. Properties of stabilized/solidified admixtures of cement and sewage sludge. **Cement and Concrete Composites**, v. 29, n. 1, p. 55-61, 2007.

MALTA, T. S. **Aplicação de lodos de estações de tratamento de esgotos na agricultura: Estudo do caso do Município de Rio das Ostras- RJ**. 2001. 67f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2001.

MARIA, I. C.; KOCSSI, M. A.; DECHEN, S. C. F. Agregação do solo em área que recebeu lodo de esgoto. *Bragantina*, v. 66, n. 2, p. 291-298, 2007.

MARQUES, M. O.; BELLINGIERI, P. A.; MARQUES, T. A.; NOGUEIRA, T. A. R. Qualidade e produtividade da cana-de-açúcar cultivada em solo com doses crescentes de lodo de esgoto. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 2, 2007.

MARTINS A. P.; CHOW, F.; YOKOYA, N. Ensaio in vitro da enzima nitrato redutase e efeito da disponibilidade de nitrato e fosfato em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 635-645, 2009.

MARTINS, S. C. S.; LIMA, J. R.; ALMADA, J. S.; PEREIRA, A. I. B. "Screening" de linhagens de *Escherichia coli* multirresistentes a antibióticos, em alimentos de origem animal no estado do Ceará, Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104/105, p. 71-76, 2003.

MAY, P. B.; DOUGLAS, L. A. Assay for soil urease activity. **Plant and Soil**, v. 45, n. 1, p. 301-305, 1976.

MAZZOTTI, H. A.; SILVA, J. E.; LEMAINSKI, J.; SOUZA, C. A. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/publicacoes/search_pbl/1?q=LEMAINSKI,%20J>. Acesso em 14 de nov. de 2014.

MELO, W. J.; AGUIAR, P. S.; MELO, G. M. P.; MELO, V. P. Nickel in a tropical soil treated with sewage sludge and cropped with maize in a long-term field study. **Soil Biology Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1341-1347, 2007.

MELO, V. P.; BEUTLER, A. N.; SOUZA, Z. M.; CENTURION, J. F.; MELO, W. J. Atributos físicos de Latossolos adubados durante cinco anos com biossólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 67-72, 2004.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O.; FERREIRA, M. E.; MELO, G. M. P.; MELO, V. P. Chemical properties and enzyme activity in a sewage sludge-treated soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, n. 33, v. 9-10, p. 1643-1659, 2002.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O.; MELO, V. P. O uso agrícola do biossólido e as propriedades do solo. In: TSUTIYA, M. T. et al. (Eds.). **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: Sabesp, 2001.

MENDES, I. C.; VIVALDI, L. Dinâmica da biomassa e atividade microbiana em uma área sob mata de galeria na região do DF. In: RIBEIRO, J. F.; FONSECA, C. E. L.; SOUZA- SILVA, J. C. (Ed.). **Cerrado: caracterização e recuperação de Matas de Galeria**. Planaltina: Embrapa- CPAC, 2001, p. 664-687.

MERHEB, C. W. **Produção, purificação, caracterização bioquímica e determinação do padrão de ação de protease do fungo Termofílico *Thermoascus aurantiacus***. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. São Paulo, São José do Rio Preto. 2007.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO – MCTI. Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil. Brasília, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria MS nº 518/2004. **Série E. Legislação de Saúde**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil, 2004.

MODESTO, P. T.; SCABORA, M. H.; COLODRO, G.; MALTONI, K. L.; CASSIOLATO, A. M. R. Alterações em algumas propriedades de um Latossolo degradado com uso de lodo de esgoto e resíduos orgânicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, p. 1489-1498, 2009.

MONDINI, C.; CAYUELA, M. L.; SANCHEZ-MONEDERO, M. A.; ROIG, A.; BROOKES, P. C. Soil microbial biomass activation by trace amounts of readily available substrate. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, n. 6, p. 542-549, 2006.

MOOLENAAR, S. W.; SJOERD, E. A. T. M.; ZEE, V. D.; LEXMOND, T. M. Indicators of the sustainability of heavy-metal management in agro-ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 201, n. 2, p. 155-69, 1997.

MORAES, R. G.; COSTA-LEITE, I.; GOULART, E. G. Modalidades de Parasitismo. In: **Parasitologia & Micologia humana**, 4ªed., Cultura Médica, São Paulo, p. 9-16, 2000.

MORENO, J. L.; GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ, T. Changes in organic matter and enzymatic activity of na agricultural soil amended with metal-contaminated sewage sludge compost. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 29, n. 15-16, p. 2247-2262, 1998.

NAIK, R. M.; KADAM, B. S.; PANDHARE, R. A.; PAWAR, S. M.; PATIL, R. C.; BHOI, P. G. Inheritance of proline accumulation and in vivo nitrate reductase activity in sugarcane leaves under water stress. **Indian Sugar**, New Delhi, v. 52, n. 6, p. 427-429, 2002.

NASCIMENTO, C. D.; BARROS, D. A. S.; MELO, E. D.; OLIVEIRA, A. D. Alterações químicas em solos e crescimento de milho e feijoeiro após aplicação de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 2, p. 385-392, 2004.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NOGUEIRA, T. A. R.; SAMPAIO, R. A.; FERREIRA, C. S.; FONSECA, I. M. Produtividade de milho e de feijão consorciados adubados com diferentes formas de lodo de esgoto. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 1, p. 122-131, 2006.

NOGUEIRA, T. A. R.; SAMPAIO, R. A.; FERREIRA, C. S.; FONSECA, I. M.; FERREIRA, C. S.; SANTOS, S. E.; FERREIRA, L. C.; GOMES, E.; FERNANES, L. A. Metais pesados e patógenos em milho e feijão caupi consorciados, adubados com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, p. 331-338, 2007.

OLIVEIRA, A. L. M.; COSTA, K. R.; FERREIRA, D. C.; MILANI, K. M. L.; SANTOS, O. J. A. P.; SILVA, M. B.; ZULUAGA, M. Y. A. Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 56-77, 2014.

OLIVEIRA, F. C.; MATTIAZZO, M. E.; MARCIANO, C. R.; ROSSETO, R. Efeitos de aplicações sucessivas de lodo de esgoto em um Latossolo Amarelo distrófico cultivado com cana-de-açúcar: carbono orgânico, condutividade elétrica, pH e CTC. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 2, p. 505-519, 2002.

OMAR, H. H.; Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 50, n. 2, p. 95-100, 2002.

PALACIOS, G.; MATAIX, J. The influence of organic amendment and nickel pollution on tomato fruit yield and quality. **Journal of Environmental Science and Health part b- pesticides food contaminants and Agricultural Wastes**, v. 34, n. 1, p. 133-150, 1999.

PAVINATO, P. S.; CERETTA, C. A.; GIROTTI, E.; MOREIRA, I. S. L. Nitrogênio e potássio em milho irrigado: análise técnica e econômica da fertilização. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.358-364, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n2/a10v38n2.pdf> . Acesso em 25 de nov. de 2015.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. Ascaridíase. In: **Parasitologia Médica**, 3ªed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1973.

PINTO, A. C. A. **Emprego de lagoas seriadas após reatores RAC-UASB para tratamento de águas residuárias de suinocultura**. 2012. 125f. Tese (Doutorado em Epidemiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Escola Veterinária, Belo Horizonte, 2012.

POGGIANI, F.; GUEDES, M. C.; BENEDETTI, V. Aplicabilidade de biossólido em plantações florestais: I. reflexo no ciclo dos nutrientes. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. (Ed.). **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 163-178, 2000.

PURCINO, A. A. C.; MAGNAVACA, R.; MACHADO, A. T.; MARRIEL, I. E. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 41-46, 1994.

QIAN, J.; SHAN, X. Q.; WANG, Z. J.; TU, Q. Distribution and plant availability of heavy metals in different particle-size fractions of soil. **Science of the Total Environment**, v. 187, n. 2, p. 131-41, 1996.

RAIJ, B. V.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. 285 p.

RAIJ, B. V.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2 ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 1997. 285 p. (Boletim Técnico 100).

RHEIN, A. F. L.; SANTOS, D. M. M. Atividade da enzima redutase do nitrato e teores de prolina livre em raízes de cana-de-açúcar sob os estresses hídrico e ácido no solo. **Semina-ciências Agrárias**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina (UEL), v. 32, n. 4, p. 1345-1359, 2011.

RIBAS, T. B. C.; NETO, P. F. Disponível em: http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/artigos_teses/Biologia/Artigos/disposicao.pdf> . Acesso em 26 mai. 2015.

RICCI, A. B.; PADOVANI, V. C. R.; JÚNIOR, P. Uso de lodo de esgoto estabilizado em um solo decapitado: II-Atributos químicos e revegetação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 2, p. 543-551, 2010.

RIVERO, C.; CHIRENJE, T.; MA, L. Q.; MARTINEZ, G. Influence of compost on soil organic matter quality under tropical conditions. **Geoderma**, Amsterdam, v. 123, n. 3/4, p. 355-361, 2004.

ROANE, T. M.; PEPPER, I. L. Microbial responses to environmentally toxic cadmium. **Microbial Ecology**, v. 38, n. 4, p. 358-364, 2000.

ROCHA, J. H. T.; BACKES, C.; DIOGO, F. A.; PASCOTTO, C. B.; BORELLI, K. Composto de lodo de esgoto como substrato para mudas de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 73, p. 27 - 35, 2013.

ROCHA, R. E. M.; PIMENTEL, M. S.; ZAGO, V. C. P. Avaliação de biossólido de águas servidas domiciliares como adubo em couve. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 12, p. 1435-1441, 2003.

RODRIGUES, R. A. R.; MELLO, W. Z. Fluxos de óxido nitroso em solos com cobertura de floresta ombrófila densa Montana na serra dos órgãos, Rio de Janeiro. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1549-1553, 2012.

RODRIGUES, R. S. Redução da carga poluidora em lodo de suinocultura através da filtração. **Revista Brasileira de Agrociência**, n. 4, v. 9, p. 407-411, 2003.

ROHR, R. I. T.; MIRANDA, D. C. Percepção dos Agentes Comunitários de Saúde sobre saneamento Ambiental no Município de Rio Novo do Sul ES. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 12, n. 1, p. 63-71, 2010.

ROLDÁN, A.; CARAVACA, F.; HERNÁNDEZ; GARCCÍA, C.; SÁNCHEZ-BRITO, C.; VELÁSQUEZ, M.; TISCAREÑO, M. No-tillage, crop residue additions, and legume cover cropping effects on soil quality characteristics under maize in Patzcuaro watershed (Mexico). **Soil and Tillage Research**, v. 72, n. 1, p. 65-73, 2003.

RONQUIM, C. C. Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais. **Embrapa Monitoramento por Satélite. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2010.

ROSSMANN, M.; VIEIRA, D. B.; AVELAR, F. F.; MATOS, A. T. Redução da viabilidade de ovos de helmintos em lodo de esgoto doméstico caçado. **Revista Engenharia na Agricultura**, Viçosa, Minas Gerais, v. 22, n. 1, p. 43-29, 2014.

SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. Fundamentos da matéria orgânica do solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre, **Gênesis**, 1999. 491p.

SANTOS, S. S. **Influência da aplicação, via irrigação por gotejamento, de esgoto sanitário tratado na cultura do cafeeiro e no solo**. 2004. 70f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

SAS System version 9.2 for Microsoft Windows [computer software]. North Carolina State University, USA, SAS Institute Inc.; 2008.

SKIBA, U.; SMITH, K. A. The control of nitrous oxide emissions from agricultural and natural soils. **Chemosphere-Global Change Science**, v. 2, n. 3, p. 379-386, 2000.

SILVA, D. R. G.; PEREIRA, A. F.; DOURADO, R. L.; SILVA, F. P.; AVILA, F. W.; FAQUIN, W. Productivity and efficiency of nitrogen fertilization in maize under different levels of urea and NBPT-treated urea. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 516-523, 2011.

SILVA, F. C.; BOARETTO, A. E.; BERTON, R. S. Características agrotecnológicas, teores de nutrientes e de elementos-traço em cana-de-açúcar (soqueira), cultivada em solos adubado com o lodo de esgoto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA DO SOLO, 25, 1995, Viçosa. **Anais**. Viçosa: SBCS/UFV, 1995. p. 2279-2287.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos**, São Paulo: Varela, p. 7-20, 1997.

SILVA, P. R. D; LANDGRAF, M. D; ZOZOLOTTO, T. C; REZENDE, M. O. O; PELATTI, I. Estudo preliminar do vermicomposto produzido a partir de lodo de esgoto doméstico e solo. **Eclética Química**, v. 35, n. 3, p. 61-67, 2010.

SILVA, R. R.; SILVA, M. L. N.; CARDOSO, E. L.; MOREIRA, F. M. S.; CURI, N.; ALOVISI, A. M. T. Biomassa e atividade microbiana em solo sob diferentes sistemas de manejo na região fisiográfica Campos das Vertentes - MG. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 34, n. 5, p. 1585-1592, 2010.

SINHA, R. K.; HERAT, S.; BHARAMBE, G.; BRAHAMBHATT, A. Vermistabilization of sewage sludge (biosolids) by earthworms: converting a potential biohazard destined for landfill disposal into a pathogen-free, nutritive and safe biofertilizer for farms. **Waste Management & Research**, v. 28, n. 10, p. 872-881, 2010.

SOUZA, N. L. Solarização do solo. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n. 1, p. 3-15, 1994.

SPADOTTO, C. A. Comportamento e destino ambiental de herbicidas. 2002 Comitê do Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/meio-ambiente/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1023292/modeling-pesticide-movement-in-soils>> . Acesso em: 25 de nov 2015.

SPINOSA, L. **Wastewater sludge: A global overview of the current status and future prospects**. IWA Publishing, v. 10, p. 11-15, 2011.

SUTTON, M. A.; PITCAIRN, C. E.; FOWLER, D. The exchange of ammonia between the atmosphere and plant communities. **Advances in Ecology Research**, New York, v. 24, p. 301-393, 1993.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3º edição. 719. Editora Artmed. 2004. **Bibliografia Complementar**.

TASHIMA, N. T.; SIMÕES, M. J. S. Parasitas intestinais. Prevalência e correlação com idade e com os sintomas apresentados de uma população infantil de Presidente Prudente, São Paulo. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 35-39, 2005.

TAYLOR, M. A; COOP, R. L; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

TONON D. **Desinfecção de efluentes sanitários por cloração visando o uso na agricultura** 2007. 284f Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da UNICAMP, Campinas, 2007.

TORRES, A. G. **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**. Bentham Science Publishers, 2010.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508- 513, 2002.

TRANNIN, I. C. B.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Atributos químicos e físicos de um solo tratado com biossólido industrial e cultivado com milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, p. 223-230, 2008.

TRANNIN, I. C. B.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Características biológicas do solo indicadores de qualidade após dois anos de aplicação de biossólido industrial e cultivo de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1173-1184, 2007.

TSUTIYA, M. T. Alternativas de disposição final de biossólidos. In: TSUTIYA, M. T.; COMPARINI, J. B.; SOBRINHO, P. A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P. C. T.; MELFI, A. J.; MELO, W. J.; MARQUES, M. O., eds. **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: Sabesp, 2001. 468 p.

UCHOA, C. M. A. ALBUQUERQUE, M. C.; CARVALHO, F. M.; FALCÃO, A. O.; SILVA, P.; BASTOS, O. M. P. Parasitismo intestinal em crianças e funcionários de creches comunitárias na cidade de Niterói, Rio de Janeiro. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, GO, v. 38, n. 4, p. 267-278, 2009.

VANZO, J. E; MACEDO, L. S.; TSUTYA, M. T. Registro da produção de biossólidos. O caso da ETE Franca. In: TSUTIYA, M. T.; COMPARINI, J. B.; SOBRINHO, P. A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P. C. T.; MELFI, A. J.; MELO, W. J.; MARQUES, M. O., eds. **Biossólidos na Agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001. p. 227-242.

VICTORIA, R. L.; PICCOLO, M. C.; VARGAS, A. A. T. O ciclo do nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C. **Microbiologia do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 105-119, 1992.

VOLPE, C. A.; CUNHA, A. R. Dados meteorológicos de Jaboticabal no período de 1971-2000. In: **Fórum de Estudos dos Problemas Referente às Mudanças Mesoclimáticas no Município de Jaboticabal**. Jaboticabal, 2008. Comissão de Assuntos Relevantes da Câmara Municipal de Jaboticabal, 2008.

WELLER, P. F.; NUTMAN, T. B. Infecções por nematódeos intestinais. **Gastrenterologia e Hepatologia de Harrison-2**, p. 251, 2014.

WHO - World Health Organization. Emerging foodborne diseases. **Fact Sheet**, 2002.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for detection of hookworm ova. **Medical Journal of Australia, North Sidney**, v. 8, n. 18, p. 375-376, 1921.

WINN, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

YADA, M. M. **Metais pesados, atributos químicos e bioquímicos em latossolos e plantas de milho após aplicação de lodo de esgoto por dezesseis anos consecutivos**. 2014. 99f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

YANKO, W. A, 1987. Ocurrance of pathogens in distribution and marketing municipal sludges IN: **Environmental regulation and technology: control of pathogens and vector attraction in sewage sludge**. Rapport Washington U.S: EPA, 1992.

ZACARIAS, S. S. H.; HOPPE, E. G. L.; OLIVEIRA, R. A. Removal of Total Coliforms, Thermotolerant Coliforms, and Helminth Eggs in Swine Production Wastewater Treated in Anaerobic and Aerobic Reactors. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, 2014.