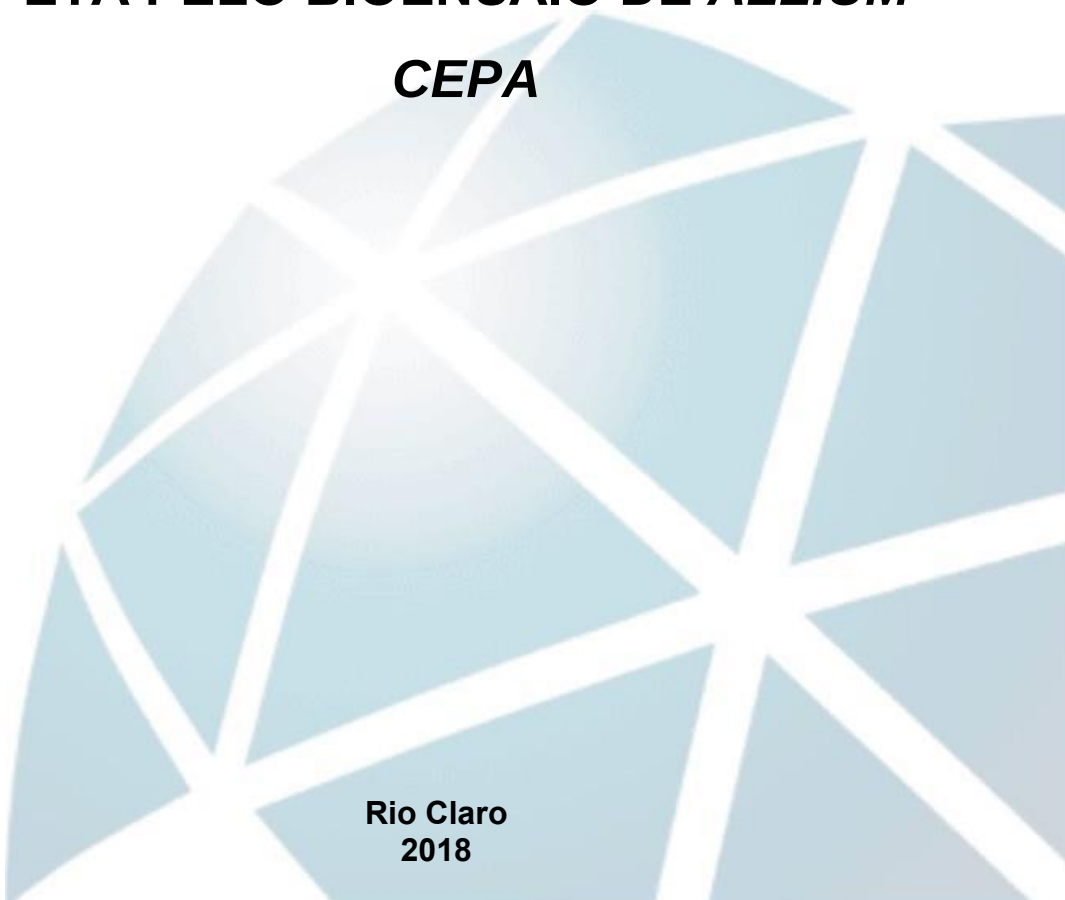

ECOLOGIA

TAMARA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA DETOXIFICAÇÃO DE
ASSOCIAÇÕES DE LODOS DE ETE E
ETA PELO BIOENSAIO DE *ALLIUM*
*CEPA***



**Rio Claro
2018**

TAMARA SANTOS

AVALIAÇÃO DA DETOXIFICAÇÃO DE ASSOCIAÇÕES DE
LODOS DE ETE E ETA PELO BIOENSAIO DE *ALLIUM CEPA*

Orientador: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales

Co-orientador: Laís Roberta Deroldo Sommaggio

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Ecológa.

Rio Claro
2018

604.6 Santos, Tamara
S237a Avaliação da detoxificação de associações de lodos de ETE e ETA
pelo bioensaio de *Allium cepa* / Tamara Santos. - Rio Claro, 2018
37 f. : il., figs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ecologia) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales
Coorientadora: Laís Roberta Deroldo Sommaggio

1. Resíduos. 2. Resíduo sólido. 3. Biorremediação. 4. Aberrações
cromossômicas. 5. Genotoxicidade. 6. Fertilizante agrícola. I. Título.

Dedico este trabalho à minha mãe.

*“Se pensa que esta terra lhe pertence,
você tem muito ainda o que aprender...”*
(Pocahontas)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Cleunice, que me fez tornar a mulher que sou hoje, foi mãe e pai, me apoiou durante toda minha trajetória até aqui, aguentou minhas crises, e mesmo nos momentos em que estava passando pelos seus próprios problemas sempre teve tempo e palavras de conforto para me dar.

Às minhas irmãs, Amanda e Julia, pela companhia.

Aos meus amigos, Carolina, Guilherme e Nathany, que foram fundamentais nessa caminhada até aqui, ainda que sem contato diário se fizeram presentes e sempre me deram forças para continuar.

À minha sala, ECO 13, pelos anos passados juntos e por todo aprendizado compartilhado. Em especial a Jessika (Polegar) e Michele (Dendê), que se tornaram amigas logo no primeiro contato e estiveram comigo durante todo o curso, compartilhando doces, tensão pré prova, risadas e angústias, vocês fizeram desses anos ainda mais especiais, obrigada!

As minhas companheiras de quarto, Jamile e Jessica, sempre dispostas a ter as conversas mais aleatórias que se pode imaginar. Obrigada pela ajuda nos trabalhos, pelas indicações de filmes, livros e pelos cafés da tarde. Em especial a James, pelas conversas telefônicas que duravam horas, porque eu sempre tinha um drama ou uma notícia ruim (que vi na tv) diferente para contar.

Ao meu namorado Moisés, obrigada, por me ajudar nos trabalhos, pelo apoio incondicional que você me deu todo esse tempo, por acreditar no meu potencial mesmo quando eu mesma tinha dúvidas e por aguentar horas aterrorizantes de vôo para vir me ver, te quiero mucho cariño!

A todos os funcionários da UNESP que contribuem para que os alunos possam ter um aprendizado de qualidade, em especial a todos os professores com quem tive contato durante a graduação e ao técnico do Departamento da Ecologia, Carlinhos, que fez os campos serem muito mais divertidos.

A todas as pessoas do Laboratório de Mutagênese que me receberam de braços abertos.

À minha orientadora, Prof^a Marin e minha co-orientadora Laís, obrigada por me ajudarem com este trabalho, por toda paciência, tempo e aprendizado.

À FAPESP pela bolsa concedida para a realização deste projeto.

Dedico a Ecologia.

Resumo

As Estações de Tratamento de Água (ETA) e as Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) usam metodologias que visam garantir a qualidade da água a ser disponibilizada para a população e minimizar impactos dos resíduos sobre os corpos d'água. Contudo, os processos de tratamentos geram resíduos, denominados de lodo de tratamentos. Esses resíduos, quando não previamente tratados, são descartados em corpos d'água ou, após tratamento, enviados para aterros sanitários, gerando alto custo para as estações de tratamento. O lodo de esgoto (LE) apresenta características favoráveis para ser reutilizado na agricultura como fertilizantes ou recondicionantes de solos desgastados, por conter grandes quantidades de matéria orgânica. Porém, o uso desse resíduo sem tratamento prévio adequado pode causar impactos negativos no ambiente, por ele também pode conter substâncias nocivas, como metais e compostos orgânicos potencialmente tóxicos. O lodo proveniente das ETAs (LA) vem sendo empregado em alguns países na área de construção civil e na produção de citrus, entretanto no Brasil poucos estudos avaliaram os benefícios do uso do LA na agricultura. A biorremediação é um processo usado em tratamento de resíduos, que utiliza microrganismos capazes de decompor poluentes. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do processo de biorremediação, por um período de 6 meses, na detoxificação dos lodos de ETE (LE) e ETA (LA), por meio do ensaio com *Allium cepa*. Foram avaliados neste estudo os potenciais fitotóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de amostras de lodos puros (LA e LE), de associação entre LA e LE e associações dos dois lodos com solo, antes e após o processo de biorremediação. No tempo inicial do experimento (T0), os tratamentos realizados com LE; LE+S; LE+LA inibiram a germinação das sementes de *A. cepa*. Contudo, as radículas das poucas sementes que germinaram não atingiram comprimento suficiente para a realização dos ensaios ecotoxicogenéticos. Com relação aos resultados de citotoxicidade e mutagenicidade, os tratamentos não foram significativos, quando comparados com os resultados do teste controle negativo (CN). Já para o parâmetro de genotoxicidade (T0), foi observado resultado significativo apenas para a amostra de LA puro, mostrando que o mesmo pode conter substâncias com potencial genotóxico, e que, quando diluído com outros compostos, como LE e S, o efeito tóxico é minimizado. A alteração mais encontrada

para LA foi célula binucleada, o que pode ser indicativo de um processo de morte celular. Em T1 (6 meses de biorremediação), não foi observada inibição de germinação de sementes, nem efeito citotóxico e mutagênico para os tratamentos realizados. Após 6 meses de biorremediação, foi observado potencial genotóxico para LA, LA+S, LE, LE+S, LE+LA e LE+LA+S, sendo a alteração mais encontrada, em todos os tratamentos, as células binucleadas. Por este estudo podemos concluir que, após 6 meses de biorremediação, o LE teve a sua toxicidade reduzida (permitiu a germinação das sementes), mas foi genotóxico (induziu alterações significativas em *A. cepa*). Neste mesmo período de biorremediação, houve um aumento da toxicidade do LA, e indução de genotoxicidade para LA+S, efeitos não registrado para o T0. Por este estudo, foi possível verificar que LE e LA puros, sem tratamentos prévios, não são indicados para uso agrícola e que o tempo de biorremediação de 6 meses também não foi suficiente para a detoxificação dos compostos tóxicos desses dois resíduos estudados.

Palavras-chave: Resíduo sólido, biorremediação, aberrações cromossômicas, genotoxicidade, fertilizante agrícola.

Abstract

Water Treatment Plants (WTP) and Sewage Treatment Plants (STP) use methodologies to ensure the quality of water for the population and to reduce the impacts of xenobiotics on water bodies. However, the treatment processes generate waste, called treatment sludge. They can be discarded without treatment in water bodies or, if treated, sent to landfills, generating a high cost for the stations. Sewage sludge (SS) has beneficial characteristics to be reused in agriculture as fertilizers or as soil reconditioners successively used in crops due to its large amounts of organic matter. However, the use of this waste without adequate pretreatment can have negative impacts on the environment, as it may contain harmful substances, such as metals and potentially toxic organic compounds. Sludge from Water Treatment Plants (SW) has been used in some countries in the area of civil construction and citrus crops, but in Brazil few studies have considered the benefits of using SW in agriculture. Bioremediation is a process used in waste treatment, which uses microorganisms capable of decomposing pollutants. The aim of this study was to evaluate the efficacy of the bioremediation process for a period of 6 months in the detoxification of WTP and STP sludge, through *Allium cepa* test. The phytotoxic, cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials of pure sludge samples (SW and SS), of association between SW and SS and combinations of both sludges with soil, before and after the bioremediation process, were evaluated in this study. At the initial time of the experiment (T0), the treatments performed with SW; SW+S; SW+SS samples inhibited the germination of *A. cepa* seeds. However, the radicles of the few seeds that germinated did not reach enough length for the accomplishment of the ecotoxicogenetic tests. Regarding the results of cytotoxicity and mutagenicity for T0, the treatments were not significant when compared with the results of the negative control (NC) test. As for the genotoxicity parameter (T0), a significant result was observed only for the pure SS sample, showing that it can have genotoxic potential substances, and, when diluted with other compounds, as SW and S, the toxic effects are minimized. The most commonly found alteration for SW was binucleate cell, which may be indicative of a cell death process. In T1 (6 months of bioremediation), no inhibition of seed germination, nor cytotoxic and mutagenic effect was observed for the treatments performed. After 6 months of bioremediation, genotoxic potential was observed for all treatments (SS, SS+S, SW, SW+S, SW+SS e SW+SS+S),

being the most commonly found alteration, binucleate cells. By this study it can be concluded that, after 6 months of bioremediation, the LE had its toxicity reduced (allowed the germination of the seeds), but it was genotoxic (induced significant changes in *A. cepa*). In this same bioremediation period, there was an increase in LA toxicity, and genotoxicity to LA + S, effects not recorded for T0. By this study, it was possible to verify that pure LE and LA, without previous treatments, are not indicated for agricultural use and that the bioremediation time of 6 months was also not sufficient for the detoxification of the toxic compounds of these two residues studied.

Key words: Solid residues, bioremediation, chromosome aberrations, genotoxicity, agricultural fertilizer.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Material.....	17
3.2 Preparação das amostras	17
3.3 Bioensaios com <i>Allium cepa</i>	18
3.4 Teste de Aberrações Cromossômicas e do Micronúcleos, realizadas com células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	19
3.5 Forma de análise dos resultados.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5. CONCLUSÃO	33
Referências bibliográficas	34

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional tem aumentado a demanda por recursos naturais, o que, conseqüentemente, tem intensificado as alterações nos ecossistemas. As atividades humanas, além de alterarem os ecossistemas pela prática do extrativismo, também, ao utilizarem os recursos naturais extraídos do meio, geram resíduos que, se não receberem tratamento adequado ou não apresentarem perspectiva de reciclagem, podem se caracterizar em uma ameaça para a biodiversidade (GOULART; CALLISTO, 2003; MAZZEO, 2013; MANZETTI; SPOEL, 2015).

O despejo direto de águas servidas nos rios é a principal causa de poluição de regiões com alta densidade demográfica (SILVA et al., 2001). Deste modo, existe a necessidade do desenvolvimento de estratégias e aplicação de procedimentos que minimizem os efeitos negativos que o homem promove no ambiente. Para isso, vêm sendo aplicados muitos processos de recuperação e reutilização das águas residuais, que visam mitigar a poluição e manter a qualidade dos cursos d'água (BELHAJ et al., 2016).

As Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) são responsáveis pela remoção dos resíduos das águas servidas. Essas águas passam por diferentes etapas de tratamento, incluindo pré-tratamento, tratamentos primário e secundário e, em alguns casos, tratamento terciário, para serem então devolvidas para os rios. Neste processo, é gerado um resíduo semi sólido conhecido como lodo de esgoto (LE), que pode ser proveniente tanto de tratamento de efluentes urbanos como industriais (MAZZEO et al., 2015). No Brasil, estima-se que sejam produzidas, anualmente, de 150 a 220 mil toneladas de LE seco. Considerando que apenas 30% das zonas urbanas possuem tratamento de esgoto e que a legislação brasileira estabeleceu prazos para que todas as cidades tratem seus efluentes urbanos, existe uma expectativa de que a produção de LE aumente, consideravelmente, nos próximos anos (PEDROZA et al., 2010).

O LE apresenta uma constituição bastante diversificada, mas tem como composto comum, principalmente, matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, podendo ainda conter potássio, cálcio e magnésio (DORES-SILVA; LANDGRAF; REZENDE, 2013; MAZZEO, 2015). Contudo, neste resíduo também podem ser encontrados poluentes emergentes e compostos persistentes (CESAR et al., 2012; MANZETTI; SPOEL, 2015).

As Estações de Tratamento de Água (ETA) são locais onde são realizados processos físicos e químicos para purificar água captada em fontes, como rios e represas, e assim torná-la própria para o abastecimento e consumo humano. O tratamento para obtenção de água potável envolve, em geral, processos de oxidação, coagulação, floculação, decantação, filtração, desinfecção, estabilização do pH e fluoretação (PAIXÃO et al., 2008).

Na coagulação, são utilizados sulfato de alumínio, sais de ferro ou o policloreto de alumínio (RAZALI; ZHAO; BRUEN, 2007). Nessa etapa, as partículas de sujeira se aglomeram para, em seguida, decantarem no fundo de um tanque de decantação. Por fim, a água submetida ao tratamento recebe aditivos químicos para corrigir a sua acidez (como a cal), cloro para a sua desinfecção e flúor para a prevenção de cáries na população (MIRANDA; MONTEGGI, 2005).

O tratamento de água potável também gera resíduo sólido, denominado de Lodo de ETA (LA) que, após ser desidratado mecanicamente, pode ser disposto em aterros sanitários. No LA podem ser encontrados resíduos orgânicos e inorgânicos, decorrentes tanto dos químicos usados no tratamento como dos poluentes presentes na água a ser tratada, como magnésio, cálcio, ferro, entre outros, além de material biológico como bactérias, vírus e algas (PORTELLA et al., 2003). Neto (2011) enfatiza que a qualidade da água captada para tratamento pode influenciar na utilização de maior ou menor quantidade e variedade de produtos químicos. Assim, de acordo com o tratamento aplicado, pode se ter diferentes qualidades do LA e maior ou menor quantidade de lodo gerado.

Existem, aproximadamente, 7.500 ETAs no Brasil. Considerando apenas as operadas pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP), a produção de lodo (LA) seco é de 90 toneladas/dia (WAGNER; PEDROSO, 2014). Embora várias opções alternativas de eliminação, regeneração e reutilização benéfica tenham sido exploradas na última década, para o LA (BABATUNDE; ZHAO, 2007), tem havido uma busca prioritária e urgente por opções mais sustentáveis para este resíduo, devido às regulamentações ambientais restritas, às maiores pressões públicas para minimizar problemas gerados pelos aterros sanitários, ao aumento dos custos de disposição e à diminuição da capacidade dos aterros sanitários.

Devido às características citadas, tanto o LE quanto o LA, quando lançados diretamente no meio ambiente, podem causar contaminação das águas

subterrâneas, propagação de patógenos e acúmulo de toxinas na vegetação (MANZETTI; SPOEL, 2015; MARTINS; SOUZA; SOUZA, 2016). Por esse motivo, foram desenvolvidas algumas alternativas para o uso de lodo, entre elas o uso na área de construção civil; depósito em aterros sanitários; incineração; lagoas de armazenagem e digestão aeróbica, com posterior deposição em superfície; bota-foras oceânicos; e uso na agricultura. Entretanto estas aplicações requerem tecnologia sofisticada e alto investimento financeiro (ALLEMAN; BERMAN, 1984; SILVA et al., 2001; CESAR et al., 2012). Os métodos de deposição em aterros e aplicação no solo são considerados os mais viáveis economicamente (SINGH; AGRAWAL, 2008). No Brasil, a maioria das ETAs lançam seus resíduos nos corpos d'água, sem nenhum tratamento prévio (ANDRADE; SILVA; OLIVEIRA, 2014), enquanto as ETEs estão começando a adotar os métodos de disposição em aterros e de compostagem (PEREIRA; KUCH, 2005).

Apesar da disposição de LE no solo ser capaz de promover a biodisponibilidade de metais pesados e de compostos orgânicos persistentes, que podem afetar a flora e fauna exposta (STERRITT; LESTER, 1980; MANZETTI; SPOEL, 2015), ele também possui macronutrientes e compostos orgânicos que podem ser interessantes para o condicionamento do solo e, conseqüentemente, para a utilização das plantas (SINGH; AGRAWAL, 2008).

Com relação ao LA, a sua deposição inadequada no ambiente pode gerar impactos negativos aos ecossistemas, devido a presença de metais e de chorume, que são agentes extremamente tóxicos para os organismos. Esses químicos podem afetar tanto a fauna como a flora e a qualidade da água e do solo (ANDRADE; SILVA; OLIVEIRA, 2014). Entretanto, pesquisas mostraram que, quando o LA é tratado previamente ao descarte, ele pode adquirir condições de ser utilizado como condicionante de solos agricultáveis; na recuperação de áreas degradadas; e para finalizar obras de engenharia, como estradas e aterros (CHAO, 2006).

Cerca de 30 % de LE produzido na Europa já é aplicado na agricultura e 50 % do LE dos EUA tem o solo como destino, sendo aproximadamente 33% da produção destinado à agricultura (PEDROZA, 2010). Dos 0,25 milhões de toneladas de LE seco produzidas na Austrália, um terço também é destinado a agricultura daquele país (MAZIVIERO, 2011).

Na Holanda, desde 1989, cerca de 12% da produção do LA vem sendo aplicado na agricultura. A França vem usando esse resíduo em compostagem e na

área de construção civil. Os EUA têm utilizado, aproximadamente, 25 % do LA como insumo agrícola (OLIVEIRA et al. 2015). Atualmente, estes valores devem ser maiores, devido às pesquisas desenvolvidas e às regulamentações estabelecidas por diversos países. No Brasil, o uso do LE na agricultura é regulamentado pela resolução 375/2006 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), (MAZIVIERO, 2011), mas, para o uso do LA, ainda não existe legislação pertinente.

As informações descritas anteriormente comprovam o potencial agrícola deste resíduo, mas também alerta para a necessidade de mais investimentos em estudos que visem aplicações mais sustentáveis para os mesmos. Porém, como a utilização de lodos de estações de tratamentos na agricultura pode transferir substâncias potencialmente tóxicas para as culturas e, assim, causar prejuízos para as mesmas e para o meio ambiente, os lodos devem, no mínimo, passar por estabilização química e higienização, antes de serem utilizados em solos agricultáveis ou mesmo descartados no ambiente (SOSNOWSKI; WIECZOREK; LEDAKOWICZ, 2003; MARTINS; SOUZA; SOUZA, 2016).

Chao (2006) afirma que a utilização de LE, conjuntamente com LA, pode ser benéfica como corretivo de solo, pois o primeiro é rico em nutrientes, enquanto o segundo possui propriedades de retenção de água, correção de pH e capacidade de se misturar mais facilmente ao solo.

Uma das alternativas para o tratamento prévio de resíduos é o processo de biorremediação, o qual consiste em biodegradar poluentes de matrizes contaminadas, por meio de microrganismos que transformam os poluentes em compostos inócuos (BERTICELLI et al., 2016). Esses mesmos autores ainda citam que esse processo vem sendo muito aplicado, por exemplo, na recuperação de solos contaminados com pesticidas e com compostos orgânicos tóxicos. Para Queiroz (2016), lodos biodegradados de ETE e de ETA podem ser usados na agricultura, por apresentarem isenção de contaminantes ou redução dos mesmos a níveis aceitáveis pela legislação vigente. Alguns estudos comprovaram a eficiência do processo de biodegradação de LA, para uso em solos que recobrem aterros sanitários, e de biorremediação de LE, para degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos totais (GUERRA; ANGELIS, 2005; GEANEZINI, 2015). Mazzeo et al (2015; 2016 a,b) e Sommaggio (2013, 2016) mostraram que quando o LE foi associado ao solo, foi possível observar, após processo de biorremediação, uma detoxicação significativa deste resíduo.

De acordo com os trabalhos apresentados anteriormente, a biorremediação por associações de LE, LA e solo pode ser uma alternativa viável para o uso seguro do LA na agricultura, sendo interessante do ponto de vista econômico e ambiental. Contudo, Mielli et al. (2009) recomendam que, para se aplicar lodos derivados de sistemas de tratamentos em áreas agrícolas, deve-se, primeiramente, realizar ensaios de toxicidade, além das análises químicas, para conhecer as eventuais características tóxicas do lodo a ser aplicado.

Os testes ecotoxicológicos têm sido muito utilizados na avaliação da qualidade ambiental (CESAR et al., 2012), pois possibilitam avaliar a resposta dos organismos a diferentes poluentes, além de informar como ocorre esta interação nos habitats (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Mazzeo et al. (2015) afirmam que a realização de bioensaios tem se tornado cada vez mais importante e indicado para estudos de impactos ambientais, já que os ensaios biológicos permitem avaliar os efeitos isolados ou combinados de poluentes, bem como os complexos processos bioquímicos e fisiológicos associados à sua ação.

Dentre os bioensaios, os de toxicidade genética, realizados com plantas superiores, são muito indicados para avaliação da toxicidade do lodo (MARTINS; SOUZA; SOUZA, 2016), sendo que muitos trabalhos utilizam o organismo teste *Allium cepa*, para este fim (RANK; NIELSEN, 1998; SRIVASTAVA; KUMAR; GUPTA, 2005; MAZZEO, 2013; SOMMAGIO, 2013). Esses organismos apresentam biomarcadores eficientes para avaliar danos celulares e genéticos, além de ser um ensaio rápido e de fácil manuseio, considerado um importante método para avaliação da contaminação ambiental (LEME; MARIN-MORALES, 2009; MAZZEO et al., 2015).

A utilização de novas tecnologias que possam minimizar impactos proporcionados por resíduos tóxicos, como o de lodos de estações de tratamentos, são opções interessantes sob o ponto de sustentabilidade, manutenção da qualidade ambiental e conservação da biodiversidade. Um método potencialmente promissor é a associação de resíduos com características diferentes, como os LA e LE. A junção desses resíduos pode conferir características de biodegradabilidade para a mistura, melhores que as obtidas com os resíduos isolados. Isto porque, alguns componentes da mistura podem disponibilizar matéria orgânica, outros melhorarem o potencial hídrico do solo e outros ainda corrigem o pH. Deste modo, este projeto tem como objetivo avaliar a eficiência de processos de biorremediação

realizados com LA, LE e solo, individuais e em misturas, por meio de ensaios com o bioindicador *Allium cepa*. A importância deste estudo reside no fato de que o LA apresenta uma característica, teoricamente, detrimental, quando disponibilizado no ambiente, e o LE uma maior facilidade de degradação, pela sua alta concentração de matéria orgânica. Contudo, embora a biorremediação seja considerada um importante processo a ser aplicado em descontaminação ambiental, ela necessita ser monitorada, por ensaios ecotoxicológicos, nas mais variadas fases do processo, para que se tenha a certificação da efetividade da detoxicação e da eficiência do uso do produto final dessa biorremediação na agricultura.

2. OBJETIVOS

Considerando a grande produção e os impactos negativos que o LE e o LA são capazes de causar no meio ambiente, são necessários estudos que permitam avaliar a possibilidade de reutilização segura destes resíduos como, por exemplo, a utilização agrícola dos mesmos. Dessa forma, este projeto teve os seguintes objetivos:

- ✓ Avaliar os potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de diferentes proporções do LE, LA e solo (S), por meio do organismo teste *A. cepa*, antes (T0) e após 6 meses (T1) do processo de biorremediação;
- ✓ Analisar a eficiência do processo de detoxificação do LE e LA, após 6 meses de biorremediação;
- ✓ Estimar as possibilidades de uso do LE e LA na agricultura, após o processo de biorremediação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

O LE utilizado para a realização deste projeto foi obtido na ETE Toledos I, localizada na cidade de Santa Bárbara d'Oeste - SP, que apresenta capacidade para tratar 170 L/s de esgoto urbano. O esgoto tratado nesta unidade passa por um sistema de grades e caixa de areia, para remoção de sólidos grosseiros, segue para um tanque de aeração, onde a microbiota aeróbica ali existente degrada a matéria orgânica e, por último, é transferido para flotadores, onde ocorre o agrupamento dos flocos do lodo, a decantação e a separação do mesmo. Esses processos fazem parte dos tratamentos primário e secundário do lodo de esgoto. Após a separação, o lodo é encaminhado para uma centrífuga, para a sua desidratação, e transportado para um aterro sanitário.

O LA utilizado neste estudo foi obtido na ETA IV, também localizada na cidade de Santa Bárbara d'Oeste. Esta ETA possui a capacidade para tratar 300 L/s de água bruta, captada no Ribeirão dos Toledos. Quando chega na estação de tratamento, a água recebe cloro, cal hidratada e sulfato de alumínio. Após esse tratamento, segue para o processo de floculação, decantação, filtragem e adição de flúor, para, finalmente, ser disponibilizada para o consumo da população.

O solo (S) utilizado neste estudo foi coletado no Jardim Experimental da UNESP Campus de Rio Claro - SP, por ser um solo isento de aditivos químicos, como fertilizantes e agrotóxicos.

As amostras foram preparadas conforme descrito a seguir:

- LE puro;
- LA puro;
- LE+S na proporção 3:1 (v/v);
- LA+S na proporção 1:3 (v/v).
- Mistura 1: composta por LE+LA, na proporção de 3 LE:1 LA (v/v);
- LE+LA+S: composta pela Mistura 1 + solo (S), na proporção de 1 mistura 1:1S (v/v).

3.2 Preparação das amostras

As amostras foram dispostas em cubas de material inerte – inox (24 cm de largura, 20 cm de altura e 30 cm de comprimento), sendo três cubas para cada tipo

de amostra (triplicata). Os fundos das cubas foram preenchidos com esferas de vidro (formando uma camada de cerca de 2 cm), para simular a camada porosa do solo. As cubas permaneceram no Jardim Experimental da UNESP de Rio Claro (local coberto), sob temperatura ambiente, durante 6 meses, período estipulado para a avaliação do processo de biorremediação (bioatenuação) das amostras e associações de LA, LE e S. Semanalmente, foi borrifada água ultrapura em cada uma das cubas, com o intuito de manter a umidade no sistema, de modo a não prejudicar o desenvolvimento dos microrganismos.

Os potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das amostras foram avaliados para T0, ou seja, para as amostras recém preparadas (antes do processo de biorremediação), e para T1, após seis meses de biorremediação.

Figura 1: A, B e C: Cubas de inox contendo as diversas amostras e associações de LA, LE e S (em triplicata), dispostas no Jardim Experimental do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.3 Bioensaios com *Allium cepa*

Para a realização dos bioensaios com o organismo teste *A. cepa*, primeiramente 100 sementes da variação Baia Periforme foram submetidas à germinação em placas de Petri, contendo, separadamente, as diferentes amostras

especificadas anteriormente. Os tratamentos controles foram realizados em areia (controle negativo- CN), em solo (controle ambiental) e em Metilmetano Sulfonado (MMS, Sigma- Aldrich, CAS 66-27-3), para controle positivo (CP). Todos os testes foram realizados em triplicata.

Após a germinação, quando as radículas atingiram cerca de 2 cm de comprimento, as mesmas foram coletadas, fixadas em Carnoy (álcool e ácido acético na proporção de 3:1 – v/v) e mantidas em temperatura ambiente por 6 a 18 horas. Posteriormente, o fixador foi trocado por um recém preparado e as raízes armazenadas a 4 °C, até a confecção das lâminas.

3.4 Teste de Aberrações Cromossômicas e do Micronúcleo, realizadas com células meristemáticas de *Allium cepa*

Os testes de Aberrações Cromossômicas (AC) e do Micronúcleo (MN) foram realizados com células meristemáticas de *A. cepa*, segundo o protocolo estabelecido por Grant (1982), com algumas modificações.

As raízes, anteriormente fixadas, foram submetidas a reação de Feulgen, para coloração. As lâminas foram preparadas, seccionando as regiões meristemáticas das raízes anteriormente fixadas, em uma gota de carmin acético (2%), para contra coloração do citoplasma. O material foi recoberto com lamínulas e esmagado suavemente. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética.

3.5 Forma de análise dos resultados

Foram considerados diferentes *endpoints* para avaliação da toxicidade. O índice de germinação, representativo dos efeitos fitotóxicos das amostras, foi obtido pela contagem das sementes germinadas em cada uma das placas. O *endpoint* de citotoxicidade foi avaliado pela razão entre o número de células em divisão e o número total de células analisadas (índice mitótico). Para as análises das AC, foram considerados diversos tipos de aberrações (perdas, fragmentos, pontes, atrasos, aderências cromossômicas, entre outros), observadas nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Todas as ACs, exceto quebra, foram consideradas como *endpoint* de genotoxicidade. Para o *endpoint* de mutagenicidade foram consideradas as proporções de células portadoras de MN e

quebras cromossômicas. A análise foi realizada em microscópio de luz, com aumento de 400x.

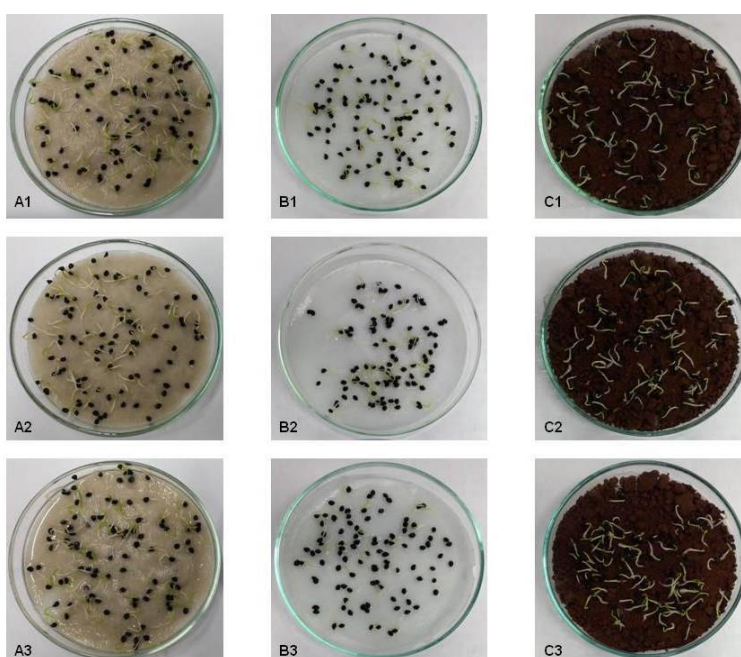
Todos estes parâmetros foram realizados pela contagem de cerca de 6000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina, para um total de 12 lâminas avaliadas para cada tratamento. As análises estatísticas, foram realizadas utilizando o software BioEstat 5.0., a $<0,05$ de nível de significância. Primeiramente foi realizado o teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Quando esse teste apresentou $p>0.05$, foi utilizado o teste ANOVA um fator, quando apresentou $p<0,05$, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados referem-se às atividades de pesquisas realizadas com as amostras e associações de LA, LE e solo, antes do início do processo de biorremediação (T0), para a avaliação da toxicidade inicial das amostras, e após o processo de biorremediação por 6 meses, para avaliar se houve detoxificação das amostras de LE e LA. O organismo teste *A. cepa* foi utilizado para caracterizar os efeitos fitotóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico do LE, LA e suas misturas.

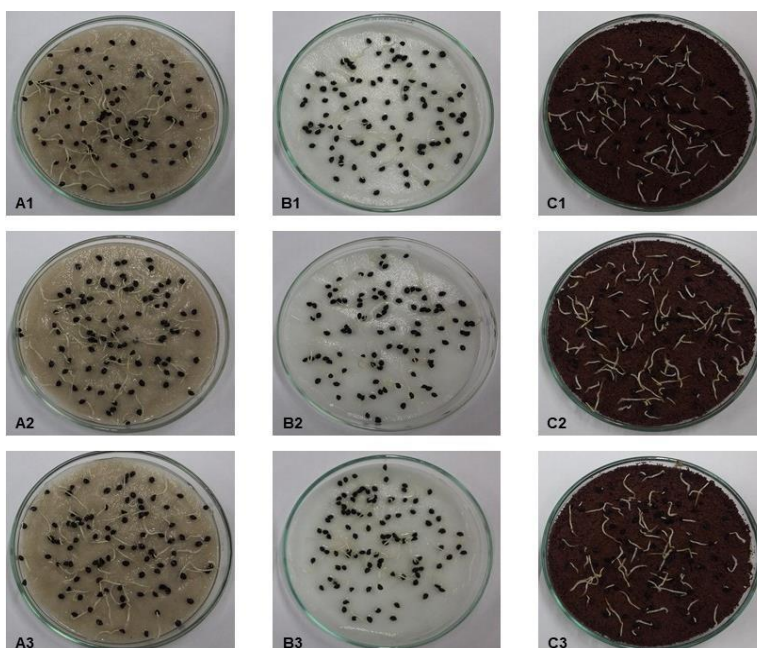
O teste de germinação de sementes é amplamente empregado para avaliação do potencial tóxico de materiais gerados a partir de compostagem de resíduos sólidos a serem utilizados na agricultura (KAPANEN; ITAVAARA, 2001). Os resultados dos testes de germinação realizados no presente estudo com sementes de *A. cepa* estão apresentados nas Figuras 2, 3 e 4 e a porcentagem de germinação apresentada no gráfico 1, para T0 e T1.

Figura 2: Germinação das sementes de *A. cepa*, referente aos tratamentos controle no T0.



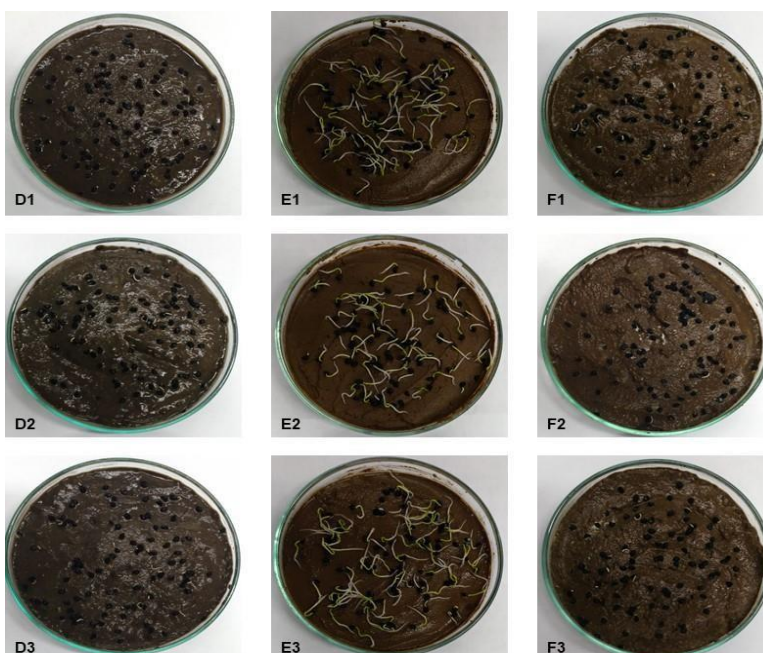
A: Controle negativo (areia); **B:** Controle positivo; **C:** Controle ambiental (solo). Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 2a: Germinação das sementes de *A. cepa*, referente aos tratamentos controle no T1.



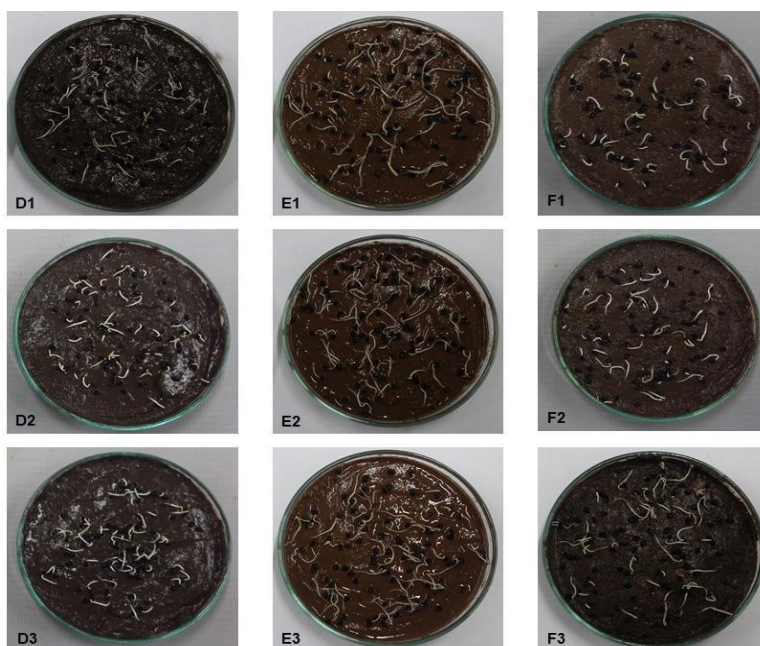
A: Controle negativo (areia); **B:** Controle positivo; **C:** Controle ambiental (solo). Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 3: Germinação das sementes de *A. cepa*, referente aos tratamentos com LE e LA no T0.



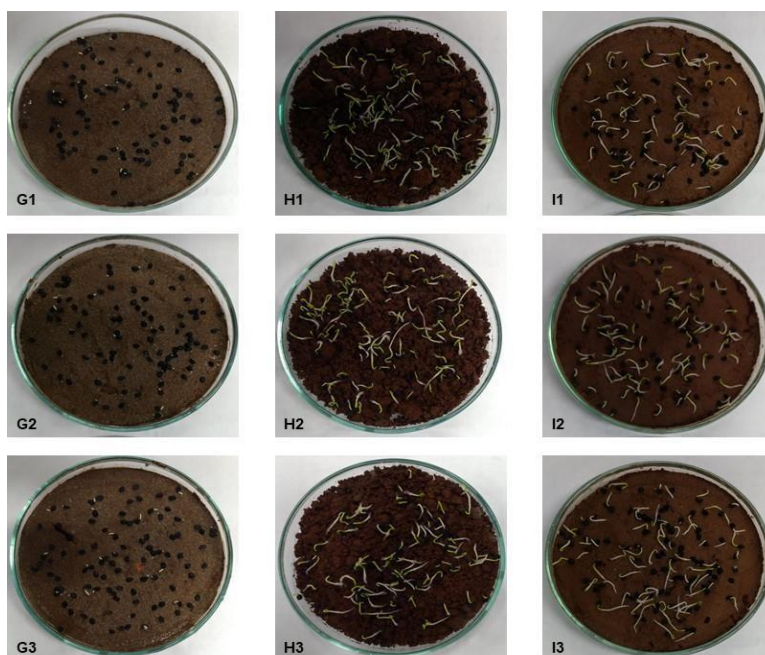
D: Lodo de ETE (LE); **E:** Lodo de ETA (LA); **F:** Mistura de lodo de ETE + lodo de ETA (LE+LA). Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 3a: Germinação das sementes de *A. cepa*, referente aos tratamentos com LE e LA no T1.



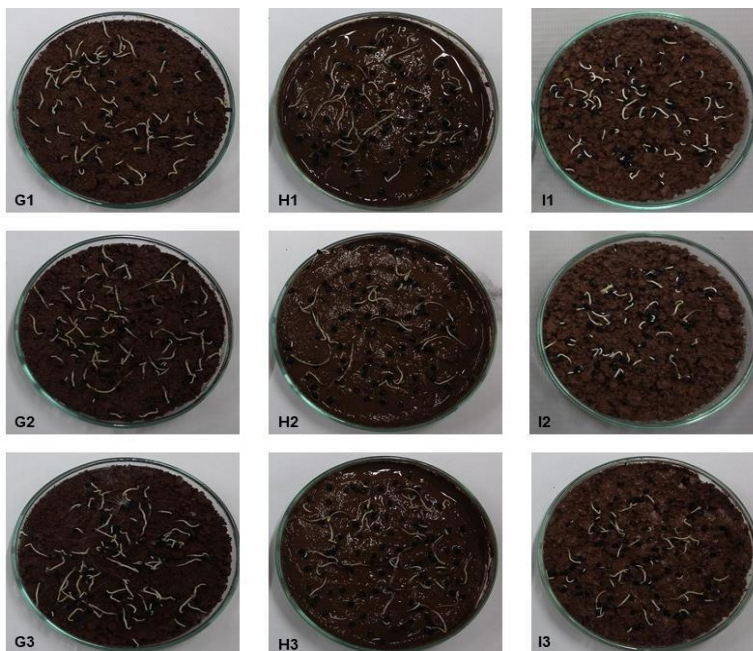
D: Lodo de ETE (LE); **E:** Lodo de ETA (LA); **F:** Mistura de lodo de ETE + lodo de ETA (LE+LA). Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 4: Germinação das sementes de *A. cepa*, referente aos tratamentos com LE, LA e solo no T0.



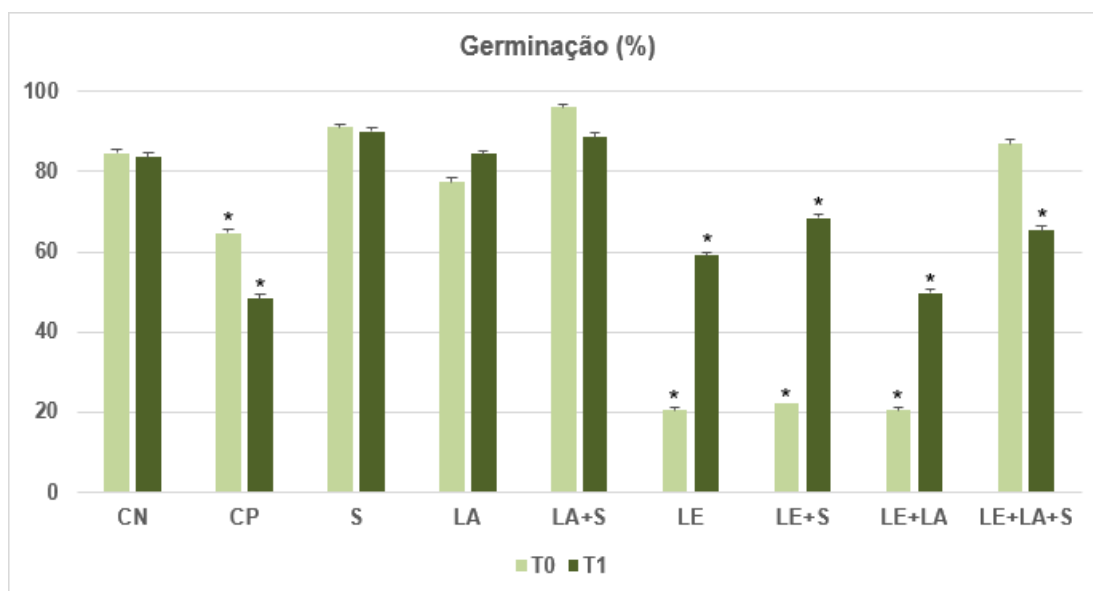
G: Lodo de ETE + solo (LE+S); **H:** Lodo de ETA + solo (LA+S); **I:** Lodo de ETE+ lodo de ETA + solo (LE+LA+S). Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 4a: Germinação das sementes de *A. cepa*, referente aos tratamentos com LE, LA e solo no T1.



G: Lodo de ETE + solo (LE+S); **H:** Lodo de ETA + solo (LA+S); **I:** Lodo de ETE+ lodo de ETA + solo (LE+LA+S).
Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 1: Porcentagem de germinação das sementes de *A. cepa* submetidas à exposição em amostras e associações das amostras de LA, LE e S, no tempo inicial (T0) e após 6 meses de atenuação natural (T1).



*Estatisticamente significativo ($p < 0,05$). CN: controle negativo; CP: controle positivo; S: solo; LA: lodo de ETA; LE: lodo de ETE. Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados de germinação, observados no T0, mostraram que todas as amostras que continham LE, exceto LE+LA+S, apresentaram porcentagens de germinação inferior a 30%, indicando o um alto potencial tóxico do LE. As sementes germinadas nesses testes não desenvolveram o suficiente para serem utilizadas na confecção de lâminas para as análises de ACs e MNs. Esses resultados demonstram que o LE, no T0, continha substâncias fitotóxicas capazes de inibir a germinação de sementes de *A. cepa*. Contudo, quando o LE foi misturado ao LA + S, provavelmente houve uma maior diluição dos compostos tóxicos do LE devido à própria proporção de LE da mistura (1 parte de Mistura 1 (composta de LE+LA na proporção de 3:1): 1 parte de solo) ser menor que as utilizadas nas demais associações estudadas nesta pesquisa. Estudos realizados por Maziviero (2011) também demonstraram que sementes de *A. cepa* submetidas a germinação em LE bruto, sem passar por processo de biorremediação, não germinaram. O autor também observou que os resultados da análise físico-química estavam dentro dos parâmetros limites definidos pela Resolução 357 do CONAMA. Os resultados do presente estudo e dos estudos de Maziviero (2011) evidenciam que misturas complexas, como o LE, podem conter substâncias que, mesmo em baixas concentrações, acabam conferindo, por sinergismo, alta toxicidade às misturas. Estes estudos ainda alertam para a necessidade de aumentar qualitativa e quantitativamente as análises químicas de misturas complexas, para que se possa detectar outros compostos, mesmo que estes ainda não estejam descritos na Resolução 357 do CONAMA. Esses dados também reforçam que uma avaliação consistente de amostras ambientais não se faz apenas por meio de análises químicas, mas é de extrema necessidade e importância a realização de testes ecotoxicológicos desenvolvidos com organismos testes reconhecidamente indicadores de biotoxicidade.

Assim como os resultados obtidos na presente avaliação, outros estudos corroboram com o potencial fitotóxico de LE puro. Estudos realizados por Mazzeo et al. (2015) mostraram que sementes de *A. cepa*, submetidas a germinação em LE (puro) de origem doméstica, tiveram sua germinação e crescimento radicular inibidos. Martins et al. (2016) também investigaram a toxicidade de um LE e de um bioossólido, obtido a partir de LE, os autores observaram inibição da germinação das sementes de *A. cepa*, considerando essas amostras altamente fitotóxicas. Nossos estudos e os outros estudos aqui relatados, demonstram que LEs de diferentes

tratamentos e origens podem apresentar na sua composição substâncias tóxicas, prejudiciais aos organismos a elas expostos. Esses resultados comprovam a inviabilidade de utilização deste resíduo sem tratamento prévio. Assim, para uso seguro deste resíduo como recondicionante ou fertilizante de solos agrícolas, é necessário que o mesmo passe, previamente, por algum tratamento de detoxificação.

Para as amostras do T1, foi observado que todos os tratamentos realizados apresentaram uma germinação maior que 50%, mostrando que o potencial fitotóxico das substâncias presentes do LE foi atenuado. No entanto, ainda foi observado diferenças significativas do índice de germinação entre as amostras que contém LE (LE; LE+S; LE+LA e LE+LA+S) e o CN, demonstrando que o LE, mesmo após 6 meses de biorremediação, ainda apresenta substâncias com potenciais fitotóxicos para *A. cepa*. Para o tratamento LE+LA+S no T1 a porcentagem de germinação diminuiu significativamente, possivelmente, devido a biodegradação e biodisponibilidade de compostos que anteriormente não se encontravam biodisponíveis para o organismo *A. cepa*. Os tratamentos LA e LA+S mantiveram a porcentagem de germinação em T1 próxima às observadas em T0.

A germinação de *A. cepa*, descritas em outros trabalhos com LE, ocorreu após períodos específicos de biorremediação, para cada tipo de LE estudado. Esses resultados mostram, então, que a biorremediação desse resíduo, com redução de toxicidade, é possível, provando que a biorremediação é um processo interessante para a decomposição ou inativação das substâncias com potencial fitotóxico (MAZIVIERO, 2011; SOMMAGGIO, 2013; MAZZEO et al. 2015; MARTINS; SOUZA; SOUZA, 2016). No entanto, para o LE avaliado nesse estudo, o período de 6 meses ainda não foi suficiente para a redução completa da fitotoxicidade das amostras.

A citotoxicidade testada neste estudo utilizou como parâmetro de avaliação o índice mitótico (IM). O IM é definido pela quantidade de células em divisão celular, dividido pelo total de células analisadas. Quando o índice mitótico registrado para o teste controle negativo (realizado com uma substância não tóxica, por exemplo a água) é superior ao registrado para o tratamento investigado, pode-se inferir que existe na amostra avaliada substâncias químicas que são biologicamente ativas e, por isso, prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento do organismo testado. Se o IM do tratamento for maior que do controle, pode-se inferir que existe nesta amostra

testada substâncias que induz aumento da divisão celular, o que pode provocar um aumento desordenado de células (BONOMO, 2014).

Os resultados dos efeitos citotóxicos, observados em T0 e T1 demonstram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos, pois todos apresentaram valores de índices mitóticos estatisticamente semelhantes, mostrando que o processo de divisão celular não foi afetado pelas amostras testadas.

As aberrações cromossômicas, utilizadas para avaliar a genotoxicidade de amostras ambientais, são definidas por alterações na estrutura ou no número de cromossomos, que ocorrem devido a exposição a agentes presentes nestas amostras. As alterações cromossômicas podem ser provocadas por agentes clastogênicos, agentes esses que interagem com a molécula de DNA, produzindo alterações do tipo quebras cromossômicas; ou por agentes aneugênicos, que induzem, por exemplo, a formação de pontes, perdas, atrasos e aderências cromossômicas, efeitos esses decorrentes da interação das substâncias presentes na amostra com a estrutura do fuso mitótico (SOUZA, 2005; LEME; MARIN-MORALES, 2009; MARTINS, 2015).

Com relação ao parâmetro de genotoxicidade em T0 (Tabela 2), foram encontrados resultados estatisticamente significativos, em relação ao CN, para LA bruto, demonstrando que esse lodo apresenta substâncias capazes de induzir AC e alterações nucleares (AN) em células meristemáticas de *A. cepa*. Contudo, foi observado também que, quando o LA é associado a S, ele tem seu potencial tóxico atenuado, provavelmente devido a diluição dos seus compostos tóxicos. De acordo com Bitencourt (2016), o LA possui alguns componentes metálicos tóxicos que, se presentes em grande quantidade, podem inviabilizar a aplicação desse resíduo na agricultura. Dessa forma, os resultados referentes a genotoxicidade do presente estudo podem ser decorrentes da presença de alguns metais potencialmente tóxicos na amostra de LA. Bitencourt (2016) afirma, ainda, que o LA sem tratamento prévio, não possui características apropriadas para ser aplicado ao solo, pois apresentam baixa relação carbono/nitrogênio. Para melhorar, então, as condições de aplicabilidade do LA ao solo, a autora associou bagaço de cana de açúcar ao LA e também adicionou a esta mistura alguns fungos, com o intuito de magnificar a biorremediação do LA. Como os resultados obtidos, após esse procedimento, foram satisfatórios, a autora propôs essa composição de LA com agentes estimulantes e descompactantes para ser aplicada em cultivo de milho.

Ferreira et al. (2017) utilizaram o capim tifton (*Cynodon* spp. Cv) para avaliar o potencial agrônomo do LA, utilizando diferentes concentrações do mesmo, combinado com latossolo vermelho-amarelo. As análises químicas apresentadas pelos autores, mostraram que todas as amostras com LA apresentaram um aumento nas quantidades dos metais níquel e cádmio, ultrapassando os limites permitidos pela resolução CONAMA 375/06. Os autores também observaram que o capim tifton apresentou baixa produtividade e sintomas de toxicidade, que eles atribuíram a presença de grande quantidade de ferro e manganês. Com esse estudo, foi possível demonstrar que o LA pode apresentar substâncias tóxicas para as plantas, se não passar por tratamento prévio de detoxificação.

Os resultados de genotoxicidade obtidos no presente estudo mostraram que em T1, todos os tratamentos (LA, LE, LA+S, LE+S, LE+LA, LE+LA+S) foram considerados genotóxicos, em relação ao CN, pois todos eles apresentaram uma média de genotoxicidade muito próxima entre si, o que indica que não houve diferenças significativas de toxicidade entre os tratamentos propostos neste estudo. É possível que o tempo requerido para a detoxificação dos compostos presentes no material avaliado seja maior que 6 meses, ou ainda, que as proporções de LE+LA não sejam indicadas para o período de detoxificação proposto (por 6 meses).

As alterações genotóxicas observadas neste estudo, para todos os tratamentos estão apresentados na tabela 2. Em T0, apenas LA apresentou uma aberração estatisticamente significativa em relação ao CN, sendo célula binucleada (CB). Em T1, a presença de célula binucleada foi significativa para todos os tratamentos. Os resultados de CB, inferem a presença de substâncias aneugênicas nessas amostras, pois o efeito das substâncias se dá nos componentes citoplasmático e não no material genético das células. Os herbicidas, por exemplo, agem inibindo a formação de pequenas vesículas membranosas, necessárias para compor a lamela média e a, consequente citocinese; a cafeína provoca a dissociação dos fragmoplastos (disjunção das vesículas membranosas originadas no complexo de Golgi); e o chumbo afeta a formação dos microtúbulos envolvidos com o fragmoplasto (WIERZBICKA, 1989). As CB ainda podem ser decorrentes da ação de substâncias tóxicas que interferem na polimerização de microfilamentos envolvidos com a organização de microtrabéculas, estruturas responsáveis pela migração intracelular, inclusive das vesículas originadas no Golgi. Com o impedimento do deslocamento dessas vesículas, não é formado o fragmoplasto e,

consequentemente, impede que a citocinese ocorra corretamente, resultando em células binucleadas.

Devido a capacidade de diversas substâncias induzirem aberrações cromossômicas (WIERZBICKA,1989), é necessário a realização de análises químicas complementares aos ensaios biológicos, para que sejam identificados os compostos genotoxicamente ativos presentes nas amostras. Assim, torna-se necessário que, sejam avaliadas quais substâncias estão presentes nos LE e LA, bem como se as quantidades das mesmas se enquadram na resolução CONAMA.

Os contaminantes têm capacidade de causar danos genéticos mesmo em baixas concentrações (MATSUMOTO et al. 2006). Desta forma, é necessário, além de verificar quais contaminantes estão presentes nas amostras estudadas, saber quais as concentrações dos mesmos, pois esses dados podem subsidiar as interpretações dos ensaios biológicos. De acordo com Bonomo (2014), mesmo quando o LE bruto apresentou parâmetros dentro dos limites da legislação, foi observado que tratamentos realizados com maior quantidade de LE induziu aberrações nas células de *A. cepa*. Esses resultados inferem que ambas análises (químicas e biológicas) são importantes para a avaliação da qualidade dos lodos e, consequentemente, para a utilização segura destes resíduos.

Tabela 1: Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade observadas em células meristemáticas de *A. cepa* submetidas à germinação em amostras de lodos e suas misturas antes (T0) e após o processo de biorremediação (T1).

Amostras	Citotoxicidade		Genotoxicidade		Mutagenicidade	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1
CN	39,42 ± 12,2	43,15 ± 6	0,46 ± 0,72	1,45 ± 1,26	4,57 ± 2,8	4,03 ± 2,38
CP	35,00 ± 13,4	41,52 ± 9	3,42 ± 2,3*	12,23 ± 3,18*	62,65 ± 29,3*	42,74 ± 8,44*
S	37,3 ± 9	38,27 ± 9	0,90 ± 0,76	2,60 ± 1,6	2,60 ± 2,6	4,71 ± 2,73
LA	39,7 ± 7,4	38,06 ± 10,5	3,33 ± 2,8*	6,08 ± 2,8*	0,82 ± 1,2	5,75 ± 3,62
LA+S	38,2 ± 9,4	41,23 ± 8,15	1,64 ± 1,3	6,38 ± 2,2*	1,1 ± 1,7	3,42 ± 1,51
LE	-	37,57 ± 8,92	-	7,68 ± 2,3*	-	3,36 ± 2,68
LE+S	-	43,97 ± 10,93	-	6,23 ± 2,85*	-	3,43 ± 3,91
LE+LA	-	39,54 ± 13,92	-	7,71 ± 2,92*	-	5,33 ± 3,29
LE+LA+S	33 ± 8,7	52,29 ± 8,19	1,77 ± 2	7,95 ± 2,44*	4,6 ± 7,94	4,51 ± 2,65

*Estatisticamente significativo ($p < 0,05$). CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; S: Solo; LA: Lodo de ETA; LE: Lodo de ETE; -: parâmetros não avaliados devido a inibição da germinação para esses tratamentos. Fonte: Elaborado pela autora.

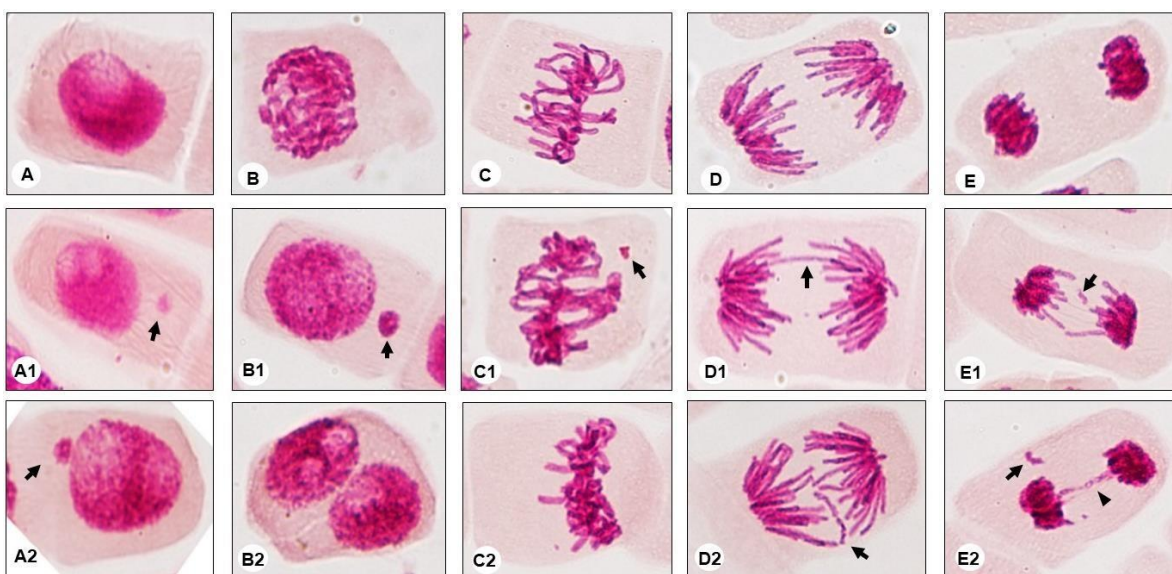
Tabela 2: Aberrações cromossômicas e alterações nucleares observadas em células meristemáticas de *A. cepa* submetidas à germinação em amostras com LE, LA, S e suas misturas em T0 e T1.

Alterações	Tempo	CN	CP	S	LA	LA+S	LE	LE+S	LE+LA	LE+LA+S
BN	T0	0,151 ± 0,35	1,193 ± 1,09	0,150 ± 0,35	0,351 ± 0,67	0,450 ± 0,62	-	-	-	1,441 ± 1,75
	T1	0,795 ± 0,75	7,878 ± 2,76	2,00 ± 1,52	2,229 ± 1,84	1,495 ± 0,88	1,050 ± 0,87	0,813 ± 1,17	1,092 ± 1,36	1,091 ± 1,12
AC	T0	0,074 ± 0,25	0	0	0	0	-	-	-	0
	T1	0	0	0	0,529 ± 0,83	0,146 ± 0,34	0,356 ± 0,56	0	0	0
PoC	T0	0	0,950 ± 1,35*	0,143 ± 0,49	0,141 ± 0,33	0	-	-	-	0
	T1	0,291 ± 0,58	1,087 ± 1,08	0	0,224 ± 0,40	0	0	0,282 ± 0,65	0,074 ± 0,25	0,072 ± 0,25
PeC	T0	0,231 ± 0,41	1,033 ± 1,39*	0,077 ± 0,26	0	0	-	-	-	0,163 ± 0,38
	T1	0,294 ± 0,43	2,397 ± 1,90	0,442 ± 0,58	0,222 ± 0,40	0,219 ± 0,39	0	0,301 ± 0,60	0,240 ± 0,6	0,227 ± 0,41
CB	T0	0	0,239 ± 0,43	0,531 ± 0,71	2,838 ± 2,71*	1,195 ± 1,31	-	-	-	0,159 ± 0,37
	T1	0,074 ± 0,25	0,868 ± 1,13*	0,150 ± 0,35	2,872 ± 2,93*	4,516 ± 1,62*	6,127 ± 1,27*	4,631 ± 2,50*	6,301 ± 1,77*	6,557 ± 2,44*
CP	T0	0	0	0	0	0	-	-	-	0
	T1	0	0	0	0	0	0,069 ± 0,23	0,137 ± 0,32	0	0
PoC e PeC	T0	0	0	0	0	0	-	-	-	0
	T1	0	0	0	0	0	0,082 ± 0,28	0,073 ± 0,25	0	0

*Estatisticamente significativo ($p < 0,05$). CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; S: Solo; LA: Lodo de ETA; LE: Lodo de ETE; -: parâmetros não avaliados devido a inibição da germinação para esses tratamentos. BN: Broto Nuclear; AC: Aderência Cromossômica; PoC: Ponte Cromossômica; PeC: Perda Cromossômica; CB: Célula Binucleada; CP: Célula Poliplóide. Fonte: Elaborado pela autora.

Ainda que as análises químicas representam uma importante ferramenta para avaliar a toxicidade, os bioensaios são fundamentais para se avaliar, de forma mais efetiva, os efeitos de misturas complexas (WANG et al., 2003). Assim, os ensaios de aberrações cromossômicas (AC) e de anormalidades nucleares, além de evidenciar os efeitos genotóxicos de agentes presentes em amostras ambientais e a eficiência de tratamentos de biorremediação, também permitem inferir o modo de ação desses agentes sobre a célula. Na figura 5 estão apresentadas as células de *A. cepa* em diferentes fases do ciclo celular, com e sem AC, onde apenas as células binucleadas foram estatisticamente significativas, em relação ao CN.

Figura 5: Aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição das sementes à germinação em amostras de Lodos de ETA (LA) e ETE (LE) e em associação da mistura de LA e LE com solo.



A: Interfase normal; A1: Interfase com micronúcleo (seta); A2: Interfase com broto (seta); B: Prófase normal; B1: Prófase com micronúcleo (seta); B2: Célula binucleada; C: Metáfase normal; C1: Metáfase com quebra cromossômica (seta); C2: Metáfase com aderência cromossômica; D: Anáfase normal; D1: Anáfase com ponte cromossômica (seta); D2: Anáfase com perda cromossômica (seta); E: Telófase normal; E1: Telófase com quebra cromossômica (seta); E2: Telófase com quebra cromossômica (seta) e ponte cromossômica (cabeça de seta).

Para o parâmetro de mutagenicidade (presença de MN e de quebras cromossômicas), não houve resultados estatisticamente significativos, para nenhuma das amostras testadas neste estudo, em relação ao CN.

5. CONCLUSÃO

A partir desses resultados, pode-se concluir que as amostras testadas de LA e LE e das associações de ambos com solo não são indicadas para utilização na agricultura, já que foi observado um alto potencial genotóxico das mesmas.

O período de biorremediação avaliado (6 meses) não foi suficiente para a detoxificação completa dos lodos.

Dessa forma, são necessários outros estudos que utilizem maiores tempos de biorremediação ou que avaliem a eficiência da incorporação de outros compostos, como agentes estimulantes ou descompactantes, ao LA e LE que permitam uma degradação segura para a reciclagem desses resíduos.

Pelos dados deste e de outros estudos realizados com LE, é de suma importância a reavaliação das quantidades permitidas na legislação para as substâncias presentes em LEs; dos efeitos biológicos que as substâncias presentes nestes resíduos possam causar em sinergia; bem como estudos das características do solo onde os lodos serão dispostos. Só assim teremos a possibilidade de aplicação segura desses resíduos na agricultura.

Referências bibliográficas

Alleman, J. E.; Berman, N. A. Constructive sludge management: biobrick. Journal of Environmental Engineering, Nova York, v.110, n.2, 301-311, 1984.

Andrade, C. F.; Silva, C. M.; Oliveira, F. Gestão ambiental de saneamento: uma revisão das alternativas para tratamento e disposição do lodo de ETA e seus impactos na qualidade das águas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL, 5., 2014, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: IBEAS, 2014, p. 1-11.

Babatunde, A.O.; Zhao,Y.Q. Constructive approach towards water treatment works sludge management: an international review of beneficial reuses, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, v. 37, n. 2, 129-164, 2007.

Belhaj, D.; Athmouni, K.; Jerbi, B.; Kallel, M.; Ayadi, H.; Zhou, J. L. Estrogenic compounds in Tunisian urban sewage treatment plant: occurrence, removal and ecotoxicological impact of sewage discharge and sludge disposal. Ecotoxicology, Londres, v.25, n.10, 1849-1857, 2016.

Berticelli, R.; Decesaro, A.; Magro, F.; Colla, L. M. Compostagem como alternativa de biorremediação de áreas contaminadas. Revista CIATEC-UPF, v. 8, n. 1, 12-28, 2016.

Bitencourt, G. A. Caracterização ecotoxicológica de lodo gerado em estação de tratamento de água. 2016. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

Bonomo, M. M.; Efeitos citogenéticos, bioquímicos, morfológicos e anatômicos da aplicação de lodo de esgoto higienizado em caricapapaya l. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

Cesar, R.; Alvaro, T.; Silva, M.; Colonese, J.; Pereira, C.; Polivanov, H.; Egler, S.; Bidone, E.; Castilhos, Z. Biodisponibilidade de contaminantes em solos brasileiros tratados com lodo de esgoto: uma abordagem ecotoxicológica utilizando bioensaios com organismos aquáticos e edáficos. Geochimica Brasiliensis, Rio de Janeiro, v.24, n.1, 2012.

Chao, I. R. S. Remoção de fósforo de efluentes de estações de tratamento biológico de esgotos utilizando lodo de estação de tratamento de água. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Dores-Silva, P. R.; Landgraf, M. D.; Rezende, M. O. O. Bioensaios para avaliação da toxicidade aguda, reprodução e ganho de biomassa de minhocas (*Eisenia fetida*) ambientadas em lodo de esgoto doméstico. Ecotoxicology and Environmental Contamination, [S.l.], v.8, n.1, 143-146, 2013.

Ferreira, A. C. S.; Silva, J. B.G.; Pereira, R. O.; Oliveira, A. P. S. Avaliação do desenvolvimento do capim Tifton cultivado em latossolo adubado com lodo de ETA. Revista Internacional de Ciências, v.7, n.1, 64-83, 2017.

Geanezini, A. U. Avaliação do tratamento de lodo contaminado por processos de Biorremediação e oxidativo avançado Fenton. 2015. 71 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) – Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2015.

Goulart, M. D.; Callisto, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. Revista da FAPAM, [S.I.], v. 2, n.1, 156-164, 2003.

Guerra, R. C.; Angelis, D. Classificação e biodegradação de lodo de estações de tratamento de água para descarte em aterro sanitário. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.72, n.1, 87-91, 2005.

Kapanen, A.; Itävaara, M. Ecotoxicity tests for compost applications. Ecotoxicology and environmental safety, v. 49, n. 1, 1-16, 2001.

Leme, D. M.; Marin-Morales, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, Amsterdã, v.682, n.1, 71-81, 2009.

Manzetti, S.; Spoel, D. V. D. Impact of sludge deposition on biodiversity. Ecotoxicology, [S.I.], v.24, n.9, 1799-1814, 2015.

Martins, M. N. C. Análise do potencial genotóxico e mutagênico de lodo de esgoto em *Allium cepa*. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2015.

Martins, M. N. C.; de Souza, V. V.; Souza, T. S. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. Chemosphere, Oxford, v.148, 481-486, 2016.

Matsumoto, S. T.; Mantovani, M. S.; Malagutti, M. I. A.; Dias, A. L.; Fonseca, I. C.; Marin-Morales, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. Genetics and Molecular Biology, v. 29, n. 1, 148-158, 2006.

Maziviero, G. T. Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de LE por meio dos sistemas teste *Allium cepa* e *Tradescantia pallida*. 2011. 106 f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

Mazzeo, D. E. C. Avaliação da viabilidade do lodo de esgoto como condicionante de solos agrícolas, após processo de atenuação natural, por meio de diferentes bioensaios. 2013. 221 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

Mazzeo, D. E. C., Casado, M., Piña B. Marin-Morales, M. A. Detoxification of sewage sludge by natural attenuation and implications for its use as a fertilizer on agricultural soils. *Science of the Total Environment*, v. 572, 978-985, 2016. b.

Mazzeo, D. E. C., Fernandes, T. C. C., Marin-Morales, M. A. Attesting the efficiency of monitored natural attenuation in the detoxification of sewage sludge by means of genotoxic and mutagenic bioassays. *Chemosphere*, v. 163, 508-515, 2016. a

Mazzeo, D. E. C.; Fernandes, T. C. C.; Levy, C. E.; Fontanetti, C. S.; Marin-Morales, M. A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. *Ecological Indicators*, [S.l.], v.56, 60-69, 2015.

Mielli, A. C.; Matta, M. E.; Nersesyan, A.; Saldiva, P.H.N.; Umbuzeiro, G. A. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. *Mutation Research*, Amsterdã, v.672, 51-54, 2009.

Miranda, L. A. S., Monteggi, L. O. Sistemas e processos de tratamento de águas de abastecimento – Guia do profissional em treinamento. Studio S: Diagramação & Arte Visual. Porto Alegre: (S. n.), 2007. 148p.

Neto, F. A. Utilização de lodo de estação de tratamento de água na produção de mudas de árvores com ocorrência no cerrado. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

Oliveira, A. P. S.; Silva, J. B. G.; Pereira, R. O.; Santos, A. S. P. Avaliação dos adubado com lodo de Estação de Tratamento de Água. *Revista Internacional de Ciências*, v.5, n.2, 29-47, 2015.

Paixão, L.; Yoshimura, H.; Espinosa, D. C. R.; Tenório, J. A. S. Efeito da incorporação de lodo de ETA contendo alto teor de ferro em cerâmica argilosa (Effect of addition of high iron content sludge from water treatment plant on a clay-based ceramic). *Cerâmica*, [S.l.], v.54, 63-76, 2008.

Pedroza, M. M.; Vieira, G. E. G.; Sousa, J. F.; Pickler, A. C.; Leal, E. R. M.; Milhomen, C. C. Produção e tratamento de lodo de esgoto – uma revisão. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, v. 11, p. 147, 2010.

Pereira, M. S.; Kuch, B. Heavy metals, PCDD/F and PCB in sewage sludge samples from two wastewater treatment facilities in Rio de Janeiro State, Brazil. *Chemosphere*, Oxford, v.60, n.7, 844-853, 2005.

Portella, K. F.; Andreoli, C. V.; Hoppen, C.; Sales, A.; Baron, O. Caracterização físico-química do lodo centrifugado da estação de tratamento de água Passaúna–Curitiba–PR. In CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA AMBIENTAL, 22, 2003, Curitiba. Anais... Curitiba: SANEPAR, 2003. 10 p.

Queiroz, R. R. Pesquisa e desenvolvimento do potencial de uso agrícola de lodos de estações de tratamento de água e esgoto da CORSAN. 2016. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônoma) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

Rank, J.; Nielsen, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Amsterdã, v.418, n.2, 113-119, 1998.

Razali, M.; Zhao, Y. Q.; Bruen, M. Effectiveness of a drinking-water treatment sludge in removing different phosphorus species from aqueous solution. Separation and Purification Technology, [S.I.], v.55, n.3, 300-306, 2007.

Silva, F. C.; Boareto, A. E.; Berton, R.; Bazaglia, H.; Pexe, C. A.; Mendonça, E. Efeito de lodo de esgoto na fertilidade de um Argissolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-açúcar. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.35, n.5, 831-840, 2001.

Singh, R. P.; Agrawal, M. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. Waste management, Reino Unido, v.28, n.2, 347-358, 2008.

Sommaggio, L. R. D. Avaliação da atenuação da toxicidade de lodo de esgoto por associação com resíduo vegetal da indústria sucro-alcooleira. 2013. 56f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

Sommaggio, L. R. D. Avaliação da possibilidade de detoxificação e utilização agrícola de lodo de esgoto, após bioestimulação, por meio de diferentes bioensaios. 2016. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2016.

Sosnowski, P.; Wieczorek, A.; Ledakowicz, S. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes. Advances in Environmental Research, Estados Unidos, v.7, n.3, 609-616, 2003.

Souza, T. S. Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo, utilizando *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) como organismo-teste. 2005.108f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

Srivastava, R.; Kumar, D.; Gupta, S.K. Bioremediation of municipal sludge by vermitechnology and toxicity assessment by *Allium cepa*. Bioresource Technology, Holanda, v.96, n.17, 1867-1871, 2005.

Sterritt, R. M.; Lester, J. N. The value of sewage sludge to agriculture and effects of the agricultural use of sludges contaminated with toxic elements: a review. Science of the Total Environment, Holanda, v.16, n.1, 55-90, 1980.

Wagner, L. F.; Pedroso, K. Disposição de resíduos das estações de tratamento de água. Revista TechnoEng, v. 1, n. 9, 2014.

Wang, Chunxia et al. Ecotoxicological and chemical characterization of selected treatment process effluents of municipal sewage treatment plant. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 56, n. 2, 211-217, 2003.

Wierzbicka, M. Disturbances in cytokinesis caused by inorganic lead. Environmental and experimental botany, v. 29, n. 2, p. 123-133, 1989.

Zagatto, P. A.; Bertoletti, E. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006. 478p.