UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO LODO DE ESGOTO COMO RECONDICIONANTE DE SOLOS AGRÍCOLAS, APÓS PROCESSO DE ATENUAÇÃO NATURAL, POR MEIO DE DIFERENTES BIOENSAIOS

DÂNIA ELISA CHRISTOFOLETTI MAZZEO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Setembro - 2013

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO LODO DE ESGOTO COMO RECONDICIONANTE DE SOLOS AGRÍCOLAS, APÓS PROCESSO DE ATENUAÇÃO NATURAL, POR MEIO DE DIFERENTES BIOENSAIOS

DÂNIA ELISA CHRISTOFOLETTI MAZZEO

Orientadora: Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofoletti

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro

Setembro/2013

628.2 Mazzeo, Dânia Elisa Christofoletti
M477a Avaliação da viabilidade do lodo de esgoto como recondicionante de solos agrícolas, após processo de atenuação natural, por meio de diferentes bioensaios / Dânia Elisa Christofoletti Mazzeo. - Rio Claro, 2013
221 f. : il., figs., gráfs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofoletti

1. Esgotos. 2. Ecotoxicologia. 3. Uso sustentável. 4. Esgoto doméstico. 5. Toxicidade. 6. Genotoxicidade. 7. Mutagenicidade. 8. Estrogenicidade. I. Título.

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

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE RIO CLARO

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Avaliação da viabilidade do lodo de esgoto como recondicionante de solos agrícolas, após processo de atenuação natural, por meio de diferentes bioensaios

AUTORA: DÂNIA ELISA CHRISTOFOLETTI MAZZEO

ORIENTADORA: Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Profa. Dra. VERA MARIA FERRÃO VARGAS
Fundação de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler - Diretoria Técnica do Programa de Pesquisas Ambientais

Profa. Dra. MARY ROSA RODRIGUES DE MARCHI
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química de Araraquara

Prof. Dr. CESAR KOPPE GRISOLIA
Departamento de Genética e Morfologia, Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade de Brasília

Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS
Departamento de Bioquimica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Data da realização: 10 de setembro de 2013.

Dedico este trabalho a minha querida e estimada família e, em especial, ao meu marido Eduardo.

“Na vida, nada deve ser temido, somente compreendido.”
(Marie Curie)

AGRADECIMENTOS

A realização e a finalização deste trabalho só foi possível porque ao longo desses anos de doutorado tive a sorte e o prazer de contar com um grande número de amigos, profissionais e familiares que se dispuseram a me ajudar e que contribuíram de forma incomensurável para a construção deste trabalho. Considero essa tese, fruto de um trabalho coletivo e, por isso, expresso meus sinceros agradecimentos:

Aos meus queridos pais, Vânia e Junior, por me proporcionarem a educação que nenhuma escola pode ensinar, aquela que é construída no seio da família, pelo convívio diário. Obrigada por estarem sempre presentes, compartilhando, com muito amor, todas as etapas de minha vida.

À minha irmãzinha Bruna que me surpreende a cada dia com suas conquistas as quais me fizeram enxergar que tudo é possível quando se tem determinação. Também quero agradecer pelo auxílio nas últimas etapas do trabalho.

Aos meus avós paternos, vó Nena e vô Mingo, pelos ensinamentos deixados.

Aos meus queridos avós Cecília e Nelson por todos os conselhos, lições de vida, mimos e pela grande torcida para a minha realização profissional e pessoal.

Ao Eduardo, que esteve presente, me ajudando, durante todo o desenvolvimento desse projeto, até mesmo nas etapas mais desagradáveis de mistura do lodo devido ao odor desagradável. Obrigada pela força, pelo incentivo, pelas sugestões, pela companhia nas noites que foram necessárias ficar até tarde no laboratório, pela compreensão, por integralmente me ajudar na maioria dos testes e na confecção da tese e, principalmente, por sempre estar ao meu lado, sendo uma pessoa divertida e positiva, que faz com que eu me sinta amada, completa e feliz.

Ao meu sogro Norberto, que além das orientações valiosas durante o desenvolvimento deste trabalho, devido à sua grande experiência acadêmica, também contribuiu para a confecção dos recipientes utilizados nos ensaios com *E. andrei*.

Ao Instituto de Biociências da UNESP por fornecer toda a infraestrutura necessária para este trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado concedida.

À empresa Foz de Rio Claro pelo fornecimento do lodo de esgoto utilizado neste trabalho e pela realização das análises químicas. Em especial, aos funcionários, André e a Amanda que me deram todo o suporte necessário.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales, um exemplo de pesquisadora que vê em cada descoberta ou dificuldade uma oportunidade para seguir adiante. Por ser uma pessoa tão carismática, ativa e de bem com a vida, que possui uma capacidade única de motivar quem está ao seu redor, com a qual eu tenho a honra de conviver, tanto no trabalho, como na vida pessoal. Agradeço sinceramente por todo o tempo dedicado a esse trabalho, pelos valiosos conhecimentos repassados, pela paciência, confiança e por acreditar em mim e no meu trabalho.

À Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofoletti a qual sou extremamente grata por ter aceito me orientar. Agradeço pela confiança, sugestões e incentivo.

À Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis por estar sempre pronta a ajudar, por sempre contribuir com novas ideias e sugestões para a melhoria do trabalho e por ser uma grande incentivadora das nossas pesquisas na área de mutagênese ambiental.

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

À Profa. Maria Izabel Camargo Mathias que muito contribuiu para a realização dos testes histológicos com *E. andrei*.

À Profa. Vera Maria Ferrão Vargas pela disposição em me receber em seu laboratório para aprendizagem do teste de Kado e a Roberta Pohren pela prontidão em me ensinar.

Ao Prof. Dr. Marcos Aparecido Pizzano que forneceu os espécimes de minhoca utilizados neste trabalho, bem como disponibilizou toda a infraestrutura de seu laboratório para a realização dos ensaios com esses organismos.

Ao Dr. Benjamin Piña do IDAEA/CSIC por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório e pela possibilidade do desenvolvimento dos ensaios com leveduras recombinantes e com embriões de zebrafish, que foram de fundamental importância para o enriquecimento desse trabalho. Também agradeço a todo o pessoal de seu laboratório pela ajuda com os experimentos, em especial à Marta Casado, Eva Prats, Sofia Mesquita e Eva Oliveira.

Ao João Covre, jardineiro da UNESP, que foi a pessoa responsável pela coleta do solo e confecção das covas no Jardim Experimental para realização da biorremediação.

Ao Rafa e à Izabela pelo auxílio com os cortes histológicos.

À minha amiga Marcela Nering pelos inúmeros artigos do PubMed baixados, os quais eu não tinha acesso, mas que foram de extrema importância para a discussão deste trabalho.

À Jaque Bianchi e a Dani pelo auxílio com os testes com cultura de células e, especialmente, com o Ames.

À Thais, pela parceria de longa data e pela ajuda de fundamental importância no ensaios com minhoca e com o teste de Kado. Obrigada por estar sempre tão pronta a me ajudar.

À Paula por me ensinar os procedimentos para obtenção do extrato orgânico e pelo auxílio com as traduções e correções dos textos em inglês.

À Márcia e à Raquel por terem me ajudado em diversas etapas dessa pesquisa.

Ao Matheus, que mesmo estando muito atarefado, me ajudou com o esquema histológico, e também pela paciência em relação às minhas inúmeras dúvidas de informática.

A Lais, minha co-orientada, que além de me ajudar nos ensaios, permitiu também minha primeira experiência como orientadora, com quem eu mais aprendi do que ensinei.

A todos os meus companheiros do laboratório de Mutagênese Ambiental (Thais, Paula, Bruna, Márcia, Roberta, Cintya, Janaína, Matheus, Yaliana, Maria Tereza, Raquel, Leonardo, Lívia, Jaque Oliveira, Carol, Cristiane, Nádia, Lais, Verônica, Michele, Franco), que além do convívio diário, muitas vezes também me auxiliaram na realização dos experimentos.

Aos funcionários, professores e alunos do Departamento de Biologia, por proporcionarem um ambiente de trabalho alegre e prazeroso. Em especial ao Gerson, a Mônica e a Cris, sempre muito prestativos.

RESUMO

O mau gerenciamento das atividades humanas tem provocado graves impactos aos ecossistemas, comprometendo seriamente a qualidade e a manutenção das condições ambientais. Devido a intensa e crescente produção mundial de lodo de esgoto (LE), a disposição final deste resíduo vem sendo considerada um dos principais problemas ambientais. Uma alternativa mais sustentável para a destinação do LE é a sua aplicação na agricultura como recondicionante de solo, uma vez que este contém altas concentrações de matéria orgânica, além de outros nutrientes. Porém, a presença de substâncias tóxicas no LE (metais pesados, hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos) pode inviabilizar este uso, pois existe a possibilidade destes contaminantes serem incorporados aos solos receptores, prejudicando a biota associada, bem como a saúde humana. Além disso, a possível lixiviação de substâncias tóxicas pode comprometer as águas subterrâneas e superficiais próximas da área de disposição do LE. O uso de uma bateria de bioensaios, realizados com organismos que ocupem diferentes níveis tróficos e capazes de avaliar diferentes parâmetros, é indicado para predizer os perigos da introdução de novas substâncias no ambiente. O processo de atenuação natural parece constituir uma metodologia promissora para a diminuição da toxicidade de LE. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a efetividade do processo de atenuação natural monitorada de um LE de origem doméstica, por meio de ensaios ecotoxicológicos, realizados com diferentes sistemas-teste. Foi avaliado neste estudo o potencial tóxico, citotóxico, genotóxico, mutagênico e estrogênico do LE puro e de associações de solo/LE (proporções de 10, 25 e 50% de LE), bem como de seus extratos aquoso e orgânico, após 0, 2, 6 e 12 meses de biorremediação. A avaliação do potencial mutagênico, utilizando *Salmonella typhimurium,* indicou uma resposta positiva somente para a linhagem TA 100, na presença de fração metabólica, para os extratos aquosos de LE 100%, nos períodos de 0 e 6 meses. O ensaio com leveduras recombinantes, detectoras de compostos com atividade estrogênica, revelou valores baixos de estrogenicidade para os extratos aquosos nos tempos 0 e 2 meses. Nas demais amostras avaliadas (6 e 12 meses), não foi detectada nenhuma resposta estrogênica. Pelos testes com RYA-YCM (usadas para a avalição da presença no ambiente de substâncias da família química das dioxinas), as respostas foram mais altas para o extrato orgânico, permanecendo elevadas durante os 3 primeiros tempos testados, embora uma atividade significativa também tenha sido observada para o extrato aquoso, nos 2 primeiros períodos testados (0 e 2 meses). Foram observadas alterações genotóxicas significativas (aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares) em células meristemáticas de *Allium cepa* para as associações de 10, 25 e 50% de LE, para os tempos 0 e 2 meses e para 25 e 50% de LE no tempo de 6 meses, tanto para as amostras brutas como para o extrato aquoso. Esse mesmo efeito foi observado para o LE 100%

bruto no tempo de 6 meses, com a manutenção desse efeito no tempo de 12 meses para o extrato aquoso. Foi observada a presença significativa de MN em *A. cepa* nas amostras de 25 e 50% de LE e em seus respectivos extratos, no período de 2 meses; na amostra de 100% no período de 6 meses e para os correspondentes extratos aquosos nos períodos de 6 e 12 meses, indicando que o extrato aquoso apresenta um maior potencial em induzir danos genéticos à espécie *A. cepa*. Os ensaios realizados com *Eisenia andrei* mostraram toxicidade para as amostras de LE 50 e 100% no primeiro período testado e para a amostra de 100% no tempo de 2 meses. As alterações histopatológicas mais frequentemente encontradas no intestino de *E. andrei,* para todos os tratamentos avaliados, foram espessamento do epitélio, vacuolização citoplasmática e núcleo picnótico nas células epiteliais e cloragógenas. Pelos ensaios embriotóxicos com *Danio rerio*, foi observada uma maior toxicidade para o extrato orgânico no tempo 0, que apresentou menor atividade após 2 meses. Para o extrato aquoso, apesar de ter sido observada uma menor toxicidade, o efeito persistiu até os 6 meses. No entanto, um efeito mais pronunciado foi observado para o extrato orgânico, em relação a um aumento na expressão do CYP1A para esse organismo. Em relação aos resultados obtidos com o teste do micronúcleo em cultura de células, foi possível observar que, somente as amostras de extrato aquoso do tempo 0 e de 2 meses, para todas as concentrações testadas, induziram um efeito mutagênico significativo em HepG2 (exceção da concentração 10%, na amostra de 2 meses). A partir desses resultados, foi possível observar que o LE nos dois primeiros períodos (0 e 2 meses) causa efeitos significativos na maioria dos organismos utilizados, mesmo quando associado ao solo. No entanto, uma diminuição dessas respostas pode ser observada para o período de 6 meses de atenuação natural, principalmente, na indução de MN em células HepG2. Para os demais ensaios, uma diminuição mais pronunciada da toxicidade foi observada somente após 12 meses de atenuação natural, indicando a eficiência do processo na detoxificação de LE. Além disso, a associação de solo ao LE contribui para uma maior rapidez da degradação dos compostos tóxicos presentes no LE. A presença de *m*- e *p*-cresol, detectados nas análises químicas, bem como de dioxinas e furanos, parecem não justificar todos as respostas biológicas observadas, indicando que outros compostos não identificados podem estar presentes no LE estudado, assim como pode estar ocorrendo uma interação entre os contaminantes do LE. Portanto, os resultados obtidos sugerem cautela na utilização agrícola do LE, bem como alertam para a necessidade de um pré-processamento do LE, antes que este possa ser utilizado como recondicionante de solo na agricultura.

Palavras-chave: toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, estrogenicidade, histopatogenicidade e esgoto doméstico.

ABSTRACT

Inappropriate management of human activities has been inducing serious damages to the ecosystems, significantly affecting the quality and maintenance of environmental conditions. Due to the intense and increasing world production of sewage sludge (SS), the final disposal of this waste has been considered one of the main environmental problems. A more sustainable alternative to the destination of SS is its application in agriculture as soil reconditioner, since it contains high concentration of organic matter, besides other nutrients. However, the presence of toxic substances in SS (heavy metals, hydrocarbons and other organic compounds) can derail this use because such contaminants can be incorporated into soils receptors, damaging the associated biota, as well as, the human health. Moreover, the possible leaching of toxic substances can contaminate groundwater and surface waters close to the area where SS is disposal. The use of a battery of bioassays, carried out with organisms from different trophic levels and capable of evaluating several endpoints is indicated to predict the hazard of introducing new substances into the environment. The natural attenuation process seems to be a promising tool to decrease the SS toxicity. The present work aimed at evaluate the effectiveness of monitored natural attenuation process of a domestic SS by means of ecotoxicological assays, performed with different test systems. In this study, the toxic, cytotoxic, genotoxic, mutagenic and estrogenic potential of the crude SS and soil/SS associations (proportions of 10, 25 and 50% SS) was assessed, as well as their aqueous and organic extracts, after different periods of bioremediation. Evaluation of the mutagenic potential using *Salmonella typhimurium*, showed a positive response only for strain TA 100 in the presence of metabolic fraction, for aqueous extracts of SS 100% in the periods of 0 and 6 months. The recombinant yeast assay (ER-RYA), which is able to detect estrogenic compounds, exhibited low values of estrogenicity for the aqueous extracts at 0 and 2 months. In the other tested samples (6 and 12 months) no estrogenic response was detected. By YCM-RYA tests (used for the evaluation of the presence dioxin-like compounds), the responses were higher for the organic extract, remaining elevated during the first 3 periods tested, although significant activity has also been observed for the aqueous extract, during the first 2 periods tested (0 and 2 months). Significant genotoxic alterations (chromosomal aberrations and nuclear abnormalities) were observed in meristematic cells of *Allium cepa* after exposure to 10, 25 and 50% SS associations for the periods 0 and 2 months and to 25 and 50% SS for 6 months, for both crude samples and aqueous extract. This same effect was observed for 100% crude SS for the period 6 months, with the maintenance of this effect in the period of 12

months for the aqueous extract. A significant presence of MN in *A. cepa* was observed for the 25 and 50% SS samples and their extracts, in the period of 2 months; for 100% SS sample for 6 months and for the corresponding aqueous extract in the periods of 6 and 12 months, indicating that the aqueous extract presents a major potential to induce genetic damage to *A. cepa*. Tests performed with *Eisenia andrei* showed toxicity to 50% and 100% SS samples in the first period and for the 100% sample for the period 2 months. Most frequently histopathological alterations found in the *E. andrei* intestine, for all treatments, were vacuolated cells, thickening of epithelium and pyknotic nucleus. Higher toxicity to the organic extract at time zero was observed in embryotoxicity assays with *Danio rerio*, which showed a reduced activity already after 2 months. For the aqueous extract, despite its lower toxicity, the effect persisted up to 6 months. However, a more pronounced effect was observed for the organic extract in the expression of CYP1A for this organism. Regarding the results obtained with the micronucleus test in cultured cells, only samples of aqueous extract of 0 and 2 months, at all concentrations tested, induced a significant mutagenic effect in HepG2 (except for 10% concentration in the period 2 months). From these results, it was observed that the SS in the first two periods (0 and 2 months) induces significant effects in most tested organisms, even when associated to soil. However, a decreased of these responses may already be observed for 6 months of natural attenuation, particularly in the MN induction in HepG2 cells. For the other assays, a more pronounced toxicity reduction was observed only after 12 months of natural attenuation, indicating that this process is quite efficient in the detoxification of SS. Moreover, the association between SS and soil contributes to a faster degradation of toxic compounds present in the SS. The presence of *m*- and *p*-cresol, detected in chemical analyzes, in addition to dioxins and furans, do not seem to justify all of the observed biological responses, indicating that other unidentified compounds may be present in the studied SS, as well as, an interaction between the SS contaminants may be occurring. Thus, the obtained results suggest caution in the agricultural use of SS, and alert to the necessity of a pre-treatment of SS, before its use in agriculture as a soil reconditioner.

Keywords: toxicity, cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, estrogenicity, histopathogenicity and domestic wastewater.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Atenuação Natural do LE.....	45
Figura 2	Aspecto físico do lodo de esgoto (LE), após diferentes períodos de atenuação natural.....	63
Figura 3	Solubilizados de solo referência, associações solo/LE (10%, 25% e 50% de LE) e LE 100% obtidos após diferentes períodos de atenuação natural.....	64
Figura 4	Variação na germinação e no crescimento das raízes de sementes de *A. cepa* expostas à diferentes concentrações de LE, após os períodos de 0, 2, 6 e 12 meses de atenuação natural.....	66
Artigo 2		
Figura 1	Sucessão microbiológica observada no processo de atenuação natural monitorada do LE.....	127
Figura 2	Células meristemáticas de *Allium cepa*.....	130
Artigo 3		
Figura 1	Comparação entre o efeito dose-resposta das diferentes amostras de LE observado para a linhagem TA 100, na presença de fração metabolizadora.....	151
Figura 2	Imagens de células HepG2 – teste do MN.....	152
Figura 3	Comparação entre o valor médio de micronúcleos (MN) presentes em células HepG2, expostas a diferentes concentrações de LE, antes e após processo de atenuação natural.....	152
Artigo 4		
Figura 1	Sequência do desenvolvimento de *D. rerio*, nas primeiras 72 horas.....	173
Figura 2	Alterações observadas em embriões de *D. rerio* após exposição a extratos aquosos de LE, a m-cresol e a p-cresol.....	173
Artigo 5		
Figura 1	Taxa de sobrevivência da espécie *E. andrei* após exposição à diferentes concentrações de LE, nos períodos de 0, 2, 6 e 12 meses de atenuação natural.....	193
Figura 2	Espécimes de *E. andrei* expostos ao LE 100%, após 0 e 2 meses de atenuação natural.....	194
Figura 3	Representação esquemática de secções histológicas e histoquímicas do intestino de *E. andrei*.....	195

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Média e desvio padrão do peso seco do solo, do lodo de esgoto (LE) e das diferentes associações de solo/LE..... 62

Tabela 2 Média e desvio padrão da capacidade de campo do solo, do LE e das diferentes associações de solo/LE..... 63

Tabela 3 Quantidade de matéria orgânica e condutividade elétrica do solo referência..... 64

Tabela 4 Análise granulométrica do solo referência..... 65

Tabela 5 Resultados do teste de mutagenicidade com as linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium* com as diferentes doses do extrato orgânico do LE inicial (tempo 0)..... 67

Tabela 6 Resultados do teste de mutagenicidade com as linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium* com as diferentes doses do extrato orgânico do LE 100%, após 2 meses de atenuação natural..... 68

Tabela 7 Citotoxicidade do solubilizado do LE 100% em diferentes concentrações em células HepG2..... 69

Artigo 1

Tabela 1 List of the main researches carried out with several endpoints and bioassays to evaluate the efficiency of different bioremediation processes of contaminated soils..... 97

Artigo 2

Tabela 1 Análise granulométrica e condutividade elétrica do solo referência..... 123

Tabela 2 Resultado das análises físico-químicas do solo referência e do LE 100%, após diferentes períodos de atenuação natural monitorada..... 123

Tabela 3 Quantificação de m-, p-cresol no extrato aquoso de LE proveniente de diferentes períodos de atenuação natural monitorada..... 124

Tabela 4 Resultado das análises de dioxinas e furanos do LE 100%, após diferentes períodos de atenuação natural monitorada, expresso em toxicidade equivalente (TEQ), com base nos fatores tóxicos equivalentes (W-TEF) de 2005, estabelecidos pela World Health Organization (WHO)..... 125

Tabela 5 Média e desvio padrão do peso seco do solo, do lodo de esgoto (LE) e das diferentes associações de solo/LE..... 125

Tabela 6 Caracterização dos microrganismos isolados do LE, durante os diferentes períodos de atenuação natural monitorada..... 126

Tabela 7 Presença de alterações em células de *A. cepa* expostas a concentrações de LE bruto após diferentes períodos de atenuação natural..... 128

Tabela 8 Presença de alterações em células de *A. cepa* expostas a concentrações de extratos aquosos de LE (solubilizados) após diferentes períodos de atenuação natural..... 129

Artigo 3

Tabela 1 Caracterização química do solo referência e do LE 100% após diferentes períodos de atenuação natural monitorada..... 148

Tabela 2 Mutagenicidade de extratos aquosos de LE para *Salmonella typhimurium* na presença (+S9) e ausência (-S9) de fração metabólica, após diferentes períodos de biorremediação..... 149

Tabela 3 Citotoxicidade do solubilizado do LE 100% (tempo 0) em diferentes concentrações em células HepG2..... 150

Tabela 4 Média e desvio padrão da presença de micronúcleos (MN) presentes em células HepG2 expostas a diferentes concentrações de LE..... 150

Artigo 4

Tabela 1 Caracterização química do LE, após diferentes períodos de biorremediação..... 171

Tabela 2 Análise da presença de cresol em extratos aquosos de LE proveniente de diferentes períodos de biorremediação..... 172

Tabela 3 Valores da atividade estrogênica (17β-estradiol equivalente) de extratos de lodo esgoto avaliados por ER-RYA..... 172

Tabela 4 Valores da atividade *dioxin-like* (β-naftoflavona equivalente) de extratos de lodo esgoto avaliados por YCM-RYA..... 172

Tabela 5 Efeito embriotóxico observado para o organismo teste *D. rerio* exposto a diferentes extratos de LE..... 174

Tabela 6 Efeito embriotóxico observado para o organismo teste *D. rerio* exposto a diferentes concentrações de m-cresol e p-cresol..... 175

Tabela 7 Indução da expressão de CYP1A no organismo teste *D. rerio*, após exposição ao LE com diferentes períodos de biorremediação..... 175

Artigo 5

Tabela 1 Caracterização química do LE após diferentes períodos de biorremediação..... 192

Tabela 2 Resultado das pesagens com *E. andrei* após 14 dias de exposição a diferentes concentrações do LE, nos períodos de 0, 2, 6 e 12 meses de atenuação natural..... 194

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2AA	2-aminoandraceno
4NQO	Óxido de 4-nitroquinolina
AC	Aberrações cromossômicas
AhR	Receptor Aril hidrocarboneto
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
CAS	Chemical Abstracts Service
CN	Controle Negativo
CO_2	Dióxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP	Controle Positivo
CTC	Capacidade de troca catiônica
CYP	Citocromo P450
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC 50	Concentração efetiva média
EET	Efluente de Esgoto Tratado
ER	Receptor de estrógeno
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
EU	União Européia
GC/MS	Cromatografia Gasosa/ Espectrometria de Massa
HepG2	Célula de Carcinoma Hepatocelular Humano
his	Histidina
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IM	Índice mitótico
km	Quilômetro
LE	Lodo de esgoto
LOEC	Concentração mínima de efeitos observados
M	Molar
m^3	Metros cúbicos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mm de Hg	Milímetros de mercúrio
MMS	Metilmetano Sulfonato
MN	Micronúcleo
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Mugal	4-Metilumbeliferil-galactopiranosil
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nM	Nanomolar
NOEC	Concentração de efeitos não observados

OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCB	Policlorobifenil
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RBC	Red blood cell
RNA	Ácido ribonucléico
RYA	Recombinant Yeast Assay
S9	Fração microssomal
SALANAL	*Salmonella* Assay Analysis
SD	Meio mínimo
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
TNT	Trinitrotolueno
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNEP	United Nations Environmental Program
USEPA	U.S. Environmental Protection Agency
v/v	Volume/volume
WHO	World Health Organization
Y-PER	Yeast protein extraction reagent
YCM	Yeast cell mutation
YPD	Yeast protein database
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO GERAL..... 18
2. OBJETIVOS..... 24
3. REVISÃO DA LITERATURA..... 26
3.1. Produção de LE..... 26
3.2. Dados sobre a produção mundial de LE..... 27
3.3. Possíveis destinos do LE..... 28
3.4. Composição/Características do LE..... 30
3.5. Efeitos positivos da utilização de LE em solos agrícolas..... 30
3.6. Problemas ambientais relacionados com a disposição do lodo em solos agrícolas..... 31
3.7. O emprego de tecnologias para descontaminação do LE..... 33
3.8. O uso de bioensaios para a avaliação do potencial tóxico do LE..... 34
3.8.1. Ensaios com *Salmonella*..... 35
3.8.2. Ensaios com Leveduras Recombinantes (RYA – Recombinant Yeast Assay)..... 36
3.8.3. O uso da espécie *A. cepa* como organismo teste..... 36
3.8.4. O uso da espécie *E. andrei* como organismo teste..... 39
3.8.5. O uso de embriões de *D. rerio* como organismo teste..... 40
3.8.6. Cultura de células de mamíferos como sistema teste..... 41
4. MATERIAL E MÉTODOS..... 43
4.1. Caracterização da área geradora do LE estudado..... 43
4.2. Material estudado..... 43
4.2.1. Biorremediação do LE de esgoto por atenuação natural monitorada..... 44
4.2.2. Cálculo do peso seco..... 45
4.2.3. Cálculo da capacidade de campo..... 46
4.2.4. Preparo das amostras para obtenção dos extratos..... 46
4.2.5. Obtenção do extrato aquoso - solubilizado..... 46
4.2.6. Obtenção de extratos orgânicos - Soxhlet..... 47
4.3. Análise físico-química do LE..... 47

4.4. Caracterização microbiológica do LE..... 48
4.4.1. Diluição, semeadura e identificação de micro-organismos da amostra..... 48
4.4.2. Contagem de micro-organismos das amostras..... 49
4.5. Bioensaios utilizados na avaliação da atividade biológica do LE..... 49
4.5.1. Linhagens de *S. Typhimurium*..... 49
4.5.2. Ensaio *Salmonella*/microssoma – Teste de Ames (Protocolo de Pré-Incubação)..... 49
4.5.3. Ensaio de microssuspensão com *Salmonella* – modificação de Kado..... 51
4.6. Ensaios com Leveduras Recombinantes..... 52
4.6.1. Cepas de Leveduras utilizadas..... 52
4.6.2. Procedimento dos testes de ER-RYA e YCM-RYA..... 52
4.6.2.1. Cálculo de hormônio equivalente..... 53
4.7. Ensaio com sementes de *Allium cepa*..... 53
4.7.1. Testes de Aberrações Cromossômicas e de Micronúcleo em células meristemáticas de *A. cepa*..... 54
4.8. Ensaios com *Eisenia andrei*..... 54
4.8.1. Teste de toxicidade aguda..... 54
4.8.2. Análise histológica do intestino..... 55
4.8.2.1. Inclusão em resina (Historesina)..... 55
4.8.2.1.1. Coloração com Hematoxilina/Eosina..... 56
4.8.2.1.2.Coloração com Azul de Bromofenol..... 56
4.8.2.1.3. Técnica de PAS – Ácido periódico-Schiff..... 56
4.8.2.1.4. Método de von Kossa..... 56
4.9. Ensaios com embriões de *Danio rerio* (zebrafish)..... 56
4.9.1. Manutenção dos peixes..... 56
4.9.2. Postura dos ovos..... 57
4.9.3. Teste de toxicidade com embriões de *D. rerio*..... 57
4.9.4. Ensaio de expressão gênica de CYP1A com embriões de *D. rerio*..... 58
4.9.4.1. Extração de RNA..... 58
4.10. Cultura de células de mamífero..... 58

4.10.1. Avaliação da citotoxicidade – Teste ddo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)..... 59
4.10.2. Teste do micronúcleo em células mantidas em cultura..... 60
5. RESULTADOS..... 61
5.1. Peso seco das amostras..... 61
5.2. Capacidade de campo das amostras..... 62
5.3. Obtenção dos extratos aquosos (solubilizados)..... 63
5.4. Análise granulométrica e caracterização do solo referência..... 64
5.5. Avaliação da ação do LE sobre a germinação de sementes de *A. cepa*..... 65
5.6. Avaliação da mutagenicidade pelo ensaio de *Salmonella*/microssoma – Teste de Ames (Protocolo de Pré-Incubação)..... 66
5.7. Avaliação da ação do LE sobre células HepG2 mantidas em cultura..... 68
5.7.1. Avaliação da ação citotóxica do LE sobre cultura de células..... 68
5.8. Artigos..... 69
Artigo 1. Endpoints and Bioassays to Asses Bioremediation Efficiency of Contaminated Soils……..... 70
Artigo 2. Eficiência da atenuação natural monitorada de lodo de esgoto para produção de recondicionantes de solos agrícolas..... 101
Artigo 3. Comprovação da eficiência do processo de atenuação natural monitorada de lodo de esgoto, por meio de bioensaios de mutagenicidade..... 131
Artigo 4. Decaimento da toxicidade do lodo de esgoto e possibilidade do seu uso como fertilizante de solos agrícolas..... 153
Artigo 5. *Eisenia andrei* como bioindicadora dos efeitos do logo de esgoto após diferentes períodos de atenuação natural monitorada..... 176
6. CONCLUSÕES GERAIS..... 196
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 199

1. INTRODUÇÃO GERAL

O aumento populacional dos centros urbanos tem proporcionado um equivalente aumento de diversos resíduos, os quais, muitas vezes, são introduzidos no ambiente sem tratamento adequado ou sem qualquer perspectiva de reciclagem (NASCIMENTO et al., 2004). Nas regiões com elevada densidade demográfica e industrial, as águas servidas que são lançadas nos rios constituem o principal agente poluidor urbano (SILVA, 1995; MARIA; KOCSSI; DECHEN, 2007).

O tratamento de esgoto é uma ação necessária para se tentar minimizar os resíduos gerados pelo descarte excessivo de detritos de origem urbana, cujos efeitos acabam sendo, via de regra, detrimentais para o ambiente. O processo de tratamento de esgoto doméstico consiste em separar as frações sólidas das líquidas. Para essa separação, tem sido desenvolvidos sistemas de tratamentos combinados, tais como os físicos, químicos e biológicos (SÃO PAULO, 1979; 2006). O lodo de esgoto (LE) é gerado como resultado de processos de sedimentação realizados ao longo do tratamento primário e secundário de águas residuais (ROIG et al., 2012). Quando esta separação se completa, a parte líquida (EET – efluente de esgoto tratado) é descartada em um recurso hídrico e a parte sólida (LE), onde estima-se que os resíduos presentes no esgoto se concentrem (HELALEH et al., 2005), é coletada para posterior disposição.

Lodos de esgoto são resíduos semi-sólidos, predominantemente orgânicos, com teores variáveis de componentes inorgânicos, provenientes do tratamento de águas residuárias domiciliares ou industriais (ANDRADE, 1999). Segundo Bettiol e Camargo (2000), em função da origem, do tipo e da eficiência do processo utilizado, o LE pode apresentar uma composição muito variada. Um LE típico contém 40% de matéria orgânica, 4% de nitrogênio,

2% de fósforo e 0,4% de potássio, além de alguns micronutrientes como ferro, cobre, zinco e manganês.

De acordo com Pedroza et al. (2010), o Brasil produz, anualmente, cerca de 150 a 220 mil toneladas de matéria seca de LE. Em relação ao esgoto doméstico no Brasil, a produção varia entre 80 a 200 litros/hab.dia, sendo que cada habitante produz cerca de 150 g/dia de LE centrifugado (ALEM SOBRINHO, 2001). No entanto, apenas 37,9% da população urbana têm seu esgoto devidamente coletado e tratado (SNIS, 2012). No estado de São Paulo, onde 75,8% das cidades apresentam tratamento de esgoto (IBGE, 2010), a geração de LE já ultrapassou a produção de 100 toneladas de LE seco por dia (OLIVEIRA, 2000).

Um problema que vem se arrastando nas últimas décadas é a disposição final adequada dos resíduos gerados pelas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). A crescente produção dos dois subprodutos gerados pelo tratamento de esgoto (LE e EET), decorrentes do aumento do esgoto gerado pela população, da ampliação das capacidades dos sistemas de coleta e da obrigatoriedade da instalação de sistema de tratamento de esgotos nos centros urbanos (SÃO PAULO, 2006), tem levado a uma discussão adicional a aquelas pertinentes aos problemas de poluição ambiental, que é a necessidade de se estabelecer técnicas mais apropriadas que resultem em uma melhor disposição destes resíduos no ambiente.

Tais fatos alertam para a necessidade imediata de, além de ações políticas eficientes, definição de tecnologias para solucionar o grave problema da destinação final do LE. Esta preocupação tem estimulado ações mundiais, não só sobre práticas de minimização da produção de resíduos, mas também de priorização da reciclagem, como uma opção de destino final (OLIVEIRA et al., 2005).

Uma alternativa viável e nobre, pelo seu aspecto econômico e ambiental, para a destinação desses resíduos sólidos seria a sua aplicação na agricultura, como recondicionante do solo (LOPES, 2008). A utilização do LE em áreas agrícolas tem sido mencionada, principalmente, por este apresentar uma alta concentração de matéria orgânica, ser fonte considerável de nutrientes e, consequentemente, ter a capacidade de promover um recondicionamento das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (BOVI et al., 2007; FARIA, 2007; SÁNCHEZ-BRUNETE; MIGUEL; TADEO, 2007).

Dentre a capacidade do LE recondicionar as propriedades físicas do solo, destaca-se a melhoria no estado de agregação das partículas do solo, característica esta que leva a uma diminuição da densidade e a um consequente aumento na aeração e retenção de água (MELO; MARQUES, 2000). Quanto aos aspectos químicos, a aplicação de LE ao solo propicia uma elevação nos teores de fósforo (SILVA; RESCK; SHARMA, 2002), de carbono orgânico

(CAVALLARO; PADILLA; VILLARRUBIA, 1993), da fração húmica da matéria orgânica (MELO et al., 1994), do pH do solo (SILVA et al., 2001), com a conseqüente redução da acidez potencial (BERTON; CAMARGO; VALADARES, 1989), da condutividade elétrica e da capacidade de troca catiônica (OLIVEIRA et al., 2002). O uso agrícola desse resíduo também representa um benefício de ordem social, pela sua disposição final menos impactante no ambiente (SIMONETE et al., 2003) e por ser economicamente mais viável (HELALEH et al., 2005). No entanto, o LE gerado pelo tratamento de esgoto pode possuir em sua composição substâncias tóxicas e materiais biológicos impróprios para a saúde humana, como causar também sérios impactos no solo. Os riscos associados ao LE estão relacionados à presença de metais tóxicos, como o zinco, cobre, níquel, chumbo, cádmio e mercúrio, além de micro-organismos patogênicos (LOURENÇO, 1997; ALMEIDA et al., 1998; TSAKOU; ROULIA; CHRISTODOULAKIS, 2001; LOPES et al., 2005).

De maneira geral, os teores de metais do LE são extremamente altos, quando comparados às concentrações naturalmente encontradas nos solos (BORGES; COUTINHO, 2004). Sendo assim, a introdução de LE em áreas agricultáveis pode levar a um acúmulo destas substâncias nos solos, causando severos danos à biota associada, bem como à saúde humana (CESAR et al., 2008). O LE pode ser também fonte de contaminação de compostos orgânicos, tais como fenóis, benzenos, antracenos, alquilbenzenos linear sulfonados, etc. (HOLMSTRUP et al., 2001; PARAIBA; SAITO, 2005). Assim, o uso de LE como recondicionador de solo poderia além de levar a uma transposição dos contaminantes para a cultura agrícola, impossibilitando o consumo humano dos vegetais cultivados (MOHAMED; RASHED; MOFTY, 2003; EGLER et al., 2006; RANGEL et al., 2006), também introduzir micro-organismos patogênicos no ambiente, fato que poderia modificar a atividade microbiana natural do solo receptor do LE e causar sérios efeitos adversos à saúde humana (CESAR et al., 2008). Além disso, a lixiviação dos solos, promovida pela ação da água pluvial, pode disseminar a contaminação para águas subterrâneas e sistemas fluviais vizinhos (RODRIGUES-FILHO; MADDOCK, 1997 apud YALLOUZ et al., 2008). Por isso, sua aplicação na agricultura envolve cuidados especiais, para que sejam evitados danos aos organismos expostos, como também ao ambiente (LOPES, 2008; CLARKE; SMITH, 2011). A aplicação de LE contendo metais, poluentes orgânicos e patógenos no solo pode afetar diretamente a funcionalidade e a biodiversidade deste (HARRISON et al., 2006; TAS, 2010).

A assimilação e/ou o acúmulo de substânicas tóxicas pelas plantas e pela macro-pedofauna favorece a introdução dos contaminantes na cadeia trófica, prejudicando a estabilidade dos ecossistemas (CESAR et al., 2008). A aplicação contínua de LE no solo pode

promover, em longo prazo, o aumento da concentração dessas substâncias neste ambiente, que, se não for adequadamente controlada, pode ameaçar toda a cadeia trófica associada (HUE, 1995; HELALEH et al., 2005; ROIG et al., 2012). Sabe-se ainda que práticas agrícolas que levam à contaminação dos recursos hídricos impactam, diretamente, a vida das comunidades aquáticas (MURTY, 1986; JERGENTZ et al., 2004).

Para a aplicação do LE, ou de seus derivados, na agricultura, seria necessária a realização de uma caracterização minuciosa quanto ao potencial agronômico do LE, à presença de substâncias inorgânicas e orgânicas potencialmente tóxicas, à presença de patógenos, além de estudos sobre a sua estabilidade no ambiente (BRASIL, 2006). A concentração máxima de substâncias inorgânicas e patógenos presente no LE, ou de produto derivado, deve estar de acordo com a legislação prescrita no Artigo 11 da Resolução nº 375 do CONAMA, de 29 de agosto de 2006 (BRASIL, 2006).

Levando em consideração os benefícios que o uso agrícola do LE pode trazer, muitos esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de novas tecnologias que possam melhor tratar o próprio LE e assim dar um destino mais nobre a este resíduo (TAS, 2010). O processo de biorremediação pode ser uma metodologia segura e eficaz para diminuir a toxicidade de resíduos orgânicos, como os LEs contaminados com substâncias tóxicas. Dentre as estratégias de biorremediação, a atenuação natural é um processo bastante vantajoso, pois se utiliza da capacidade intrínseca de degradação de micro-organismos autóctones, ou seja, presentes no próprio local da contaminação, sem qualquer interferência no ambiente (MILLS et al., 2003).

As análises químicas realizadas com amostras ambientais estimam somente a concentração dos elementos ou das substâncias tóxicas presentes, e não refletem a real biodisponibilidade destes elementos (CESAR et al., 2008). Para uma melhor avaliação do potencial tóxico do LE, devem ser realizados testes de toxicidade, utilizando bioindicadores em experimentos controlados de laboratório (LANNO et al., 2004). Testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para se avaliar as reações dos organismos vivos expostos à poluição ambiental, como também para identificar os efeitos sinergísticos potenciais de vários poluentes (MORAES, 2000). Organismos que respondam às ações de contaminantes diversos são, comumente, utilizados em testes de toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, caracterizando-se em eficientes biomarcadores para estudos ambientais, pois permitem observar os efeitos isolados ou associados de substâncias nocivas e reconhecer a complexidade dos processos bioquímicos (ROOS et al., 2004).

Os bioensaios têm sido considerados importantes ferramentas para a avaliação de riscos ambientais, por isso vêm sendo muito utilizados no monitoramento de solos contaminados e/ou biorremediados (PLAZA et al., 2005).

O ensaio com *Salmonella*, também conhecido como teste de Ames, é considerado uma ferramenta clássica de avaliação da mutagenicidade de diversos agentes químicos (FERRAZ et al., 2010), sendo considerado um teste rápido e útil para avaliação da atividade genotóxica, tanto de substâncias puras (McCANN et al., 1975) como de matrizes ambientais (KUMMROW et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007).

Cepas de leveduras geneticamente modificadas estão sendo empregadas, com sucesso, para rastrear a presença e analisar a suposta atividade de disruptores endócrinos no ambiente (NOGUEROL et al., 2006a), como também para detectar a presença de ligantes do receptor de hidrocarboneto aromático (Aril-hidrocarboneto receptor - AhR) em amostras ambientais, como os compostos com atividade *dioxin-like* (FENT, 2003).

Dentre os vegetais superiores, *A. cepa* tem sido indicado como um eficiente organismo-teste para estudos dos mecanismos básicos de ação e de determinação dos efeitos de alguns químicos (FISKEJÖ, 1985; BUSHRA ATEEQ; ABUL FARAH; NIAMAT ALI, 2002; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; 2009), devido às suas características citogenéticas apropriadas e à facilidade de desenvolvimento do teste.

O uso de espécie de oligoquetas tem oferecido bons resultados nas avaliações do potencial tóxico de contaminantes de ambientes edáficos (NEUHAUSER et al., 1985; STRAALEN et al., 2005; CESAR et al., 2008). A indicação da utilização de oligoquetas como organismo-teste, em avaliações de toxicidade, decorre da sua importância na macro-fauna do solo, pois são organismos altamente relacionados com a cadeia trófica; por serem alimento para uma ampla diversidade de espécies animais; por possuírem uma capacidade de modificar as características físicas e químicas do ambiente; ingerirem uma considerável quantidade de solo; constituírem uma biomassa significativa do solo (quando presentes); e por terem um elevado potencial de complexação de metais pesados com o seu tecido de preenchimento (LIU; HU; ZHANG, 2005).

Embriões de peixes *Danio rerio* tornaram-se modelos ecotoxicológicos bastante atrativos, pois permitem o desenvolvimento de ensaios em pequena escala e apresentam uma excelente correlação com os testes *in vivo* realizados com peixes adultos (LAMMER et al., 2009). Além disso, ensaios com embriões possuem alta sensibilidade e reprodutibilidade, podendo ser utilizados tanto para avaliação tóxica de substâncias químicas, como também para avaliação de matrizes ambientais (HALLARE et al., 2005).

Cultura de células de mamíferos tem sido utilizada, com sucesso, em diversos ensaios de monitoramento ambiental, principalmente em estudos de avaliação da mutagenicidade dos agentes tóxicos. Estes testes apresentam vantagens pela facilidade de padronização das condições do ensaio, pela possibilidade de realizar tratamentos das células em várias fases do ciclo celular e pela organização do material genético assemelhar-se às células *in vivo* (RABELLO-GAY, 1991), além de serem reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis (ROGERO et al., 2003).

Dessa forma, o emprego de tecnologias que promovam a descontaminação do LE, bem como de ensaios que avaliem o potencial tóxico desse resíduo, podem possibilitar um melhor tratamento do LE e, consequentemente, a sua aplicação mais segura em solos agrícolas. A associação dessas práticas pode contribuir para minimizar os impactos ocasionados ao ambiente e aos organismos expostos quando a disposição é feita "*in natura*"; promover um decréscimo dos custos gerados pelo tratamento de esgoto, uma vez que sua disposição é uma das partes mais onerosas do processo das ETEs; recuperar a qualidade dos solos por atuar como recondicionante de suas propriedades físicas, químicas e biológicas; reduzir os custos com fertilizantes, os quais são intensivamente utilizados na agricultura; além de possibilitar o uso mais sustentável de um resíduo de produção crescente na atualidade.

2. OBJETIVOS

Pelo exposto anteriormente, existe uma real necessidade de estabelecer métodos e técnicas apropriadas para minimizar os impactos de poluentes sobre os ecossistemas, particularmente aqueles derivados de estações de tratamento de esgoto, quer seja pela sua própria constituição tóxica como pela maneira que são inadequadamente dispostos no ambiente. A aplicação de LE na agricultura poderá minimizar os efeitos negativos que este resíduo vem proporcionando nas áreas onde são hoje dispostos (principalmente em aterros sanitários), viabilizando assim um fim mais nobres para este material.

Dessa forma, este projeto teve como objetivos gerais:

- Avaliar a efetividade do processo de atenuação natural monitorado no LE estudado, por meio de análises químicas e de ensaios biológicos;
- Acompanhar a indução de efeitos tóxicos, por meio de ensaios biológicos *in vivo* e *in vitro*, após diferentes períodos de atenuação natural do LE, a fim de verificar possíveis alterações na sua toxicidade;
- Verificar a possibilidade de utilização do LE como fertilizante agrícola em relação ao seu efeito tóxico ocasionado aos organismos expostos.

E, como objetivos específicos:

- Identificar e quantificar, por meio de análises químicas, os poluentes presentes no LE estudado, de acordo com a Resolução CONAMA nº 375, de 29 de agosto de 2006;

- Comparar os resultados obtidos para as análises químicas antes e após os diferentes períodos de atenuação natural monitorada, a fim de verificar alterações nas concentrações dos contaminantes encontrados;
- Caracterizar a população microbiana do LE, antes e após sua biorremediação, identificando e quantificando possíveis alterações nos diferentes gêneros de micro-organismos encontrados ao longo dos períodos avaliados;
- Estimar a mutagenicidade de diferentes concentrações do extrato aquoso de LE, por meio do teste de Kado com *S. typhimurium*;
- Mensurar a atividade biológica de diferentes extratos do LE, em leveduras recombinantes, para detectar a presença de compostos com atividades *dioxin-like* e estrogênica;
- Avaliar os potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do LE *in natura* e de associações solo/lodo, bem como de diferentes concentrações de solubilizados do LE, por meio do organismo-teste *A. cepa*;
- Verificar o potencial tóxico do LE e de associações solo/lodo sobre o invertebrado terrestre *E. andrei*;
- Identificar possíveis alterações histológicas e histoquímicas no intestino de *E. andrei* após exposição ao LE *in natura* e às diferentes associações solo/lodo;
- Avaliar o potencial tóxico do LE e de associações solo/lodo sobre embriões de *D. rerio*;
- Estimar alterações no padrão de expressão do gene CYP1A em embriões de peixes *D. rerio* expostos aos diferentes extratos de LE;
- Avaliar o potencial mutagênico de diferentes concentrações de solubilizados do LE utilizando o teste do MN em cultura de células de hepatoma humano (HepG2).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Produção de LE

Atualmente existe uma crescente preocupação com a manutenção da qualidade do meio ambiente, que impõe ao poder governamental a implantação de políticas públicas que garantam um desenvolvimento cada vez mais sustentável. Entre as ações prioritárias, encontram-se aquelas relacionadas ao saneamento básico e ao gerenciamento do despejo de esgoto diretamente no ambiente (BDOUR; HAMDIB; TARAWNEH, 2009; MOLINOS-SENANTE; HERNANDEZ-SANCHO; SALA-GARRIDO, 2013). O gerenciamento de resíduos sólidos e o tratamento de esgoto foram reconhecidos, na Conferência Mundial de Meio Ambiente - Rio 92 e posteriormente na Conferência de Joanesburgo em 2002, como pontos principais para a sustentabilidade ambiental, que resultou na inclusão de diretrizes específicas para este tema na Agenda 21, a ser implantada em cada país pertencente a ONU. Este documento propõe, como uma das ações chaves, a diminuição da geração de resíduos, o consumo sustentável, a reciclagem e a correta destinação desses resíduos (AGENDA 21, 1995; 2004). Tais fatos culminaram com o aumento do número de ETEs instaladas.

As ETEs tratam o esgoto com a finalidade de diminuir sua alta concentração de carga orgânica, inorgânica e microbiana, com a intenção de garantir a saúde pública e a preservação ambiental (CARVALHO; OLIVEIRA, 2010).

De acordo com Ferreira e Andreoli (1999), os esgotos podem ser classificados quanto a sua origem em dois tipos principais: os esgotos domésticos, gerados pelo uso da água em instalações como banheiros, lavanderias e cozinhas; e os esgotos industriais, relativo ao emprego da água em processos industriais, caracterizando-se por serem bastante heterogêneos e relacionados diretamente aos produtos utilizados pela indústria.

De modo geral, o tratamento das águas residuárias inicia-se por um tratamento primário que consiste basicamente pelo gradeamento de materiais grosseiros, remoção de partículas sedimentáveis e sólidos em suspensão, além da correção de pH (DEZOTTI et al., 2008). Posteriormente, é aplicado um tratamento secundário, onde micro-organismos transformam a matéria orgânica biodegradável em CO_2, água e energia (LOFRANO; BROWN, 2010). Como produto final deste processo tem-se o esgoto tratado que pode ser direcionado ao corpo de água receptor e, como subprodutos resultante da atividade microbiana, o lodo de esgoto bruto mais gases (DAVIS, 1989 apud DAMASCENO; CAMPOS, 1998). Adicionalmente, o lodo bruto deve ainda perder água, ser compactado e estabilizado (GRAY, 2010).

Sabe-se que a quantidade de LE gerado por uma ETE corresponde, geralmente, a um máximo de 2% do volume de esgoto tratado (ANDREOLI et al., 1999), sendo que quanto mais moderna e eficiente for a planta da ETE, maior será a quantidade de LE gerada, pela sua maior eficiência na extração de nutrientes e contaminantes do efluente líquido (CORRÊA; FONSECA; CORRÊA, 2007). No entanto, em decorrência do alto custo do processo, o tratamento e a destinação dos resíduos vêm sendo tratado como um dos grandes desafios relacionados ao tratamento de esgoto (GOMES et al., 2013), pois seus custos podem representar de 30% a 50% do gasto operacional de uma ETE (ANDREOLI et al., 1999).

3.2. Dados sobre a produção mundial de LE

Anualmente, são produzidos milhões de toneladas de LE ao redor do mundo (APARICIO; SANTOS; ALONSO, 2009), quantidade essa que só tende a aumentar (PATHAK; DASTIDAR; SREEKRISHNAN, 2009).

De acordo com Kelessidis e Stasinakis (2012), a Alemanha, o Reino Unido, a Espanha, a França e a Itália estão entre os países europeus que mais produzem LE, sendo responsáveis pela geração de 2,17, 1,771, 1,121, 1,059 e 1,053 milhões de toneladas de sólido seco a cada ano, respectivamente, o que representa 73% do total de LE gerado pelos integrantes da EU-15 (9,806 milhões ton/ano). Adicionalmente, estima-se que no ano de 2020 a produção de LE pelos países que integram a EU-12 (Estônia, Letônia, Lituânia, Polônia, República Tcheca, Eslováquia, Hungria, Eslovênia, Chipre, Malta, Bulgária e Romênia) ultrapassará o valor de 13 milhões de toneladas de massa seca (LEONARD, 2011).

Já os Estados Unidos, em 2004, produziram 7,180 milhões de toneladas de LE seco (LEBLANC et al., 2008). Segundo Lemainski e da Silva (2006), esse número alcançou o valor de 13 milhões de toneladas, em peso, no ano de 2006.

Na China, devido a instalação de um grande número de ETEs nos últimos anos, a produção de LE, no ano de 2005, chegou a 5 bilhões de quilos de massa bruta (TANG; ZHAO, 2005). Atualmente, a produção chinesa de LE é mais de 10 milhões de toneladas em massa seca por ano (CHEN et al., 2013).

Pathak, Dastidar e Sreekrishnan (2009) apresentaram em sua revisão que, para o ano de 2005, países como Israel e Nova Zelândia geraram cerca de 113 e 401 toneladas de LE (peso seco), respectivamente.

No Brasil, onde menos de 40% da população urbana possui tratamento de esgoto (SNIS, 2010), a produção de LE encontra-se por volta de 150 a 220 mil toneladas de matéria seca por ano (PEDROZA et al., 2010).

3.3. Possíveis destinos do LE

Em decorrência do crescente aumento de LE produzido, o gerenciamento e a disposição final deste resíduo tornou-se uma das principais preocupações pelos problemas ambientais que vem promovendo nas últimas décadas (GIANICO et al., 2013). Assim, uma série de alternativas vem sendo propostas para a destinação do LE, entre elas a sua disposição em aterros sanitários próprios; seu uso na produção de cimento e tijolos; queima; disposição oceânica; emprego como fertilizante agrícola e recondicionante de solos (SILVÉRIO, 2004).

No passado, a principal estratégia para a disposição do LE era seu acondicionamento nos oceanos (FYTILI; ZABANIOTOU, 2008), por meio do descarte de barcos ou dutos (GRAY, 2010). Segundo Bothner et al. (1994), o despejo de LE no oceano na região de Nova Iorque provocou alterações na comunidade bentônica, o que contribuiu para o aumento populacional de duas espécies de poliquetas. Rodger, Davies e McHenery (1992) também relataram que o descarte de LE em uma região oceânica da Escócia acarretou no aumento da concentração de metais, carbono orgânico e nitrogênio e provocou alterações no potencial redox dos sedimentos oceânicos, em até 2 km do local da sua deposição. Em decorrência das evidências de contaminação ambiental e desequilíbrio ecológico registradas, esta prática foi banida em vários países, incluindo os europeus (FYTILI; ZABANIOTOU, 2008) e os EUA (BOTHNER et al., 1994).

De acordo com Vesilind e Ramsey (1996), a incineração de LE destrói seus componentes orgânicos tóxicos e reduz o seu volume inicial em 90%, resultando apenas em cinzas quimicamente estáveis. Além disso, pode ser uma solução viável para grandes centros urbanos, onde a quantidade de LE gerado é muito elevada e o espaço disponível para construção de aterros é bastante restrito (WERTHERA; OGADA, 1999). Porém Gray (2010)

alerta que, além do alto custo, as cinzas decorrentes do processo de incineração do LE concentram todo o metal e, apesar do menor volume, ainda devem ser dispostas em locais adequados. Além disso, esse processo pode promover a geração de gases de exaustão como dioxinas, furanos, CO_2, NOx, N_2O, SOx, entre outros, se a temperatura de combustão não for adequada (880°C para o N_2O, 600°C para dioxinas e furanos e 400°C para os demais) (CHEN et al., 2012).

O descarte em aterros ainda é, em alguns países, um dos principais destinos do LE. No entanto, esta prática apresenta muitos aspectos desvantajosos como geração de gases de efeito estufa e, principalmente, de metano, durante a decomposição do LE, mas também a introdução de organismos patogênicos no ambiente; poluição do ambiente com metais e substâncias orgânicas tóxicas (GRAY, 2010). Esta alternativa é também considerada bastante onerosa, além de necessitar de locais amplos e afastados da população devido ao odor desagradável produzido, derivados de gases que não poderão ser utilizados para outros fins. No entanto, a disposição de LE em aterros sanitários, bem como sua incineração são processos ainda bastante utilizados mundialmente, mas que são mais onerosos e prejudiciais ao ambiente (WALTER; MARTÍNEZ; CALA, 2006).

Outra possibilidade de uso do LE seria empregá-lo no processo de pirólise, formando biogás (fonte de energia), bio-óleo (fonte de energia e matéria prima em indústrias petroquímicas) e biocarvão (rico em carbono e nutrientes, usado como fertilizante ou adsorvente) (HOSSAIN; STREZOV; NELSON, 2009).

Contudo, frente a todas as hipóteses de utilização do LE, até o presente momento, a sua disposição em solos agrícolas parece ser a opção mais viável, tanto do ponto de vista ambiental como econômico (FIA; MATOS; AGUIRRE, 2006; SINGH; AGRAWAL, 2008; MCGEEHAN, 2012; GIANICO et al., 2013). Segundo Walter, Martínez e Cala (2006), os benefícios desse tipo de uso incluem a diminuição do uso de fertilizantes sintéticos, bem como a diminuição também de uma fonte de poluição. Além disso, seu uso possibilita uma reciclagem de nutrientes (ENGWALL; HJELM, 2000).

Na Europa, os países que constituem a EU-15 destinam 53% do LE produzido para práticas agrícolas e 21% para a incineração, enquanto que os países da EU-12 possuem como principal método, a incineração do LE (KELESSIDIS; STASINAKIS, 2012). No Reino Unido, mais de 60% do LE é utilizado na agricultura, seguido por incineração (19%), recuperação de áreas degradadas (11%), produção de gás (4%), uso industrial (2%), compostagem (1%) e despejo em aterro (1%) (GRAY, 2010).

No Brasil, o principal destino do LE são os aterros sanitários (50%), seguido pelo uso

agrícola (15,1%) (ANDREOLI et al., 2008). Segundo Bettiol e Camargo (2006), a utilização do LE na agricultura ainda não é tão disseminada no Brasil pelo fato da falta de informações relacionadas ao efeito da incorporação desse resíduo em solos tropicais, já que a legislação referente a aplicação do LE foi baseada, principalmente, em estudos realizados em solos de região temperada. Entretanto, a escolha do melhor destino para o LE parece estar relacionada, primeiramente, com os custos da disposição e, em segundo lugar, com a solução ambientalmente mais adequada (GRAY, 2010).

3.4. Composição/Características do LE

A composição do LE é bastante variável e está sempre altamente relacionada com a origem do esgoto tratado, a suas características, o tipo de tratamento utilizado pela ETE e a época do ano **(**BETTIOL; CAMARGO, 2006; FYTILI; ZABANIOTOU, 2008; SINGH; AGRAWAL, 2008).

De acordo com Kulling, Stadelmann e Herter (2001), em geral, um LE contém substâncias orgânicas, macronutrientes, micronutrientes, metais, micropoluentes orgânicos e micro-organismos. Para Bettiol e Camargo (2006), o LE é geralmente constituído por 40% de matéria orgânica, 4% de nitrogênio e 2% de fósforo. Para esses autores, os elementos Fe, Bo, Se, Na, S e Mg também podem estar presentes no LE. Singh e Agrawal (2008) consideram que a maior parte do nitrogênio e fósforo disponível no LE seja referente a nitrogênio orgânico e a fósforo inorgânico, além de também apresentar potássio, cálcio, cobre, cádmio, zinco e manganês.

Os valores de pH do LE também são bastante diversos, variando de uma faixa levemente ácida a alcalina (SINGH; AGRAWAL, 2008).

3.5. Efeitos positivos da utilização de LE em solos agrícolas

De acordo com Andreoli et al. (1999), o LE não pode ser considerado simplesmente como um resíduo resultante do tratamento de esgoto, pois sua composição pode influenciar de modo positivo na recomposição das características agronômicas dos solos agrícolas, constituindo um excelente recondicionador do solo. Para Fytili e Zabaniotou (2008), a presença de nitrogênio e fósforo no LE o caracteriza como um excelente fertilizante, uma vez que tais elementos são essenciais para o desenvolvimento das plantas

Entre as principais melhorias das propriedades físico-químicas do solo associadas ao LE estão a diminuição da densidade do solo com o aumento da estabilidade dos agregados; aumento da capacidade de campo, que proporciona uma maior retenção hídrica; correção de

pH; aumento da porosidade e condutividade hidráulica; aumento da capacidade de troca catiônica (CTC), o que auxilia na retenção de elementos essenciais às plantas; aumento da condutividade elétrica; aumento dos teores de fósforo, nitrogênio e outros nutrientes; diminuição de processos erosivos; aumento do carbono orgânico e do teor de ácido húmico (MELO et al., 2001; SINGH; AGRAWAL, 2008).

Alguns estudos relatam que a incorporação de LE aos solos levou ao aumento da absorção de nutrientes pelas plantas e, consequentemente, a produtividade da cultura (SILVA, 1995).

Em um estudo realizado por Chiba et al. (2008), sobre a aplicação de LE em cultura de cana-de-açúcar, foi observado que o LE contribuiu para a elevação da concentração de carbono no solo e de fósforo nas folhas da plantas. Contudo, não foi observado nenhum aumento no solo para os elementos fósforo, potássio, cálcio e magnésio e para os metais cádmio, cromo, níquel e chumbo, embora estes estivessem presentes no LE estudado.

Estudos de Araújo, Gil e Tiritan (2009) mostraram que houve aumento do teor de fósforo no solo, de nitrogênio nas folhas e na produção de massa seca da parte aérea da gramínea *Brachiaria decumbens*, após a aplicação de LE no solo desta pastagem. Lemainski e Silva (2006), após avaliação da aplicação de LE em cultura de soja, concluíram que a eficiência agronômica do LE é quase 20% maior do que a obtida por meio do uso de fertilizante mineral, podendo ser empregado como uma alternativa econômica e agronomicamente mais viável.

Aplicação de LE também favorece uma melhora nas propriedades biológicas do solo, aumentando a atividade microbiana (MELO et al., 2001). Hargreaves, Adl e Warman (2008) relataram em sua revisão, alguns estudos que indicam que há um aumento de enzimas microbianas, da biomassa microbiana e da taxa basal de respiração do solo. Um aumento da população de micro-organismo no solo, em especial de bactérias, foi observado também por Cavallet e Selbach (2008), após a adição, no solo, de LE provenientes de curtumes.

3.6. Problemas ambientais relacionados com a disposição do lodo em solos agrícolas

O principal fator limitante do uso de LE como fertilizante e/ou recondicionante agrícola refere-se ao fato de que o LE pode conter uma mistura complexa de compostos tóxicos e que, ao ser adicionado ao solo, podem tornar-se disponíveis para os organismos expostos (ENGWALL; HJELM, 2000).

Segundo Giudice e Young (2011), a presença de metais pesados no LE foi uma das primeiras preocupações relativas ao seu uso como fertilizante agrícola. O LE derivado de

ETEs que recebem exclusivamente esgoto doméstico tendem a apresentar menores quantidades de metais do que o lodo proveniente do tratamento de esgotos industriais. No entanto, o uso agrícola de qualquer tipo de LE fica restrito aos valores limites de metais estabelecido pela legislação (ANDREOLI et al., 1999). Entre os metais que merecem atenção, pela toxicidade, estão o zinco, o cobre, o níquel, o chumbo, o cádmio e o mercúrio (CESAR et al., 2008), dentre outros.

A presença de contaminantes orgânicos no LE também pode comprometer seriamente o ecossistema. Segundo Harrison et al. (2006), os agrotóxicos, os PCBs e o hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estão entre as substâncias orgânicas tóxicas mais abundantes encontradas no LE. A presença de compostos com atividades estrogênicas, decorrentes do aumento de consumo de produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais, vem se tornando motivo de preocupação adicional quanto à utilização do LE como fertilizante (GIUDICE; YOUNG, 2011).

Harrison et al. (2006), após uma criteriosa revisão baseada tanto em literatura científica como em relatórios governamentais, constataram que, embora dezenas de milhares de substâncias estejam sendo rotineiramente empregadas ao redor do mundo, a investigação de substâncias orgânicas presentes no LE está restrita a apenas 516 compostos. Isto demonstra que muitos outros compostos tóxicos, cuja identificação ainda não é exigida pela legislação, podem também estar presentes no LE, sem diagnóstico adequado e, assim, causar sérios riscos ambientais.

O LE também pode conter uma ampla variedade de micro-organismos e parasitas, incluindo helmintos (principalmente nematoides e cestoides), protozoários (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Toxoplasma gondü*, *Balantidium coli*, *Cryptosporidium*) fungos, bactérias e vírus (ANDREOLI et al., 1999; von SPERLING; ANDREOLI; FERNANDES, 2001). Dentre os organismos mais preocupantes e que podem constituir riscos para a saúde pública encontram-se as bactérias estreptococos, *Salmonella* e *Shigella*; larvas e ovos de helmintos; cistos de protozoários e vírus, tanto do grupo dos enterovírus como dos rotavírus (ANDREOLI et al., 1999).

Sabe-se que a aplicação continuada de LE contaminado em solos pode levar a um acúmulo de substâncias tóxicas no ambiente e um consequente prejuízo aos ecossistemas (ROIG et al., 2012). Após a aplicação do LE, a maioria dos contaminantes tornam-se facilmente assimiláveis, podendo ser acumulados tanto pelas plantas como pelos animais do solo (ERIKSEN et al., 2009). Essa assimilação de substâncias tóxicas pelos organismos pode comprometer toda a cadeia trófica relacionada (CESAR et al., 2008), além de impossibilitar o

consumo humano dos vegetais cultivados no solo recondicionado com LE (RANGEL et al., 2006). De acordo com Harrison et al. (2006) e Roig et al. (2012), além de alterar a funcionalidade do solo, a introdução desses contaminantes pode comprometer também a biodiversidade.

A possibilidade de dispersão desses contaminantes no ambiente para camadas mais profundas do solo ou a sua migração para as águas subterrâneas e superficiais, em decorrência dos processos de lixiviação e erosão, podem também prejudicar severamente a comunidade aquática (BERTONCINI; MATTIAZZO, 1999; CESAR et al., 2010).

3.7. O emprego de tecnologias para descontaminação do LE

De acordo com Gianico et al. (2013), devido ao grande potencial agronômico do LE, em um futuro próximo, ele deixará de ser considerado um resíduo e passará a ser visto como um importante material para fins agrícolas. Dessa forma, tem se destinado muitos esforços na busca por métodos que possibilitem a descontaminação do LE, com a intensão de torná-lo potencialmente útil (TAS, 2010).

Entre as tecnologias que apresentam grande potencialidade para serem empregadas na descontaminação de ambientes poluídos, encontra-se o processo de biorremediação, o qual se utiliza de organismos vivos para metabolizar os contaminantes presentes no ambiente e transformá-los em compostos não tóxicos (RISER-ROBERTS, 1998; BAMFORTH; SINGLETON, 2005). Segundo Sinha et al. (2009), este processo apresenta o melhor custo benefício entre os métodos de remediação existentes. Além de ser um processo passível de ser realizado em ambientes abertos, não estéreis, onde existe uma grande variedade de organismos que possam atuar no processo (WATANABE, 2001).

De acordo com Corrêa, Fonseca e Corrêa (2007), a compostagem é uma das técnicas de biorremedição mais utilizadas mundialmente para o tratamento do LE. Esta técnica é realizada *ex-situ* e consiste na degradação da matéria orgânica pela ação de micro-organismos em condições físico-químicas ideais, necessitando da adição de materiais como palhas, folhas, cascas e bagaços vegetais, que aumentem a porosidade e a oxigenação das pilhas ou leiras formadas (LEMOS et al., 2009). No caso do LE, a compostagem é utilizada para promover a sua estabilização, higienização e desidratação (EPSTEIN, 1997).

Outra técnica bastante utilizada na biorremediação de poluentes é a atenuação natural monitorada. Esse processo resulta na degradação de substâncias orgânicas tóxicas como consequência da ação de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem naturalmente no ambiente, incluindo diluição, transformação, lixiviação, sorção, volatilização e

biodegradação (SANCHEZ et al., 2000). A atenuação natural monitorada é bastante vantajosa, principalmente porque pode ser realizada no próprio local da contaminação, requerendo uma intervenção mínima no ambiente impactado (SARKAR et al., 2005), o que leva a um custo muito baixo frente às outras técnicas de biorremediação (SANCHEZ et al., 2000).

As características do solo, como textura, microbiota específica, quantidade de nutrientes, entre outras, podem interferir significativamente no processo de atenuação natural monitorada (SARKAR et al., 2005), sendo que solos pobres em nutrientes e com poucos micro-organismos desfavorecem ao desenvolvimento do processo. Sabe-se que a aplicação de LE ao solos pode contribuir para o aumento da atividade dos micro-organismos indígenas do solo (ROS; HERNANDEZ; GARCÍA, 2003), bem como ser fonte de nutrientes como carbono, nitrogênio e fósforo.

Segundo Watanabe (2001), em ambientes naturais, as bactérias são os principais organismos que atuam na biorremediação dos poluentes. Deste modo, se os micro-organismos forem devidamente identificados podem ser magnificados no ambiente e, assim, melhorar o processo de remediação. No entanto, muitos estudos têm relatado a formação de compostos tóxicos intermediários durante o processo de biorremediação (ALEXANDER, 1999; RANDERATH et al., 1999; PHILLIPS et al., 2000). Assim, para comprovar a efetividade desses processos, além da análise química, deve-se também realizar ensaios de natureza biológica (PLAZA et al., 2005).

3.8. O uso de bioensaios para a avaliação do potencial tóxico do LE

Devido a ampla diversidade de contaminantes que possam estar presentes no LE e a dificuldade da identificação química de todas essas substâncias, os bioensaios tornam-se ferramentas ideais para a avaliação dos efeitos do LE (CHENON et al., 2003). Adicionalmente, Alvarenga et al. (2007) ainda citam que o efeito sinergístico dos contaminantes, bem como sua biodisponibilidade para os organismos expostos não são passíveis de serem avaliadas pelas análises químicas, havendo então a necessidade do emprego de ensaios biológicos, para melhor compreender os riscos ecológicos associados ao uso de LE em solos. Desse modo, a associação entre análises químicas e biológicas fornece parâmetros indispensáveis para a tomada de decisão em relação a utilização agrícola do LE, além de contribuir para a determinação da melhor concentração de LE a ser aplicada nos solos agrícolas (WALTER; MARTÍNEZ; CALA, 2006).

Entre alguns dos bioensaios utilizados na avaliação ecotoxicológica do LE estão o

teste de germinação de sementes e elongação das raízes em *Lepidium sativum* L., *Hordeum vulgare* L., *Avena sterilis* (WALTER; MARTÍNEZ; CALA, 2006); ensaio de aberrações cromossômicas e teste do micronúcleo em *A. cepa* (CARITÁ, 2007; MAZIVIERO, 2011; CHRISTOFOLETTI; PEDRO-ESCHER; FONTANETTI, 2013); teste de Ames (DONNELLY et al., 1990; AGUAYO et al., 2004; KLEE et al., 2004); toxicidade em embriões de *D. rerio* (GUSTAVSSON et al., 2007); alterações histopatológicas em diplópodos (PEREZ; FONTANETTI, 2011; GODOY; FONTANETTI, 2010; NOGAROL; FONTANETTI, 2010); ensaio de reprodução em *Eisenia fetida* (KINNEY et al., 2012; NATAL-DA-LUZ et al., 2009); teste do micronúcleo em *Xenopus laevis* (CHENON et al., 2003); toxicidade para *Daphnia* (ALVARENGA et al., 2007).

3.8.1. Ensaios com *Salmonella*

O ensaio de *Salmonella*/microssoma é reconhecido internacionalmente por sua eficiência na avaliação da mutagenicidade de compostos químicos. Este teste apresenta uma alta correlação dos resultados com o ensaio de carcinogenicidade em roedores (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Além de ser um ensaio utilizado para registro de novos medicamentos e formulações químicas (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003), este ensaio também possibilita a detecção de compostos perigosos em amostras ambientais como água, ar, solo, sedimentos e efluentes (JARVIS et al., 1996; WHITE; CLAXTON, 2004). Entre as vantagens desse teste, está o fato de ser um ensaio curto e com alta sensibilidade e reprodutibilidade (URANO; TAKANASHI; IGARASHI, 1997).

Segundo Pohren et al. (2012), o ensaio de *Salmonella*/microssoma fornece dados importantes para caracterizar os riscos ecológicos de ambientes contaminados, bem como predizer os efeitos decorrentes da exposição a solos contaminados.

O teste de *Salmonella*/microssoma utiliza-se de linhagens de *S. typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (his-), que apresenta diferentes mutações no operon deste aminoácido, sendo construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA. Tais linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura com ausência de histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem sua capacidade de síntese. Desta forma, o número de revertentes é facilmente mensurado pela contagem de colônias que crescem em meio mínimo, após a exposição de uma população de células à substância a ser testada (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

3.8.2. Ensaios com Leveduras Recombinantes (RYA – Recombinant Yeast Assay)

Linhagens de leveduras geneticamente modificadas vêm se tornando ferramentas muito utilizadas para detectar ligantes exógenos para diferentes receptores, permitindo identificar a presença no ambiente de susbtâncias biologicamente ativas no ambiente (PIÑA et al., 2009). Por ser um teste rápido, de fácil manipulação, baixo custo, permitir o processamento de várias amostras e apresentar respostas satisfatórias, os ensaios com RYA vem sendo empregados em diversos estudos de avaliação de presença de contaminantes ambientais (NOGUEROL et al., 2006b; FERNANDEZ et al., 2009; BRIX et al., 2010; BADIA-FABREGAT et al., 2012).

O ensaio com RYA é um ensaio *in vitro* que possibilita avaliar se um determinado composto ou mistura é capaz de se ligar a um receptor específico e fornecer uma base para as respostas fisiológicas observadas *in vivo*, utilizando a maquinaria celular da levedura para reproduzir os mecanismos de ativação próprios de células de vertebrados (PIÑA et al., 2009). O teste se caracteriza por incorporar, um mínimo, de dois elementos recombinantes: um receptor nuclear de vertebrado e um gene repórter, cuja atividade transcripcional é controlada pela ativação do receptor nuclear (MILLER III et al., 1997).

A grande vantagem desse ensaio é que ele permite detectar a presença de uma determinada classe de contaminante em amostras ambientais complexas, sem a necessidade da realização de análises químicas (BRIX et al., 2010).

A linhagem ER-RYA possui o receptor de estrógeno de vertebrados (ER) e apresenta a capacidade de se ligar a compostos do tipo disruptores endócrinos. Já a linhagem YCM-RYA possui o receptor de hidrocarbonetos (AhR), que responde a compostos com atividade *dioxin-like* (NOGUEROL et al., 2006b).

3.8.3. O uso da espécie *A. cepa* como organismo-teste

Vegetais superiores se caracterizam como um importante material biológico para a avaliação de danos genéticos induzidos por contaminantes ambientais e vem sendo considerados como excelentes bioindicadores de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de ambientes contaminados com substâncias químicas (GRANT, 1994; YI; MENG, 2003).

Segundo Yi e Meng (2003), quando comparados com ensaios animais, os testes vegetais podem detectar a genotoxicidade de modo mais rápido e eficiente, sendo mais simples e econômicos, podendo assim ser usado, com sucesso, em monitoramento ambiental. Outra vantagem do uso dos vegetais superiores como organismos-teste, refere-se a estes

apresentarem uma alta sensibilidade aos compostos químicos, além de produzirem poucos resultados falsos positivos (GRANT, 1994). De acordo com Guimarães et al. (2000), os testes com plantas permitem ainda o desenvolvimento de estudos tanto em laboratórios como em biomonitoramento *in situ*, por curtos períodos de tempo.

Como o solo é o substrato de crescimento para a maioria das espécies de plantas, estes organismos são considerados excelentes indicadores para a avaliação de genotoxicidade destes ambientes (WHITE; CLAXTON, 2004). A indicação de utilização de plantas para a análise de solo se deve às boas respostas que estes organismos apresentam, frente às alterações ambientais. Quando estes organismos apresentam altas frequências de células aberrantes, podemos associá-las a instabilidades genéticas, decorrentes da exposição dos organismos a condições ambientais desfavoráveis (BEZRUKOV; LAZARENKO, 2002).

Dentre os vegetais mais utilizados para a avaliação de substâncias potencialmente genotóxicas e mutagênicas, destaca-se a espécie *A. cepa*, por esta apresentar um rápido crescimento de suas raízes, grande número de células em divisão, alta tolerância a diferentes condições de cultivo, disponibilidade durante o ano todo, fácil manuseio e cromossomos em número reduzido (2n=16), de grande tamanho (QUINZANI-JORDÃO, 1978; RANK; NIELSEN, 1998; PATRA; SHARMA, 2002; MATSUMOTO et al., 2006) e facilmente corados e observados (KURÁS et al., 2006). Outra vantagem do uso dessa espécie como organismo teste é o fato de que uma exposição pode ser feita diretamente ao material a ser testado, incluindo misturas complexas, sem a necessidade de se realizar procedimentos de extração ou pré-tratamento das amostras (RANK; NIELSEN, 1993). Adicionalmente, esse sistema teste também permite a detecção de pré-mutágenos, pois é capaz de metabolizar as substâncias por meio de um complexo de enzimas oxidativas (FISKEJÖ, 1985).

A espécie *A. cepa* também se destaca por sua alta sensibilidade e boa correlação com outros sistemas-teste, incluindo os de mamíferos (GRANT, 1982; CHAUHAN; SAXENA; GUPTA, 1999). Grover et al. (1990) observaram uma correlação superior a 90% entre os resultados obtidos com o teste de aberrações cromossômicas e MN realizados com este sistema-teste vegetal e os testes com mamífero, após exposição a diferentes concentrações de pesticidas. Estudos realizados por Grant (1978; 1982) indicaram uma correlação entre 75% e 90% entre *A. cepa* e sistemas-teste de mamíferos. Segundo Rank e Nielsen (1993), os testes realizados com *A. cepa* apresentaram uma sensibilidade superior a 82% quando comparados com testes com as bactérias *S. typhimurium* (teste de Ames), *Escherichia coli* (Microscreen) e com roedores. Esta maior sensibilidade de *A. cepa* também foi observada quando a espécie foi

comparada com outros vegetais superiores, como *Vicia faba* (MA et al., 1995; MIGID; AZAB; IBRAHIM, 2007) e *Tradescantia* (COTELLE; MASFARAUD; FÉRARD, 1999).

A espécie *A. cepa* representa um dos mais antigos organismos teste utilizados para análise de anormalidades celulares decorrentes de contaminação ambiental (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Inicialmente, Levan, em 1938, ao realizar experimentos com colchicina, demonstrou que essa espécie permitia a observação de alterações no fuso mitótico, que levava a uma poliploidização das células do meristema radicular. Mais tarde, este mesmo autor observou diferentes tipos de aberrações cromossômicas em células meristemáticas das raízes de *A. cepa*, induzidas por soluções de sais orgânicos (LEVAN, 1945).

A "Royal Swewdish Academy of Science" (FISKEJÖ, 1985) e o "Gene-Tox Program" (GRANT, 1982) consideraram a espécie *A. cepa* um organismo teste modelo para avaliar a indução de danos genéticos decorrentes da exposição a compostos químicos ou amostras ambientais. A eficácia desta espécie na identificação de danos ao material genético também foi comprovada em pesquisas de cooperação desenvolvidas entre o "United Nations Environmental Program" (UNEP), a "World Health Organization" (WHO) e a "US Environmental Protection Agency" (USEPA), as quais validaram internacionalmente o uso desse organismo para estudos de avaliação do modo de ação de contaminantes ambientais (GRANT, 1999). A partir de então, essa espécie vem sendo empregada como um eficiente organismo teste em estudos que visam à avaliação de contaminantes químicos, como agrotóxicos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; 2009; SRIVASTAVA; MISHRA, 2009) metais (YI; WU; JIANG, 2007; SETH et al., 2008), águas residuárias (GROVER; KAUR, 1999; GRISOLIA et al., 2005), além de biomonitoramento de solos (COTELLE; MASFARAUD; FÉRARD, 1999; SOUZA et al., 2009; CHRISTOFOLETTI; FRANCISCO; FONTANETTI, 2012) e de recursos hídricos (EGITO et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; BIANCHI; ESPINDOLA; MARIN-MORALES, 2011). Mais recentemente, essa espécie vem sendo utilizada, com sucesso, na avaliação da efetividade de processos de biorremediação (MAZZEO et al., 2010; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011).

As células de meristemas radiculares de *A. cepa* apresentam características que as credenciam como um eficiente material para estudos citogenéticos, sendo indicadas para ensaio de aberrações cromossômicas e de micronúcleos induzidos por poluentes ambientais (BUSHRA ATEEQ; ABUL FARAH; NIAMAT ALI, 2002; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011). De

acordo com Migid, Azab e Ibrahim (2007), entre os parâmetros passíveis de serem analisados nestas células, estão a indução de aberrações cromossômicas e cromatídicas, troca entre cromátides irmãs, alterações no índice mitótico, anormalidades nucleares e formação de micronúcleos. A análise de células F_1 também fornece importante resultados, quanto à mutagenicidade das amostras, pois permite avaliar a progressão das alterações observadas nas células meristemáticas (MA et al., 1995; LEME; MARIN-MORALES, 2008; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011), servindo como um parâmetro adicional em ensaios com *A. cepa*.

3.8.4. O uso da espécie *E. andrei* como organismo-teste

Os oligoquetas estão entre os invertebrados terrestres mais abundantes, representando cerca de 80% da biomassa do solo (GUPTA; CHAKRAVORTY; KAVIRAJ, 2011). Além disso, esses organismos são encontrados em uma ampla variedade de solos, estando presentes tanto em regiões temperadas como nos trópicos (LANDRUM et al., 2006).

Uma das características mais evidentes dessa classe de animais é que desempenham um papel importante na manutenção das propriedades do solo. De acordo com Bispo et al. (2009), esses organismos influenciam de modo positivo na estrutura do solo, aeração, capacidade de campo, decomposição da matéria orgânica, além de contribuírem para uma diminuição da lixiviação e da erosão e para um aumento da fertilidade dos solos. Também são responsáveis pela ciclagem de carbono, nitrogênio e fósforo e podem bioacumular metais presentes no solo (LIU; HU; ZHANG, 2005). Esses macroinvertebrados terrestres também são muito reconhecidos por sua alta sensibilidade aos poluentes ambientais, o que favorece o seu uso como excelentes bioindicadores de contaminação de solos (LANDRUM et al., 2006). Adicionalmente, esses organismos estão duplamente expostos aos contaminantes químicos presentes no solo, tanto pelo contato de sua superfície externa, como também internamente por ingerirem as partículas de solo (LANNO et al., 2004). Outra importante característica a ser considerada é em relação ao papel ecológico dos oligoquetas, já que esses organismos são presas de inúmeros vertebrados e constituem uma via de dispersão de contaminantes para os níveis tróficos superiores (LANGDON et al., 2003; CHEN et al., 2011).

Entre as espécies de oligoquetas mais utilizadas para avaliação ambiental, encontram-se as espécies *E. fetida* e *E. andrei*. De acordo com Domínguez (2004) e Belmeskine et al. (2012), entre as razões para a escolha dessas duas espécies como organismos teste em ensaios ecotoxicológicos, destacam-se o fato de estas serem cosmopolitas, facilmente cultivadas e manipuladas em laboratório, apresentarem um curto período de desenvolvimento e

reprodução, serem altamente sensíveis a uma ampla variedade de poluentes e tolerarem grandes variações de temperatura e umidade.

A espécie *E. andrei* vem sendo extensivamente utilizada para avaliação de efeitos tóxicos de diferentes contaminantes, sendo empregada, principalmente, em ensaios de sobrevivência (LACHANCE et al., 2004; GRUMIAUX et al., 2010; BELMESKINE et al., 2012), reprodução (MOREIRA, SOUSA, CANHOTO, 2008; CHELINHO et al., 2009; GRUMIAUX et al., 2010), fuga (NATAL-DA-LUZ; RIBEIRO; SOUSA, 2004; MOREIRA, SOUSA, CANHOTO, 2008; NATAL-DA-LUZ; RÖMBLE; SOUSA, 2008; NATAL-DA-LUZ et al., 2008), entre outros. No entanto, segundo PIOLA et al. (2013), o uso dessa espécie pode ainda ser indicado para avaliação de respostas celulares, fisiológicas e moleculares, podendo assim ser útil para a predição de efeitos adversos de poluentes. Lourenço et al. (2011) propuseram um novo biomarcador para essa espécie. Os autores consideraram que as alterações histopatológicas do trato gastrointestinal são uma eficiente ferramenta para detecção de danos ocasionados por poluentes ambientais, complementando os resultados obtidos com os outros ensaios realizados com este organismo.

3.8.5. O uso de embriões de *D. rerio* como organismo-teste

Inúmeras características fazem com que os embriões de *D. rerio* sejam considerados um excelente bioindicador para estudos ecotoxicológicos. Entre elas destacam-se o rápido desenvolvimento extrauterino, sua fácil manutenção, alta sensibilidade a substâncias químicas durante as primeiras etapas do desenvolvimento, transparência do corpo, pequeno tamanho e por seu uso ser considerado como um teste *in vitro* (PETERSON et al., 1993; HILL et al. 2005; RUBINSTEIN, 2006; BELANGER et al., 2010). Os ovos são obtidos em grandes quantidades durante todo o ano (LAALE, 1977). Adicionalmente, eles são considerados um método alternativo para ensaio de embriotoxicidade por predizerem efeitos em mamíferos (SELDERSLAGHS et al., 2009), pois sua embriogênese é muito bem caracterizada (KIMMEL et al., 1995) e muito similar a de vertebrados mais complexos, incluindo os humanos (WEIGT et al., 2012), já que desenvolvem a maior parte dos órgãos presentes nos mamíferos, incluindo sistema digestório, cardiovascular e nervoso em menos de uma semana (RUBINSTEIN, 2006).

Ainda, de acordo com Strmac et al. (2002) e Wiegand et al. (2000), as fases embrionárias e larvais de peixes apresentam uma maior sensibilidade na detecção de efeitos tóxicos de poluentes, em relação aos resultados obtidos com indivíduos juvenis e adultos.

Além disso, por questões éticas, ensaios utilizando embriões de *D. rerio* vêm sendo mais aceitos e reconhecidos internacionalmente (NAGEL, 2002).

Embriões de *D. rerio* são comumente utilizados para ensaios de embriotoxicidade, pois os seus ovos permanecem transparentes desde a fecundação até a fase de faríngula (quando os tecidos se tornam densos e a pigmentação é iniciada), permitindo uma fácil observação das principais alterações morfológicas, durante as etapas iniciais de desenvolvimento (SELDERSLAGHS et al., 2009). Além disso, os embriões de peixe zebra apresentam sistema de ativação metabólico ativo, permitindo a identificação de substâncias pró-mutagênicas, sem a necessidade do uso de fração metabólica exógena (WEIGT et al., 2011).

3.8.6. Cultura de células de mamíferos como sistema-teste

Testes *in vitro*, em especial os realizados com cultura de células de mamíferos, têm sido considerados uma alternativa viável em substituição ao uso de animais de laboratório (ROGERO et al., 2003). Frente ao rigoroso controle em relação ao desenvolvimento de pesquisas utilizando animais, devido à necessidade de proporcionar as condições de higiene e saúde ideais e o alto custo gerado para sua manutenção, testes com cultura de células vêm sendo constantemente empregados na ciência moderna (MORALES, 2008).

Entre as vantagens do uso de testes *in vitro*, está a redução da quantidade de animais experimentais; diminuição dos custos operacionais e de infra-estrutura; utilização de pequenas amostras de células; facilidade de padronização e de controle das condições do teste; obtenção de resultados mais rápidos e confiáveis, possibilitando a diminuição do tempo do experimento; facilidade na manipulação e observação das características celulares em microscópico de luz; possibilidade de utilização das células em várias fases do ciclo celular; possuir diferentes áreas de aplicações; e serem experimentos que não esbarram em questões éticas (OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT - OTA, 1986; BRUSICK, 1987; RABELLO-GAY, 1991; BARLIE, 1994; CARVALHO, 1996; BERTHEUSSEN; YOUSEF, M.I., FIGENSCHAU, 1997; EL-DEMERDASH; YOUSEF; ELAGAMY, 2001; ZUCCO et al, 2004; LEWINSKA et al., 2007; MORALES, 2008).

Embora os resultados dos ensaios *in vivo* e *in vitro* possam diferir, devido à complexidade dos sistemas biológicos, testes genotóxicos e mutagênicos com cultura de células podem predizer os efeitos observados nos organismos, pois, de acordo com Rabello-Gay (1991), a organização do DNA dessas células é bastante próxima ao observado no organismo vivo. Segundo Carvalho (1996), quando um composto químico induz um efeito

positivo em células mantidas em cultura, muito provavelmente os organismos expostos a esse mesmo composto químico apresentarão efeitos semelhantes. Dessa forma, experimentos com cultura de células são bastante apropriados para auxiliar no entendimento do modo de ação de agentes tóxicos (BRUSICK, 1987).

Ensaios com cultura de células de mamíferos têm sido amplamente empregados em estudos de investigação do potencial genotóxico e mutagênico de poluentes ambientais (MATSUMOTO et al., 2005; CARDOZO et al., 2006; MAZZEO et al., 2010), principalmente pelo fato dessas células apresentarem uma boa correlação com os efeitos observados em humanos (BRUSICK, 1987).

Uma das linhagens celulares mais empregadas na toxicologia é a constituída por hepatócitos. Essas células apresentam uma intensa atividade e expressão de enzimas relacionadas à metabolização de substâncias químicas (ZUCCO et al., 2004), característica esta que faz com que essas células se caracterizem em um poderoso sistema-teste para detecção, *in vitro*, do modo como os metabólitos formados causam alterações nas células (KNOWLES; HOWE; ADEN, 1980; GUILLOUZO, 1998; SINZ, 1999). Contudo, as culturas primárias de hepatócitos são pouco utilizadas para essa finalidade, devido à dificuldade de manutenção e manipulação da cultura, baixa frequência de divisão celular e mudanças frequentes nas suas características fenotípicas (BIANCHI-AMBRÓSIO, 2012).

Em substituição à cultura de hepatócitos, as células derivadas de hepatoma humano (HepG2) vêm sendo bastante utilizadas. Estas células apresentam uma intensa capacidade de proliferação, facilidade de cultivo e manutenção das características da linhagem, por longos períodos de tempo (OMASA et al., 2004). As células HepG2 apresentam um sistema de metabolização muito similar ao humano, atuando na ativação e detoxificação de substâncias químicas reativas ao DNA, com enzimas de fase I, II (KNASMÜLLER et al., 1998; 2004) e III (TSAMOU et al., 2012). Também conserva a maior parte das funções dos hepatócitos humanos (NAJI-ALI et al., 1994), apresentando morfologia bastante semelhante a eles (KNOWLES; HOWE; ADEN, 1980). Além disso, possui o gene supressor de tumor p53 ativo (TSAMOU et al., 2012).

Por se apresentarem muito próximas das características humanas *in vivo* (van der WATER et al., 2011), a cultura de células HepG2 é considerada como um eficiente sistema-teste para ser aplicado em ensaios que avaliam o potencial citotóxico e genotóxico de contaminantes (WESTERINK et al., 2010; LEME et al., 2011; LIU et al., 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização da área geradora do LE estudado

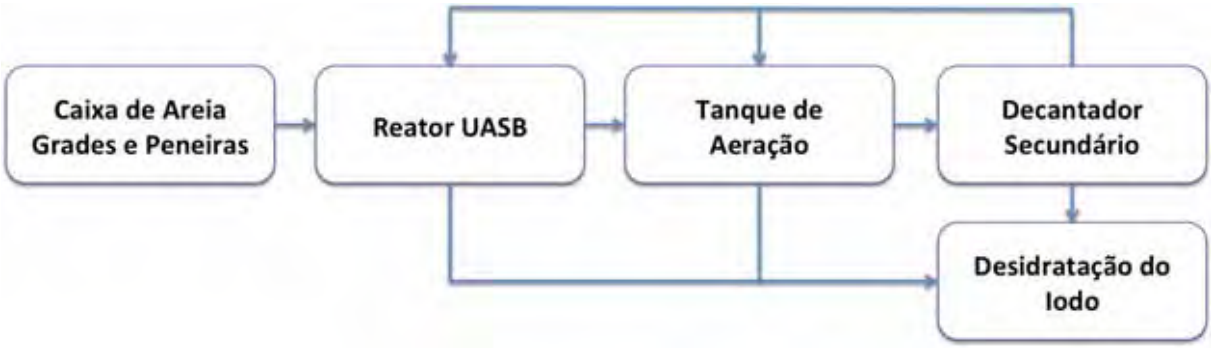
O estado de São Paulo está dividido em 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHIs), visando uma melhor gestão da qualidade das águas dessa região. A cidade de Rio Claro está inserida na UGRHI 5, que compreende a bacia dos rios Piracicaba/Capivari/Jundiaí (PCJ) e que apresenta uma população urbana de 4.989.575 habitantes, os quais têm 88% do seu esgoto coletado e 60% do esgoto tratado (CETESB, 2013). O município de Rio Claro possui uma população total de 188.997 habitantes e o tratamento de 55% do esgoto gerado, com uma eficiência de 96,3% (CETESB, 2013). Todo o esgoto coletado (99%) e/ou tratado é descartado no Rio Corumbataí e no Ribeirão Claro.

Em relação aos dados climáticos, para o período amostral de 1994 a 2009, Rio Claro apresentou uma temperatura média anual de 22,9 °C com uma amplitude térmica de 1,4 °C, indicando pouca variabilidade. Quanto ao Índice pluviométrico, para o mesmo período, a média para Rio Claro foi de 1458,9 mm/ano, apresentando uma distribuição não homogênea das chuvas ao longo do ano, sendo a estação com menor precipitação (seca) correspondente aos meses de junho, julho, agosto e setembro (outono e inverno) e um período de maior precipitação principalmente nos meses de novembro, dezembro, janeiro e fevereiro, decorrente do clima tropical da região (FERRARI, 2012).

4.2. Material estudado

O LE anaeróbio centrifugado utilizado nesse projeto foi coletado na ETE do Jardim das Flores na cidade de Rio Claro – SP, a qual recebe somente efluente de esgoto doméstico. Esta ETE é responsável por 22% do total de tratamento do esgoto da cidade de Rio Claro, atendendo 36.000 habitantes. O volume de esgoto tratado corresponde a 180.645 m^3/mês,

gerando um total de 113,53 toneladas de LE anaeróbio por mês. Atualmente, todo LE produzido é destinado para aterros sanitários apropriados. Os principais processos adotados por essa ETE estão descritos no fluxograma a seguir.



O LE foi coletado em duas datas diferentes (11/03/2010 e 25/03/2010), sendo estes misturados na proporção de 1:1.

Após a coleta, amostras do LE foram misturadas com solo coletado no Jardim Experimental da UNESP de Rio Claro (considerado de referência), nas proporções de 10, 25 e 50% de LE. Amostras das associações com LE (10, 25 e 50%) e o LE 100%, no tempo 0 (antes da atenuação), foram destinados aos ensaios biológicos, às extrações orgânicas e aquosas e ao processo de atenuação por períodos de 2, 6 e 12 meses.

4.2.1. Biorremediação do LE de esgoto por atenuação natural monitorada

Para realização da biorremediação, as amostras de LE 100% e todas as associações de solo/LE foram colocadas em sacos plásticos individuais, microfurados, com furos de aproximadamente 0,5 mm de diâmetro, com um espaçamento de 1 cm entre eles (Figuras 1 A e B). Os sacos foram enterrados em covas com, no máximo, 50 cm de profundidade, a fim de permitir a troca de micro-organismos entre as amostras e o solo do meio externo. Todas as amostras foram enterradas, em duplicata, no Jardim Experimental da UNESP de Rio Claro, em número de réplicas suficientes para a realização dos ensaios, em duplicata, para cada um dos períodos da atenuação natural (Figuras 1 C, D e E). Decorrido um período de 2 meses, duas amostras de cada uma das associações de solo/LE e de LE 100% foram desenterradas para a realização dos bioensaios descritos a seguir. Após 6 e 12 meses, mais duas amostras de cada uma das associações de solo/LE e de LE 100%, em cada tempo, foram também desenterradas para realização de uma nova bateria de bioensaios.

Figura 1. Atenuação Natural do LE. A. Foto de um saco plástico com furo de 0,5 mm de diâmetro e com espaçamento de 1 cm entre eles; **B.** Saco plástico lacrado, contendo LE, antes de ser enterrado; **C.** Cova com o saco plástico contendo LE; **D.** Visão geral da disposição das covas no Jardim Experimental; **E.** Visão das covas recobertas com solo e das estacas que identificam o posicionamento de cada um dos sacos plásticos.

4.2.2. Cálculo do peso seco

O peso seco das amostras (antes e após biorremediação) foi calculado pelo seguinte protocolo:

- os recipientes que receberiam as amostras foram, primeiramente, secos por 24 h em estufa a 105ºC;

- os recipientes foram pesados, em balança de precisão;

- ainda, em balança de precisão, foram pesados 10 g da amostra fresca de cada uma das concentrações propostas para avaliação;

- as amostras foram secas em estufa a 105 ºC por, no mínimo, 24 horas;

- após o resfriamento das amostras em dessecador, foram novamente pesadas;

- o cálculo do conteúdo de água existente foi feito pela diferença dos pesos inicial e final das amostras.

Esse procedimento foi feito em triplicata para todas as amostras.

4.2.3. Cálculo da Capacidade de Campo

Para o cálculo da capacidade de campo, seguiu-se o procedimento descrito a seguir:

- adição das amostras em funis, contendo algodão em seu interior;
- acréscimo de água nas amostras, até a completa saturação;
- selagem dos funis com filme plástico, para evitar evaporação da água;
- repouso por 24 h;
- retirada de determinado volume de amostra do funil e pesagem em recipiente tarado;
- secagem do material em estufa a 105 ºC por 24h;
- resfriamento das amostras em dessecador;
- pesagem novamente das amostras;
- cálculo pela diferença dos pesos inicial e final, considerando a quantidade de água que a amostra já possui (obtida por meio do cálculo do peso seco).

Esse procedimento foi realizado em triplicata para todas as amostras.

4.2.4. Preparo das amostras para obtenção dos extratos

As amostras referentes ao LE 100%, nos tempos 0, 2, 6 e 12 meses, e as associações solo/LE nas proporções de 10, 25 e 50%, após 12 meses de biodegradação foram submetidas a um processo de liofilização. Este processo consistiu em retirar a água presente nas amostras, por meio de sublimação, o que preserva suas principais características por longos períodos de tempo, permitindo que estas possam ser armazenadas.

Após serem liofilizadas, as amostras foram passadas por peneiras com malhas de 130 e 80 mm, respectivamente. Após serem peneiradas, foram armazenadas em frascos de vidro e mantidas a -20ºC, até sua utilização.

4.2.5. Obtenção do extrato aquoso - solubilizado (ABNT, 2004 - norma NBR 10.006)

O processo para a obtenção dos extratos aquosos das amostras de LE e solo, antes e após biodegradação, consistiu de:

- dissolução de 125 g de cada uma das amostras (referente ao peso seco) das associações de solo/LE 10, 25 e 50% e da amostra de solo referência em 500 mL de água ultra pura;
- agitação constante dessas soluções, em baixa velocidade, por 5 minutos;
- repouso das amostras, por 7 dias, em frascos cobertos com filme de PVC, em temperatura de 22 °C;

- decantação do material e posterior coleta do sobrenadante, para ser filtrado em membrana com 0,45 μm de porosidade;

- reserva do solubilizado para posterior utilização nos bioensaios.

Apenas para a obtenção do LE 100% foi utilizada a proporção de 1000 mL de água para 125 g de peso seco, ao invés de 500 mL, para que fosse possível obter uma fase aquosa.

4.2.6. Obtenção de extratos orgânicos - Soxhlet (USEPA, 2008 - METHOD 3540C)

Para obtenção de extratos orgânicos por Soxhlet, foram colocadas 10 g de cada uma das amostras liofilizadas em cartucho de extração de celulose tampado por lã de vidro. A extração foi realizada com 250 mL de acetona e diclorometano, na proporção 1:1 (v/v), por um período de 18 horas. A temperatura foi ajustada até obter, em aquecedores de Sebelin, uma velocidade de refluxo de 2 a 3 gotas por segundo. Os solventes (acetona e diclorometano) já com o material extraído, foram recolhidos e o material seco foi descartado. As amostras extraídas foram evaporadas por meio de rotavapor (38 ºC e -200/300 mmHg), até que o volume atingisse aproximadamente 1 mL. Este volume foi transferido para vials e submetido a uma suave corrente de nitrogênio gasoso, via manifold, até que todo líquido fosse evaporado. Em seguida, o material restante foi ressuspendido em dimetilsufóxido (DMSO), em quantidade suficiente para que toda a parte solúvel presente fosse solubilizada.

Esse procedimento foi realizado com o LE 100%, nos tempos 0, 2, 6 e 12 meses. As concentrações finais obtidas para essas amostras foram de 0,5 g/mL, 0,5 g/mL, 0,91 g/mL e 1g/mL, respectivamente.

4.3. Análise físico-química do LE

A análise físico-química das amostras, antes e após o processo de atenuação natural, foi realizada pelo laboratório Analytical Technology Company (São Paulo – Brasil). O tipo de análise realizada e o método utilizado estão descritos no quadro a seguir. Essas análises foram feitas apenas com a amostra do LE 100%, de cada período, e com o solo referência. Os parâmetros escolhidos para as análises foram baseados nos estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 375, de 29 de agosto de 2006 para a caracterização do LE (BRASIL, 2006).

Análises	Método
Compostos Orgânicos Voláteis 1,2-diclorobenzeno, 1,2,3-triclorobenzeno, 1,2,4-triclorobenzeno,1,3,5-triclorobenzeno	USEPA 8260B
Compostos Orgânicos Semi-Voláteis 1,3-diclorobenzeno,1,4-diclorobenzeno, 1,2,34-tetraclorobenzeno, 1,2,4,5-tetraclorobenzeno, 1,2,3,5-tetraclorobenzeno, Di-Nbutilftalato, Dimetilftalato, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, Pentaclorofenol, Benzo(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Benzo(k)fluoranteno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Naftaleno,Fenantreno, Hexaclorobenzeo, m-Cresol, o-Cresol, p-Cresol, Di(2-etilhexil)ftalato	USEPA 8270D
Pesticidas Organoclorados - Heptacloro, Aldrin, g-BHC (Lindano), a-Clordano, g-clordano, Dieldrin, DDT, Endrin,Toxafeno, Dodedacloro pentaciclodecano(MIREX)	USEPA 8081B
Dioxinas e Furanos	USEPA 8290 / 1613 EU
Fósforo, Potássio, Sódio, Enxofre, Cálcio, Magnésio, Arsênio, Bário, Cádmio, Chumbo, Cobre, Cromo, Mercúrio, Molubdênio, Niquel e Zinco.	USEPA 6010C
Carbono Orgânico Total	Standard Methods 21st - 5310
Serie Nitrogenada (Nitrato, Nitrito, Nitrogênio Amoniacal, Nitrogênio Kjeldahl)	Standard Methods - 21 st – 4500. N org-B USEPA 9056A
pH	EPA 9040C
Sólidos Totais	Standard Methods - 21st - 2540B
Sólidos Totais (Substâncias Voláteis a 105ºC)	Standard Methods – 21st – 2540B
Umidade	EPA 3550C
Coliformes Fecais	SM - 21st / Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods - 3rd APHA
Salmonella	Standard Methods
Ovos de Helmintos	Standard Methods
Vírus entéricos	Standard Methods

4.4. Caracterização microbiológica do LE

A caracterização microbiológica do LE foi feita somente com a amostra do LE 100% de cada período (inicial, 2, 6 e 12 meses).

4.4.1. Diluição, semeadura e identificação de micro-organismos da amostra

A diluição das amostras foi feita misturando 1 g de cada uma das amostras em 100 mL de salina estéril. Após homogeneização em Vortex, 10 μL da solução foram semeados, com uma alça descartável e estéril por esgotamento, nos meios: Agar Sangue, Agar Mac Conkey, Agar SS e Agar Sabouraud, para avaliar a presença e realizar contagem dos diferentes micro-organismos presentes nas amostras.

As placas semeadas foram incubadas em estufa a 35ºC, exceto para o meio Sabouraud, que foi incubado à temperatura ambiente. As leituras foram realizadas em intervalos de 24 horas, por 7 dias. Os diferentes micro-organismos encontrados foram isolados e inicialmente identificados por meio de provas bioquímicas manuais. Posteriormente, os micro-organismos foram identificados em equipamento de automação Vitek 2 BioMerieux®. As placas semeadas foram mantidas em estufa, por um total de 7 dias, para também observar o possível crescimento tardio de micro-organismos.

4.4.2. Contagem de micro-organismos das amostra

Neste estudo também foi realizada a quantificação de micro-organismos presentes em cada uma das amostras, pela contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônia), referente a 1 g do material original. Para a contagem final, foi considerado o meio de cultura que apresentou maior quantidade de cada micro-organismo, pois nem todos crescem em todos os meios de cultura, devido ao fato de alguns meios serem seletivos para alguns micro-organismos ou devido ao crescimento mais acelerado de alguns micro-organismos que dificultam a observação e contagem de outros.

4.5. Bioensaios utilizados na avaliação da atividade biológica do LE

4.5.1. Linhagens de *S. typhimurium*

- Linhagem TA98: bactéria que detecta mutação do tipo deslocamento do quadro de leitura e apresenta uma mutação no gene responsável pela síntese da histidina do tipo *his*D3052.

- Linhagem TA100: bactéria que detecta mutação do tipo substituição de pares de bases e apresenta uma mutação no gene responsável pela síntese da histidina do tipo *his*G46.

Ambas as linhagens apresentam mutação *rfa*, que aumenta a permeabilidade da parede de lipossacarídeos bacteriana, facilitando a entrada de moléculas maiores para o interior da célula; deleção do gene *uvrB* (Δ*uvrB*), que impede o reparo por excisão; e o plasmídeo PKM101 (Ap^r), o qual apresenta o gene *muc*AB, que confere resistência a ampicilina, por favorecer o reparo pós-replicação do tipo sujeito a erros, além de contribuir para um aumento da taxa de mutação espontânea e induzida.

4.5.2. Ensaio *Salmonella*/microssoma – Teste de Ames (Protocolo de Pré-Incubação)

As linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium* foram colocadas para crescer em incubadora shaker a uma temperatura de 37ºC, overnight, em caldo nutriente. Em seguida,

100 μL de cada linhagem (10^9 células/mL) foram adicionados em tubos de cultura contendo 500 μL de tampão fosfato e 100 μL da amostra a ser testada (ou 10 μL de substância usada no controle positivo - CP). Nos ensaios com presença de ativação metabólica S9, o tampão fosfato foi substituído por 500 μL de mistura S9 [água destilada estéril, tampão fosfato 0,2 M, NADP 0,1 M, glicose-6-fosfato 1,0 M, solução de sais (KCl 1,65 M e $MgCl_2$ 0,4M) e fração S9]. Para o CN, foram adicionados 100 μL de cada linhagem de bactéria aos tubos de cultura contendo 500 μL de tampão fosfato ou de mistura S9 e 100 μL do solvente utilizado para diluir a amostra. Os tubos contendo as misturas foram pré-incubados em estufa bacteriológica a 37ºC por 30 minutos. Em seguida, o seu conteúdo, acrescido de 2 mL de ágar de superfície, foi vertido em placas de Petri estéreis contendo ágar mínino solidificado. As placas foram incubadas invertidas em estufa bacteriológica a 37ºC por 66 horas. Cada teste foi realizado em triplicata. Os CP foram realizados em duplicata e o CN, em quintuplicata.

Para a análise de mutagenicidade, as colônias de bactérias revertentes foram contadas manualmente. Os dados foram avaliados pelo teste ANOVA e considerados positivos, quando os resultados do teste estatístico e de dose resposta foram significativos, segundo o modelo de Bernstein, que usa regressão linear e ANOVA. Os resultados foram expressos pelo número de revertentes por miligrama da amostra testada.

Foram avaliados os extratos orgânicos obtidos por soxhlet referentes às duas primeiras amostras de LE (tempo 0 e após 2 meses de atenuação natural). As doses testadas para cada uma das amostras (5; 1; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mg/L), foram determinadas seguindo orientações do ensaio de mutagenicidade com *Salmonella* da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA, 2009). As doses testadas foram obtidas a partir de diluição com água ultrapura dos extratos orgânicos das amostras de LE 100% nos diferentes períodos de atenuação natural.

Para o desenvolvimento dos testes de Ames com ativação metabólica, foi utilizado um sistema de metabolização exógeno (Sistema microssomal S9, Moltox), constituído de um homogenato de células do fígado de rato Sprague-Dawley, pré-tratado com a mistura bifenil policlorinada (Araclor 1254).

Como CPs, foram utilizados o óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) (Sigma, CAS No. 56-57-5), na concentração de 0,05 μg/μL, para os testes realizados na ausência de ativação metabólica e o 2-aminoantraceno (2AA) (Sigma, CAS No. 613-13-8), na concentração de 0,25 μg/μL, para os testes realizados na presença de ativação metabólica. Como controle negativo (CN), foi utilizada água ultra pura.

4.5.3. Ensaio de microssuspensão com *Salmonella* – modificação de Kado

Para realização deste ensaio, foi seguido o protocolo desenvolvido por Kado, Langley e Eisenstadt (1983), onde as linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium* foram colocadas para crescer em incubadora shaker a uma temperatura de 37ºC, overnight, em 20 mL de caldo nutriente. Após leitura de turbidez em espectrofotômetro com comprimento de onda de 650 nm, a cultura crescida foi concentrada para uma densidade de 10^{10} células/mL. A concentração foi feita centrifugando a cultura a 4ºC a 10.000g durante 10 min. O *pellet* formado foi ressuspendido em 2 mL de tampão fosfato 0,15M, para a obtenção da densidade desejada. Em seguida, foram adicionados 100 µL de cada linhagem (10^{10} células/mL) em tubos de cultura contendo 100 µL de tampão fosfato 0,1M e a amostra a ser testada. Nos ensaios com presença de ativação metabólica S9, o tampão fosfato foi substituído por 100 µL de mistura S9 [água destilada estéril, tampão fosfato 0,2 M, NADP 0,1 M, glicose-6-fosfato 1,0 M, solução de sais (KCl 1,65 M e $MgCl_2$ 0,4M) e fração S9]. Os tubos com as misturas foram pré-incubados a 37ºC por 90 minutos. Em seguida, o conteúdo do frasco, acrescido de 2 mL de ágar de superfície, foi vertido em placas de Petri estéreis preenchidas com ágar mínino solidificado. As placas foram incubadas invertidas em estufa bacteriológica a 37ºC por 72 horas. Cada teste foi realizado em triplicata. Os CP foram realizados em duplicata e o CN, em quintuplicata.

Para o desenvolvimento dos testes com ativação metabólica, foi utilizado um sistema de metabolização exógeno (Sistema microssomal S9, Moltox), constituído de um homogenato de células do fígado de rato Sprague-Dawley, pré-tratado com a mistura bifenil policlorinada (Araclor 1254).

O CP dos ensaios com ausência de ativação metabólica foi realizado com óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) (Sigma, CAS No. 56-57-5), na concentração de 2 µg/mL. Já para os testes realizados com a presença de ativação metabólica foi utilizado o 2-aminoantraceno (2AA) (Sigma, CAS No. 613-13-8), na concentração de 1 µg/mL.

Para a análise de mutagenicidade, foram contadas manualmente as colônias de bactérias revertentes. Os dados foram avaliados utilizando o programa estatístico SALANAL (Samonella Assay Analysis 1.0), selecionando os modelos de Bernstein ou linear. As amostras foram consideradas mutagênicas quando ambos os resultados, do teste estatístico (ANOVA; $p<0,05$) e da regressão linear ($p<0,05$) foram significativos. Os resultados foram expressos pelo número de revertentes por miligrama da amostra seca testada (revertentes/mg equivalente de solo seco).

4.6. Ensaios com Leveduras Recombinantes

4.6.1. Cepas de Leveduras utilizadas

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas utilizadas foram:

- Levedura BY4741 - receptor-estrogênico (ER-RYA): levedura (MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0) modificada com os plasmídeos pH5HE0 e pVitBX2. A expressão do plasmídeo pH5HE0 se dá pela presença do receptor do hormônio estrogênico humano HE0, clonado no vetor de expressão constitutiva da levedura pAAH5. O plasmídeo repórter pVITB2x contém duas cópias do elemento de resposta estrogênica ERE2 pseudo-palindrômico, derivado do gene de vitelogenina B1 de *Xenopus laevis* (5′-AGTCACTGTGACC-3′ inserido no KpnI do pSFLΔ-178K).

- Levedura YCM4 - receptor de hidrocarboneto aromático (YCM-RYA): levedura derivada da linhagem da W303a (MATa, ade2-1, can1-100, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3-1), que apresenta duas construções cromossomicamente integradas. Uma das formações coexpressa o receptor de hidrocarboneto aromático e os genes ARNT na presença do promotor Gal1-10. A segunda construção integrada é a do gene repórter pDRE23-Z, englobando três sequências XRE5 e a fusão CYC1-LacZ.

4.6.2. Procedimento dos testes de ER-RYA e YCM-RYA

O protocolo utilizado para os ensaios com leveduras foram baseados no protocolo proposto por Noguerol et al. (2006a; b).

O crescimento da levedura se deu em 2 mL de meio YPD (meio não seletivo), incubado a 30 °C, durante toda noite, sob agitação suave e constante (cerca de 100 rpm). Após a incubação, foram inoculados 20 µL da cultura de leveduras em 20 mL de meio mínimo SD (seletivo) específico para cada linhagem, incubado novamente a 30 °C durante toda a noite, sob agitação suave e constante (150 rpm). O cultivo foi ajustado a D.O. 600 nm entre 0,1-0,2, realizando leitura em espectrofotômetro. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 µL do cultivo com metanol a 5% em cada um dos poços das colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 da placa. Na coluna 1, foi adicionado, com o auxílio de capilares de vidro, 190 µL da cultura e 10 µL das amostras. A partir da coluna 1, foram realizadas as diluições para as outras colunas (para as diluições 1:3, foram transferidos 50 µL dos poços 1 para os 2; 50 µL dos poços 2 para os 3; 50 µL dos poços 3 para os 4; e assim sucessivamente, até os poços da coluna 9, e destes últimos, eliminados 50 µL de cada). Na coluna 11, foi realizado o teste CP, adicionando-se 100 µL do cultivo mais hormônio (0,1 µL de 17-β-estradiol a 10 µM para ER e 1 µL de β-naftoflavona a 100 µM para YCM). A coluna 12 foi destinada ao teste CN, onde

foram adicionados 100 µL do cultivo, já incluindo 5% do solvente utilizado nas amostras. Também foi realizado um controle para observar a toxicidade das amostras na coluna 10, colocando-se 100 µL do cultivo mais hormônio e 50 µL do conteúdo da coluna 1 e, após serem homogeneizados, foram eliminados 50 µL.

As placas foram incubadas por 6 horas a 30ºC com uma agitação suave e constante (100 rpm), sendo após esse período, adicionado, em cada poço, 100 µl de Y-PER (Yeast Protein Extraction Reagent). As placas foram incubadas novamente por mais 30 minutos a 30ºC, com a mesma agitação. Na sequência, foram adicionados, em cada poço, 100 µL de uma solução de MuGal (0,1% de 2-mercaptoetanol e 0,5% de 4-metil-umbelliferone β-D-galactopiranoside). Após centrifugação, foi feita a leitura da placa em espectrofluorímetro com excitação de 355 nm e emissão de 460 nm, com leitura registrada durante 10 minutos. Os valores de atividade da β-galactosidase foram calculados pelos métodos de regressão linear, baseando-se no aumento da fluorescência em relação ao tempo.

4.6.2.1. Cálculo de hormônio equivalente

O cálculo de hormônio equivalente permite estabelecer qual concentração do hormônio padrão (17-β-estradiol para ER e β-naftoflavona para YCM) é requerida para fornecer a mesma resposta que a amostra testada no ensaio de RYA. Assumindo-se que a curva dose-resposta segue um padrão sigmoide, pode-se calcular qual a diluição que uma dada amostra produz 50% da resposta hormonal máxima (EC 50). Os valores são convertidos para hormônio equivalente, assumindo um valor de conversão de 0,267 nM 17-β-estradiol para ER-RYA e de 47 nM β-naftoflavona para YCM-RYA.

4.7. Ensaio com sementes de *Allium cepa*

Sementes de *A. cepa* foram dispostas em placas de Petri forradas com papel de filtro e submetidas à germinação nas amostras de solubilizados de LE, obtidos das associações de solo/LE (10, 25 e 50% de LE) e do LE 100%. Simultaneamente, as sementes foram submetidas à germinação diretamente nas associações solo/LE (10, 25 e 50% de LE) e em LE 100%.

Os tratamentos controles foram realizados em água ultra pura (CN), em solo e em solubilizado de solo coletado no Jardim Experimental da UNESP/Rio Claro - SP (solo referência) e em 10 mg/L de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3), para o CP. Todos os testes de germinação de sementes foram realizados em duplicata.

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

4.7.1. Testes de Aberrações Cromossômicas e de Micronúcleo em células meristemáticas de *A. cepa*

Os testes de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleo (MN) foram realizados com células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982), com algumas modificações. O teste do MN também foi realizado com células da região F_1 de *A. cepa*. As raízes previamente fixadas foram submetidas ao reativo de Schiff. Para o preparo das lâminas, os meristemas foram dispostos em lâminas contendo uma gota de carmim acético (2%), recobertos com lamínulas e suavemente esmagados. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética, para serem, posteriormente, analisadas.

Para a análise de AC, foram considerados diferentes tipos de aberrações (perdas, fragmentos, pontes, atrasos, aderências cromossômicas, entre outros), nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase, telófase). Foram consideradas como *endpoint* de genotoxicidade todas as anormalidades celulares encontradas, com exceção das quebras cromossômicas e de MN. A presença de MN e das quebras cromossômicas foi considerada como outro parâmetro de avaliação (*endpoint* de mutagenicidade). O índice mitótico (IM), obtido pela razão do número de células em divisão sobre o número total de células analisadas, constituiu um outro parâmetro de avaliação, caracterizando o *endpoint* de citotoxicidade das amostras.

A análise de todos estes parâmetros foi feita pela contagem de cerca de 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina, para um total de 10 lâminas avaliadas (5 lâminas de cada repetição de um mesmo tratamento). As análises estatísticas foram feitas por meio do teste de Mann-Whitney a 0,05 de nível de significância.

4.8. Ensaios com *Eisenia andrei*

4.8.1. Teste de toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda foi desenvolvido com indivíduos adultos (clitelados) da espécie oligoqueta *E. andrei*. Os espécimes foram expostos em caixas contendo as amostras das diferentes concentrações de associação de solo/LE (10, 25, 50 e 100% de LE), por um

período de 14 dias a 20°C e sob ausência total de luz. Para o CN, foi utilizado solo coletado no Jardim Experimental da UNESP/Rio Claro-SP (solo referência).

As amostras foram disponibilizadas, individualmente, em quatro caixas contendo cinco indivíduos cada, totalizando 20 minhocas para cada amostra. Todas as amostras tiveram sua capacidade de campo ajustadas para 80% de umidade. Para garantir a mesma quantidade de água durante todo o experimento, os recipientes foram pesados em dias alternados e o peso corrigido com equivalente acréscimo de água.

Um dia antes da exposição, todas as minhocas foram colocadas em um recipiente contendo sílica úmida com bolas de vidro, com a finalidade de terem seus conteúdos gastrointestinais liberados.

Para os testes realizados com *E. andrei*, foram considerados, como parâmetro de toxicidade, a taxa de mortalidade registrada e a perda de peso observada para os oligoquetas sobreviventes. A certificação da perda de peso dos indivíduos foi feita pela pesagem total dos cinco espécimes presentes em cada caixa, antes e após a realização do experimento.

4.8.2. Análise histológica do intestino

4.8.2.1. Inclusão em resina (Historesina)

O estudo histológico do intestino de *E. andrei*, submetidas às diferentes concentrações testadas do LE, seguiu o protocolo descrito por Junqueira e Junqueira (1983).

Cinco exemplares de *E. andrei*, expostos a cada uma das concentrações de LE e ao solo referência foram dissecados para extração dos intestinos. O intestino foi fixado em solução de paraformaldeído a 4% e NaCl a 9% em tampão fosfato 10% (0.1M – pH 7.5), sendo conservado em geladeira por tempo indeterminado. O material foi desidratado em baterias de etanol (70, 80, 90 e 95%), em banhos de 15 minutos cada. Logo após os banhos, o material foi transferido para a solução de resina (Leica), por 24 horas, em geladeira.

Posteriormente, as amostras foram transferidas para moldes plásticos previamente preenchidos com resina contendo catalisador. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados em micrótomo. Os cortes de 3 μm de espessura foram hidratados e recolhidos em lâminas de vidro. Depois de secas, as lâminas contendo as secções foram submetidas às técnicas de coloração. As secções foram examinadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio de luz, para comparação dos resultados histológicos obtidos entre o teste CN e os tratamentos.

4.8.2.1.1. Coloração com Hematoxilina/Eosina (Junqueira; Junqueira, 1983).

As lâminas foram distribuídas em cubetas e hidratadas com água destilada por 5 minutos. Em seguida, a água presente na cubeta foi substituída por hematoxilina, permanecendo em contato com as lâminas por 10 min. Após reação com água, por 4 minutos, as lâminas foram coradas por 5 min em eosina. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente, para retirada do excesso de corante, secas e montadas em resina sintética.

4.8.2.1.2. Coloração com Azul de Bromofenol (Pearse, 1985)

A avaliação da presença de proteínas as células intestinais foi realizada dispondo as lâminas em cubetas, para serem coradas, por 1 h e em temperatura ambiente, com azul de bromofenol. Em seguida, o corante foi substituído por ácido acético 0,5% por 5 min. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, secas e montadas em resina sintética.

4.8.2.1.3. Técnica de PAS - Ácido periódico-Schiff (Junqueira; Junqueira, 1983).

Para verificar a presença de polissacarídeos neutros, as lâminas foram dispostas, por 10 min, em cubetas contendo ácido periódico 0,4%. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram submetidas, em ambiente escuro, ao Reativo de Schiff por 1 hora. Em seguida, o reativo foi substituído por água sulfurosa por 1min. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente por 15 minutos. Posteriormente, as lâminas foram contracoradas com verde de metila por 20 segundos, secas e montadas em resina sintética.

4.8.2.1.4. von Kossa (Junqueira; Junqueira, 1983).

Para as análises da identificação da presença de cálcio, as lâminas foram colocadas em cubetas com nitrato de prata (ambiente escuro), por 20 min. Após lavagem em água corrente, as lâminas foram submetidas ao Revelador D-72 por 2 min e, em seguida, ao Tiossulfato 5% por 30 min. A seguir, as lâminas foram lavadas com água destilada. Posteriormente, as lâminas foram contracoradas com vermelho neutro 1%, por 4 min. Decorrido esse período, as lâminas foram lavadas novamente em água corrente, secas e montadas em resina sintética.

4.9. Ensaios com embriões de *Danio rerio* (zebrafish)

4.9.1. Manutenção dos peixes

Machos e fêmeas adultos da espécie *D. rerio*, obtidos em piscicultura, foram mantidos em aquários separados, preparados com água reconstituída (Instant Ocean 90 mg/L; 0,58 M

$CaSO_4 \cdot 2H_2O$ em água ultrapura) na temperatura de 27 ± 1,5 ºC e com fotoperíodo de 12 h. Os peixes foram alimentados com alimento seco, duas vezes ao dia, e esporadicamente, com larvas de *Artemia* sp uma vez ao dia.

4.9.2. Postura dos ovos

Um dia antes do ensaio, três machos e cinco fêmeas foram colocados juntos em tanques de acasalamento, antes do início do período noturno. O acasalamento, fertilização e desova ocorreram em aproximadamente 30 min, após o início do período de luz. Após a postura, os ovos viáveis foram removidos dos tanques, transferidos para um recipiente contendo água reconstituída e mantidos sob as mesmas condições dos adultos.

4.9.3. Teste de toxicidade com embriões de *D. rerio* (FET, ISO 15088, 2007)

Para o teste de embriotoxicidade, foram utilizados embriões com 24 horas de pós-fertilização, pois neste estágio há uma redução das chances de ocorrer danos ocasionados pela manipulação dos embriões, garantido que o efeito observado seja apenas decorrente da ação da substância testada.

Para a realização do teste, foi colocado, em cada um dos 24 poços da placa, um embrião e 2 mL da amostra a ser testada. A exposição foi feita por 48 horas. Decorrido esse período, foram contabilizados os indivíduos mortos, com deformidades e com atraso na eclosão (formação de edemas no coração ou saco vitelínico, malformação da cauda, diferenças no padrão de pigmentação e ausência de movimento). Cada ensaio foi realizado em duplicata, mantendo sempre uma linha de CN por placa.

Para o extrato orgânico, foram testadas as concentrações de 1:500, 1:1500 e 1:5000. Já para os extratos aquosos, a concentrações utilizadas foram de 25, 5 e 2%. Também foram testadas diversas concentrações de *m*-cresol e *p*-cresol, os quais, segundo a análise química, eram os principais contaminantes presentes no LE. Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água reconstituída, de forma a manter a mesma concentração de sais dos aquários de manutenção dos peixes. Um CN foi feito com 0,2% de DMSO, para o extrato orgânico, e com água reconstituída, para o extrato aquoso e para os cresóis.

As concentrações não tóxicas determinadas neste ensaio serviram de padrão para a realização das análises de expressão gênica.

4.9.4. Ensaio de expressão gênica de CYP1A com embriões de *D. rerio*

Embriões saudáveis com 24 h de desenvolvimento foram selecionados e distribuídos em placas de 6 poços. Nos poços das placas foram colocados placas de Petri de vidro de 3 cm de diâmetro. Em cada poço, foram colocados 10 embriões e 2,5 mL de amostra. O CN foi realizado com 0,2% de DMSO, para o extrato orgânico, e com água reconstituída, para os extratos aquosos. O CP foi realizado com β-Naftoflavona a 250 μg/L. Cada tratamento ou controle foi realizado em quintuplicata.

Após 48 h, a solução foi removida das placas e os embriões foram, imediatamente, congelados e mantidos a -80ºC, até serem processados.

4.9.4.1. Extração de RNA

A extração de RNA total dos embriões congelados foi realizada utilizando o protocolo Trizol® (Invitrogen, Eugene). A concentração de RNA foi medida por espectrofotometria, absorção a 260 nm, em NanoDrop ND-8000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). O RNA foi tratado com DNAseI (Quiagen), para remover contaminações por DNA genômico. Quantidades variando de 1 μg a 100 ng de RNA tratado foi transcrito para cDNA, utilizando o Kit 'First Strand cDNA Synthesis" da Roche (F Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland), e estocado a -20 ºC. A quantificação dos transcritos específicos foi feita com alíquotas de 100 ng do RNA total, em PCR real time (F. Hoffmann-La Roche) utilizando SYBR® Green Mix (Roche, Germany).

O par de primers para o gene CYP1A de *D. rerio* (GeneBank acesso número AB078927) foram Fw-GGTTAAAGTTCACCGGGATGC, Rv-CTGTGGTGTGACCCGAAGAAG. A abundância relativa de mRNA foi calculada a partir da segunda derivativa máxima de sua curva de amplificação e comparada com o CN.

4.10. Cultura de células de mamífero

Células de hepatoma humano (HepG2 - Human-derived hepatoma cell line) também foram utilizadas como sistema-teste. As células foram cultivadas em meio MEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco) e 0,1% de solução de antibiótico/antimicótico (10.000 U.I./mL de penicilina e 10 mg/L de estreptomicina), sendo mantidas em frascos de cultura descartáveis de 25 cm^2 em estufa BOD a 37°C, com 5% de CO_2.

4.10.1. Avaliação da citotoxicidade - Teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

O teste do MTT foi realizado em placas de ELISA de 96 poços, de acordo com o protocolo proposto por de Mosmann (1983), com algumas modificações. Os tratamentos foram dispostos na placa seguindo o esquema abaixo.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	B	CN	CN	CN	CN	CN	B	CN	CN	CN	CN	CN
B	B	CP	CP	CP	CP	CP	B	CP	CP	CP	CP	CP
C	B	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]	B	[1]	[1]	[1]	[1]	[1]
D	B	[2]	[2]	[2]	[2]	[2]	B	[2]	[2]	[2]	[2]	[2]
E	B	[3]	[3]	[3]	[3]	[3]	B	[3]	[3]	[3]	[3]	[3]
F	B	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]	B	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]
G	B	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	B	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]
H	B	CN	CN	CN	CN	CN	B	CN	CN	CN	CN	CN

B: Branco; CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; [1] a [5]: diferentes concentrações da amostra.

Para o ensaio do MTT (CAS n. 298-93-1, Sigma), foram semeadas $2{,}34.10^4$ células HepG2 por poço, em um volume total de 100 µL de meio de cultura com soro e incubadas por um período de 24 horas. Nos poços designados como B, não foram semeadas células e foram preenchidas somente com meio de cultura. Decorrida às 24 horas, o meio foi retirado e substituído por um novo meio de cultura (sem soro), juntamente com os tratamentos, em um volume final de 200µL. Nos poços destinados aos testes CN, não houve adição de nenhum tratamento (somente meio de cultura sem soro). Nos destinados ao CP, houve adição de Triton X-100 (1%). Nos demais poços foi adicionado o extrato aquoso do LE inicial (tempo 0) nas concentrações de 5, 10, 15, 25 e 50 µL/ mL de meio de cultura, sendo uma amostra para cada poço. Os tratamentos permaneceram nos poços por um período de 24 horas. Posteriormente, os tratamentos foram retirados e adicionados 150 µL de MTT, diluído em PBS (tampão fosfato salino), na concentração de 1.10^{-6} mg/mL. A placa foi incubada por 4 horas em estufa a 37º C. Após este período, a solução de MTT foi descartada e foi adicionado, em cada poço, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO).

As placas foram lidas em espectofotômetro com leitor de microplaca (Aparelho Multiskan FC – Thermo Scientific) em filtro de 540 nm. As concentrações abaixo de 80% de viabilidade foram consideradas citotóxicas.

A partir do ensaio do MTT, foram estabelecidas as concentrações não citotóxicas dos extratos aquosos do LE, para posterior realização do teste do MN.

4.10.2. Teste do micronúcleo em células mantidas em cultura

Para a realização do teste do micronúcleo com células mantidas em cultura, foi utilizada a técnica descrita por Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações, como segue: as células foram cultivadas por um ciclo celular completo (24 horas), antes da adição dos tratamentos. Em seguida, foram realizados tratamentos simultâneos de 24 horas, com a adição de 50 μL das diferentes concentrações dos extratos aquosos das amostras (três frascos para cada amostra), após os diferentes períodos de atenuação natural. O CP foi feito adicionando, 50 μL de MMS ($4x10^{-2}$M) e o CN, 50 μL de PBS.

Após os tratamentos, as células foram lavadas por duas vezes com PBS. Foram adicionados aos frascos, 5 mL de meio de cultura completo com 3 μg/mL de citocalasina B. Após 28 horas de incubação, as células foram colhidas e fixadas em Carnoy (metanol/ácido acético 3:1 – v:v). A seguir, foram depositadas algumas gotas da cultura de células sobre lâminas limpas, geladas e contendo um filme de água. Após secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 5 minutos.

Foram analisadas, sob microscopia de luz (aumento de 1000 vezes), cerca de 6000 células por tratamento, sendo contabilizadas duas lâminas, com aproximadamente 1000 células cada, para cada uma das triplicatas realizadas. Foram consideradas na análise, apenas células binucleadas que apresentavam com membrana citoplasmática e envoltório nuclear íntegros, além de núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração. A presença de MN nessas células foi considerada como potencial mutagênico do extrato aquoso do LE. Os resultados dos ensaios foram comparados pelo teste de Mann-Whitney ($p<0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Peso seco das amostras

O peso seco das amostras determina a massa das partículas sólidas presentes em um solo ou em um resíduo sólido, isenta totalmente de qualquer umidade. O valor do peso seco é usado para se calcular, corretamente, a quantidade de material a ser usado para a obtenção do solubilizado (extrato aquoso) e para ajustar a capacidade de campo da amostra. Os resultados obtidos, em relação ao peso seco, para todas as amostras, tanto no tempo inicial como após atenuação por 2, 6 e 12 meses, podem ser observados na Tabela 1.

Pelos resultados observados, pode-se perceber que, no ensaio inicial e após 2 meses de biodegradação, o LE puro ainda reteve uma grande quantidade de água, sendo composto de menos de 20% de material sólido (partículas sólidas). Após 6 meses de biodegradação, foi observado um aumento nos valores de peso seco para 33%, sendo que nas amostras de 12 meses, esse parâmetro chegou a quase 45%. Dessa forma, pode-se perceber um aumento gradual no número de partículas sólidas do LE puro, após 12 meses de biodegradação. Em relação às associações de solo/LE, observamos que, quanto maior a quantidade de LE das amostras menor o valor do seu peso seco, devido ao LE apresentar uma maior quantidade de água, quando comparado ao solo referência.

Tabela 1. Média e desvio padrão do peso seco do solo, do lodo de esgoto (LE) e das diferentes associações de solo/LE.

Peso Seco (%) / Amostras	Amostra inicial	Amostra 2 meses	Amostra 6 meses	Amostra 12 meses
SOLO	87,289 ± 0,226	–	–	–
LE 10%	81,229 ± 0,436	80,046 ± 0,131	84,872 ± 0,114	80,540 ± 0,244
LE 25%	68,233 ± 0,472	69,685 ± 0,450	84,392 ± 0,060	77,328 ± 0,206
LE 50%	53,229 ± 0,121	55,236 ± 1,007	80,710 ± 0,353	74,657 ± 0,263
LE 100%	19,336 ± 0,061	19,991 ± 0,143	33,107 ± 2,080	43,966 ± 0,411

5.2. Capacidade de campo das amostras

A capacidade de campo foi definida por Veihmeyer e Hendrickson (1931) como sendo o volume máximo aproximado de água que um solo bem drenado pode armazenar por longos períodos sem evapotranspiração, depois que o excesso de água tenha sido drenado.

O conhecimento do valor da capacidade de campo das amostras é importante porque permite ajustar a umidade ideal para a realização de ensaios com organismos vivos. Os dados referentes a essa propriedade, para as amostras de solo/LE utilizados neste trabalho, encontram-se na Tabela 2.

A partir dos resultados encontrados, foi possível observar que o LE possui a maior capacidade de campo, em comparação com todas as demais amostras, sendo que quanto maior a quantidade de LE presente na associação, maior foi a sua capacidade de campo. Também foi possível observar que houve uma pequena alteração nos valores das amostras de uma mesma associação dos LE 10% e 25%, em relação aos períodos inicial e após permanecerem enterradas por 2, 6 e 12 meses, evidenciando que as amostras mantiveram suas propriedades físicas semelhantes, pelo menos para essa característica. Isso deve-se ao fato dessas amostras serem constituídas, em sua maior parte, por solo natural, o qual não sofre tanta alteração em sua composição, pois encontra-se estabilizado agronomicamente.

Ao longo do período de biodegradação, foi observada para a concentração de LE 50% e 100% uma alteração mais expressiva na capacidade de campo. Tal alteração pode estar relacionada com uma diminuição na concentração de matéria orgânica presente no LE, pois, segundo Maia, Morais e Medeiros (2005), a matéria orgânica é fortemente higrófila em função de suas cargas negativas e da sua alta superfície específica, o que faz com que o seu poder de retenção de água seja mais elevado (4 a 6 vezes o seu peso). Dessa forma, uma diminuição no teor de matéria orgânica levaria a uma menor retenção de água pelo LE e a sua consequente diminuição da capacidade de campo.

Foi possível observar uma alteração na textura do LE (entre 2, 6 e 12 meses de atenuação), como pode ser visualizado na Figura 2. Além disso, pode-se notar um acúmulo crescente de raízes que se desenvolveram nas amostras, após 6 e, principalmente, 12 meses, possivelmente relacionado com a diminuição da toxicidade do LE.

Tabela 2. Média e desvio padrão da capacidade de campo do solo, do LE e das diferentes associações de solo/LE.

CC (%) / Amostras	Amostra Inicial	Amostra 2 Meses	Amostra 6 Meses	Amostra 12 Meses
SOLO	31,933 ± 1,476	–	–	–
LE 10%	31,121 ± 0,775	33,878 ± 1,355	32,910 ± 0,938	33,600 ± 0,604
LE 25%	34,543 ± 0,571	32,591 ± 0,267	37,415 ± 0,825	35,942 ± 0,625
LE 50%	55,428 ± 1,725	44,619 ± 0,733	41,382 ± 0,442	43,121 ± 0,591
LE 100%	80,792 ± 0,083	82,627 ± 0,209	74,923 ± 0,859	71,841 ± 1,429

CC: Capacidade de Campo

Figura 2. Aspecto físico do lodo de esgoto (LE), após diferentes períodos de atenuação natural. A. LE após 2 meses de biorremediação; **B.** LE após 6 meses de biorremediação. Notar o aparecimento de inúmeras raízes secundárias delgadas; **C.** LE após 12 meses de biodegradação. Notar o aparecimento de raízes mais desenvolvidas.

5.3. Obtenção dos extratos aquosos (solubilizados)

A partir da obtenção dos solubilizados, também foi possível observar que a presença de LE altera as propriedades do solo. Como pode ser visualizado na Figura 3, houve uma mudança significativa no padrão de coloração entre os solubilizados das amostras enterradas por 2, 6 e 12 meses, especialmente quando comparamos o solo 100% e o LE 10%. A pequena quantidade de LE na amostra ocasionou a decantação de partículas em suspensão, tornando o solubilizado transparente. Também foram observadas alterações, quanto à coloração e transparência das amostras, entre as mesmas associações para os diferentes períodos de biodegradação. Foi possível observar um aumento na transparência, quanto maior o período de degradação, principalmente para as amostras de LE 50 e 100%.

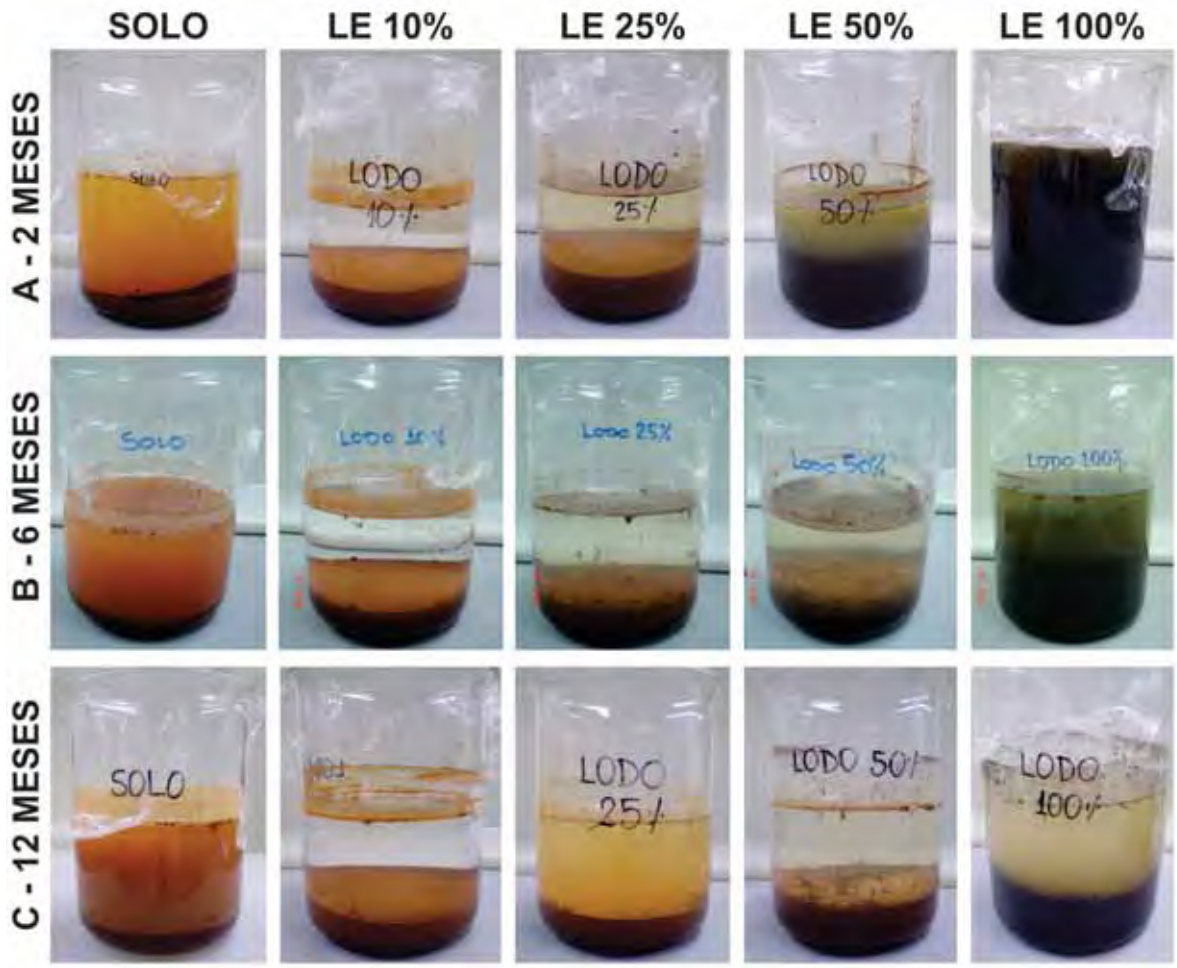


Figura 3. Solubilizados de solo referência, associações solo/LE (10%, 25% e 50% de LE) e LE 100% obtidos após diferentes períodos de atenuação natural. A. Solubilizado após 2 meses de biorremediação; **B.** Solubilizado após 6 meses de biorremediação; **C.** Solubilizado após 12 meses de biorremediação.

5.4. Análise granulométrica e caracterização do solo referência

Os resultados referentes à caracterização do solo do Jardim Experimental da UNESP de Rio Claro, utilizado para o preparo e recepção das amostras, quanto a sua granulometria, matéria orgânica e condutividade elétrica, estão expressos nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Quantidade de matéria orgânica e condutividade elétrica do solo referência.

Amostra	**Matéria Orgânica** (g/kg)	**Condutividade elétrica** (dS/m)
Solo	26	146,7

Condutividade elétrica – condutivímetro (1:2,5).

Tabela 4. Análise granulométrica do solo referência.

Amostra	**Areias** (g/kg)						**Silte** (g/kg)	**Argila** (g/kg)		**Floculação** (%)	**Classe de Textura**
	MG	G	M	F	MF	AT		c/disp.	água		
Solo	6	16	119	257	72	469	79	451	100	78	argilosa

MG: muito grossa; G: grossa; M: média; F: fina; MF: muito fina; AT: areia total; c/disp.: com dispersante.

A matéria orgânica do solo constitui o principal fator da sua fertilidade, proporcionando um aumento na produtividade da cultura. A matéria orgânica também contribui para a reestruturação do solo, por contribuir com o aumento da porosidade, que melhora a permeabilidade e a infiltração nos solos argilosos, reduzindo a vulnerabilidade do solo à compactação, à erosão, à desertificação e aos deslizamentos, além de aumentar a capacidade de troca de cátions (ANDRADE; ABREU, 2006). De acordo com Alvarez et al. (1999), o solo utilizado neste estudo possui uma quantidade média de matéria orgânica (26 g/kg), sendo que os valores de matéria orgânica considerados ideais estão entre 40,1 e 70 g/kg.

O teor de carbono orgânico de um solo é medido pela quantidade de carbono presente nas misturas heterogêneas de substâncias simples e complexas deste solo. O carbono orgânico é um elemento essencial da estrutura do solo, porque, quanto maior o seu valor, melhor é o ambiente físico para a penetração das raízes. Como pode ser observado na Tabela 3, a quantidade de carbono orgânico do solo 100% é de apenas 26 g/kg. Sendo assim, a utilização do LE em solo, o qual apresenta uma maior quantidade de carbono orgânico, pode contribuir para o aumento da sua fertilidade.

A condutividade elétrica é outro parâmetro que auxilia na caracterização do solo, pois, de acordo com Andrade e Abreu (2006), ela permite monitorar a quantidade total de sais solúveis presentes, sendo importante para avaliar o solo quando se adiciona resíduos a ele, uma vez que esta adição pode levar a um acúmulo de sais neste solo.

Em relação à classe textural do solo, pela análise realizada, o solo utilizado é do tipo argiloso, muito comum em nosso estado (PRADO, 2000).

5.5. Avaliação da ação do LE sobre a germinação de sementes de *A. cepa*

Durante a realização do ensaio de aberrações cromossômicas e teste do MN com o organismo *A. cepa*, foi possível verificar visualmente alterações no padrão de germinação de

sementes ao longo do período de atenuação natural (Figura 4). A amostra de LE 100% inicial inibiu o crescimento das raízes (Figura 4 G). Neste caso, as raízes estavam muito menores que as do CN e do solo referência. A amostra de LE 100% (Figura 4 H), após 2 meses de atenuação natural, bem como o solubilizado das amostras de LE 100%, nos tempos 0 e 2 meses (Figura 4 C), inibiram a germinação de todas sementes presentes na placa. Após 6 meses de atenuação natural, foi observado que a amostra de LE 100% e seu respectivo solubilizado induziram a uma leve inibição no crescimento das raízes (Figuras 4 D e I), porém, esse efeito foi minimizado nas amostras de 12 meses (Figuras 4 E e J). Os padrões de germinação e crescimento das raízes das demais amostras (associações de solo/LE) apresentaram-se similares aos do CN (Figura 4 A) e do solo referência (Figuras 4 B e F).

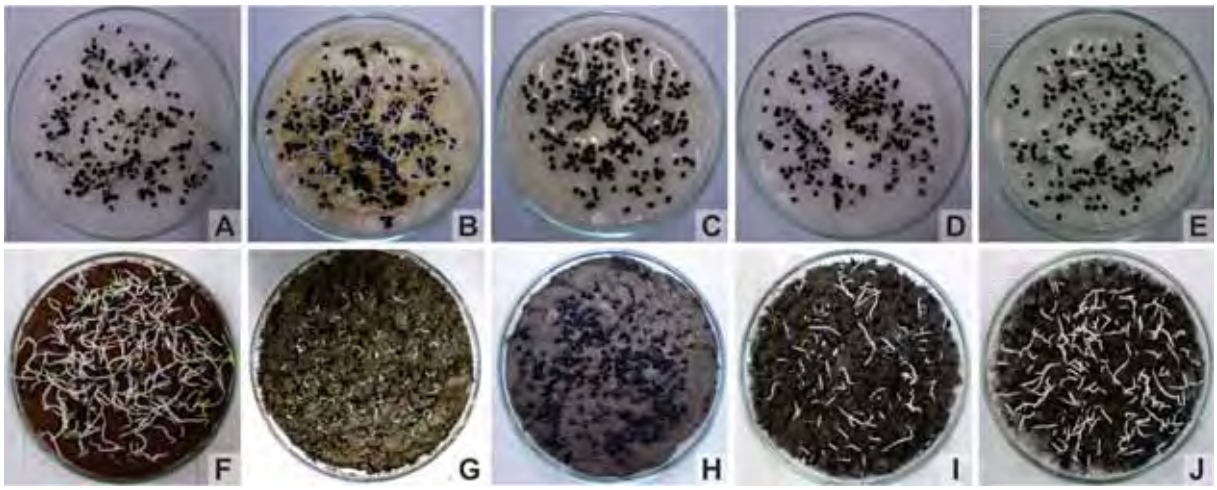


Figura 4. Variação na germinação e no crescimento das raízes de sementes de *A. cepa* expostas à diferentes concentrações de LE, após os períodos de 0, 2, 6 e 12 meses de atenuação natural. A. Controle negativo (água ultra pura); **B.** Controle ambiental (solubilizado de solo referência); **C.** Solubilizado de LE 100%, após 0 e 2 meses de atenuação natural; **D.** Solubilizado de LE 100%, após 6 meses de atenuação natural; **E.** Solubilizado de LE 100%, após 12 meses de atenuação natural; **F.** Controle ambiental (solo referência); **G.** LE 100%, após 0 meses de atenuação natural; **H.** LE 100%, após 2 meses de atenuação natural; **I.** LE 100%, após 6 meses de atenuação natural; **J.** LE 100%, após 12 meses de atenuação natural.

5.6. Avaliação da mutagenicidade pelo ensaio de *Salmonella*/microssoma – Teste de Ames (Protocolo de Pré-Incubação)

As tabelas 5 e 6 apresentam os resultados obtidos com teste de Ames para o LE no tempo 0 e 2 meses de atenuação natural, respectivamente. Em decorrência da ausência da atividade mutagênica para ambas as amostras testadas e da indução de uma possível resposta citotóxica por essas amostras, essa metodologia foi substituída pelo teste de Kado o qual é considerado mais indicado para a avaliação da atividade mutagênica de amostras ambientais,

além de apresentar uma maior sensibilidade aos contaminantes, quando comparado ao teste de Ames.

Tabela 5. Resultados do teste de mutagenicidade com as linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium* com as diferentes doses do extrato orgânico do LE inicial (tempo 0).

Linhagem	Dose	Revertentes	Média ± DP	Previsão de Bernstein	Valor de P (ANOVA)	Valor de P (Bernstein)	Slope
TA98-S9	0,000	21 22 23 25 16	21,40 ± 3,36	20,83	0,421	0,328	0,371
	0,025	24 26 15	21,67 ± 5,86	20,83			
	0,050	24 18 15	19,00 ± 4,58	20,83			
	0,100	21 16 17	18,00 ± 2,65	20,84			
	0,200	26 15 24	21,67 ± 5,86	20,86			
	1,000	31 27 22	26,67 ± 4,51	21,01			
	5,000	20 25 18	21,00 ± 3,61	21,73			
TA98+S9	0,000	18 27 31 26 31	26,60 ± 5.32	26,35	0,708	0,794	0,874[a]
	0,025	25 25 27	25,67 ± 1.15	26,32			
	0,050	22 37 22	27,00 ± 8.66	26,30			
	0,100	31 28 23	27,33 ± 4.04	26,25			
	0,200	29 38 25	30,67 ± 6.66	26,15			
	1,000	14 18 31	21,01 ± 8.89	25,32			
	5,000	09 26 31	21,73 ± 11.53	21,20			
TA100-S9	0,000	155 180 159 174 191	171,80 ± 14,89	159,46	0,141	0,173	0,934[a]
	0,025	175 159 115	149,67 ± 31,07	159,33			
	0,050	172 163 181	172,00 ± 9,00	159,24			
	0,100	173 181 151	168,33 ± 15,53	159,02			
	0,200	166 134 181	160,33 ± 24,01	158,59			
	1,000	129 123 134	128,67 ± 5,51	155,10			
	5,000	163 98 170	143,67 ± 39,70	137,68			
TA100+S9	0,000	199 192 143 202 164	180,00 ± 25,56	183,45	0,720	0,816	0,122
	0,025	172 186 208	188,67 ± 18,15	183,53			
	0,050	171 201 199	190,33 ± 16,77	183,59			
	0,100	167 182 176	175,00 ± 7,55	183,74			
	0,200	207 180 188	191,67 ± 13,87	184,03			
	1,000	203 184 161	182,67 ± 21,03	186,36			
	5,000	195 202 199	198,67 ± 3,51	198,04			

Controle positivo −S9 mix: 4NQO (0,05µg/µL): 406,00 ± 49,50 (TA98), 4312,00 ± 248,90 (TA100); +S9 mix: 2AA (0,25 µg/µL): 644,00 ± 55,15 (TA98) e 5912,00 ± 1470,78 (TA100).

[a]Possível resposta citotóxica.

Tabela 6: Resultados do teste de mutagenicidade com as linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium* com as diferentes doses do extrato orgânico do LE 100%, após 2 meses de atenuação natural.

Linhagem	Dose	Revertentes	Média ± DP	Previsão de Bernstein	Valor de P (ANOVA)	Valor de P (Bernstein)	Slope
TA98-S9	0,000	21 22 23 25 16	21,40 ± 3,36	20,29	0,620	0,530	0,332
	0,025	11 19 18	16,00 ± 4,36	20,30			
	0,050	17 29 18	21,33 ± 6,66	20,31			
	0,100	17 26 23	22,00 ± 4,58	20,32			
	0,200	27 18 18	21,00 ± 5,20	20,35			
	1,000	27 20 21	22,67 ± 3,79	20,58			
	5,000	19 15 30	21,33 ± 7,77	21,74			
TA98+S9	0,000	18 27 31 26 31	26,60 ± 5,32	26,63	0,519	0,693	0,073
	0,025	20 25 24	23,00 ± 2,65	26,66			
	0,050	29 29 24	27,33 ± 2,89	26,68			
	0,100	25 33 30	29,33 ± 4,04	26,74			
	0,200	25 32 25	27,33 ± 4,04	26,85			
	1,000	28 27 34	29,67 ± 3,79	27,73			
	5,000	19 38 38	31,67 ± 10,97	32,15			
TA100-S9	0,000	155 180 159 174 191	171,80 ± 14,89	153,64	0,033	0,080	0,895[a]
	0,025	121 114 135	123,33 ± 10,69	148,27			
	0,050	169 133 125	142,33 ± 23,44	144,69			
	0,100	150 131 159	146,67 ± 14,29	135,73			
	0,200	167 168 149	161,33 ± 10,69				
	1,000	169 159 165	164,33 ± 5,03				
	5,000	117 176 117	136,67 ± 34,06				
TA100+S9	0,000	199 192 143 202 164	180,00 ± 25,56	166,17	0,213	0,153	0,367
	0,025	181 124 146	150,33 ± 28,75	166,19			
	0,050	153 163 131	149,00 ± 16,37	166,21			
	0,100	207 173 168	182,67 ± 21,22	166,25			
	0,200	171 168 163	167,33 ± 4,04	166,34			
	1,000	159 178 176	171,00 ± 10,44	167,03			
	5,000	170 176 163	169,67 ± 6,51	170,46			

Controle positivo −S9 mix: 4NQO (0,05µg/µL): 406,00 ± 49,50 (TA98), 4312,00 ± 248,90 (TA100); +S9 mix: 2AA (0,25 µg/µL): 644,00 ± 55,15 (TA98) e 5912,00 ± 1470,78 (TA100).

[a]Possível resposta citotóxica.

5.7. Avaliação da ação do LE sobre células HepG2 mantidas em cultura

5.7.1. Avaliação da ação citotóxica do LE sobre cultura de células

O teste do MTT foi feito para se determinar quais seriam as maiores concentrações possíveis de serem utilizadas no teste do MN, sem que elas induzissem morte celular nas células HepG2. O teste do MTT baseia-se na habilidade de células viáveis conseguirem converter o sal MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Este sal é solúvel em água e é convertido, por células viáveis, em um sal insolúvel de coloração roxa. Este produto não consegue atravessar as membranas celulares de células viáveis, acumulando-se em seu interior (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Na Tabela 7, estão apresentados os resultados obtidos nos ensaios realizados com o extrato aquoso do LE 100% nas diferentes concentrações testadas (5, 10, 15, 25 e 50 µL/mL de meio de cultura). Como o LE 100% apresenta uma quantidade maior de substâncias tóxicas e pode ser mais prejudicial para as células, decidiu-se realizar um ensaio apenas com este solubilizado em diferentes concentrações, assumindo que para os demais solubilizados, possivelmente a citoxicidade seria menor. Na repetição 1 (Tabela 5), a concentração de 10 µL/mL de meio foi a única a apresentar uma viabilidade acima de 80%, sendo que a média das duas repetições também indica uma viabilidade acima de 80%.

Tabela 7. Citotoxicidade do solubilizado do LE 100% em diferentes concentrações em células HepG2.

Concentrações LE 100%	**5 µL**	**10 µL**	**15 µL**	**25 µL**	**50 µL**
Viabilidade Repetição 1	78,81%	92,07%	76,72%	62,09%	59,68%
Viabilidade Repetição 2	63,62%	72,58%	69,97%	75,06%	64,34%
Média	71,215%	82,325%	73,345%	68,585%	62,01%

5.8. Artigos

Artigo 1. Endpoints and bioassays to assess bioremediation efficiency of contaminated soils

RESUMO

O processo de biorremediação, utilizado na descontaminação ambiental, emprega organismos vivos, principalmente microrganismos, ou suas enzimas, para limpeza de locais contaminados. É considerado uma tecnologia de baixo custo, efetiva e de baixo impacto. Na maioria dos casos, a biorremediação mineraliza os contaminantes ou diminui a sua toxicidade. Contudo, existem estudos que mostram que durante tal processo pode ocorrer a formação de metabólitos ainda mais tóxicos do que o composto original. Entre os diferentes meios físicos, o solo é o destino de vários poluentes provenientes, principalmente, de descarga industrial, acidentes, derrames e descarte de resíduos. Devido à sua capacidade de reter alguns tipos de substâncias, o processo de dispersão é mais difícil de ocorrer, sendo que muitos resíduos podem persistir no solo. Os bioensaios são utilizados para determinar os efeitos biológicos nocivos de substâncias químicas ou de amostras ambientais complexas e podem ser desenvolvidos com células, tecidos, órgãos ou com todo o organismo. Tais testes podem ser realizados com diferentes espécies (por exemplo, bactérias, fungos, algas, plantas e animais) para avaliar muitos parâmetros (morte, dano no DNA, efeitos morfológicos e fisiológicos, entre outros), tanto em condições de laboratório como de campo. Atualmente, o uso de bioensaios tem sido recomendado para avaliar a eficiência de biorremediação, uma vez que é possível prever uma resposta tóxica causada pelos possíveis metabólitos originados no processo. Assim, o objetivo desta revisão foi abordar os principais *endpoints* e bioensaios que são utilizados para estimar a eficácia de processos de biorremediação de solos contaminados. Além disso, este trabalho pretende destacar os testes biológicos que são comumente usados para monitorar a biorremediação de solos contaminados, bem como os ensaios que apresentam as respostas mais adequadas, na tentativa de relacioná-los a um determinado tipo de contaminantes ou de características do solo.

Palavras-chave: Biodegradação, ensaios biológicos, metabólitos tóxicos, fitorremediação, bioaumentação, biopilhas, landfarming.

ABSTRACT

Bioremediation process, used to promote the environmental decontamination, utilizes living organisms, mainly microorganisms, or their enzymes, to clean-up contaminated sites. It is considered an effective, low cost and low impact technology. In most cases, bioremediation mineralizes contaminants or reduces their toxicity. However, there are studies that show the formation of even more toxic metabolites than the original compound during such process. Among the environments, the soil is the destination of several pollutants derived from industrial discharge, accidents, spills and waste disposal. Due to its capacity to retain some types of substances, the dispersion process is more difficult to occur and many residues can persist in the soil. Bioassays are used to determine harmful biological effects of chemicals or mixtures in environmental samples and can be carried out with cells, tissues, organs or with the entire organism. Such tests can be performed with different species (e.g., bacteria, fungi, algae, plants and animals) to assess many endpoints (death, DNA damage, morphological and physiological effects and others), both in laboratorial and field conditions. Currently, the use of bioassays has been recommended to evaluate the bioremediation efficiency since they can predict a toxic response caused by possible metabolites originated in the process. Thereby, the aim of this review is to approach the main endpoints and bioassays that are used to estimate the bioremediation effectiveness of contaminated soils. Furthermore, this work intends to emphasize the biological tests that are commonly used to monitor the bioremediation of contaminated soils, as well as assays that have appropriate responses, attempting to relate them to a particular type of contaminant or soil characteristics.

Keywords: Biodegradation, biological assays, toxic metabolites, phytoremediation, bioaugmentation, biopiles, landfarming.

1. INTRODUCTION

Soil is the central component of the terrestrial ecosystems and, due to its numerous functions, it plays an essential role for the maintenance of life. It is a source of nutrients and provides habitats for plants and animals (YU ET AL., 2013). For humans, soil is essential to supply food and fibres (GLANZ, 1995), and is the base of agriculture and animal productivity (DORAN; ZEISS, 2000). Because of its intense microbial activity, soil is considered an ideal medium for decomposition of plant and animal residues and chemical transformation

(DORAN; ZEISS, 2000). Besides this, soil is also important to the protection of groundwater quality due to its filter property (SEABRA, 2005).

However, the increase in the introduction of contaminants may interfere in the correct functioning of this environment. According to White and Claxton (2004), waste disposal; intentional or accidental discharge of industrial materials; fossil fuel combustion; pesticide use; solid waste burning; leaks and spills during transportation and storage of chemical products are among the main causes of soil contamination.

Once the xenobiotic enters soil, it can suffer different processes, such as volatilization, degradation, leaching, absorption by plants or animals and sorption (HAIGH, 1996; STOKES; PATON; SEMPLE, 2005). The physico-chemical properties of the contaminant (e.g. vapour pressure, solubility, chemical stability and others) and the characteristics of soil (e.g. pH, presence of organic material and microorganisms, redox potential and others) influence which of the mechanism will operate and if the contaminant will or will not persist in the soil (HAIGH, 1996).

Thus, due to the frequent presence of xenobiotics and the persistence of specific contaminants in soil, besides the possibility to be source of contaminants for other environments, especially groundwater, the soil pollution is considered a global challenge and a serious environmental problem to be solved.

Different clean-up technologies can be applied to treat soil contamination. According to White and Claxton (2004), they can be classified in four types: physical (excavation, entombment and covering); chemical (washing, vacuum extraction, electro-reclamation for metal removal, oxidation, precipitation, reduction and adsorption to activated carbon); thermal (combustion); and biological (bioremediation). However, the use of bioremediation processes has been encouraged because they are considered effective, low cost and environmentally friendly (RUSSO; RIZZO; BELGIORNO, 2012). These processes use living organisms to degrade and mineralize pollutants, transforming them into less toxic compounds (ALEXANDER, 1994; EWEIS et al., 1998; BAMFORTH; SINGLETON, 2005). Nevertheless, the formation of toxic metabolites during the bioremediation has been reported by some studies (ALEXANDER, 1999; RANDERATH ET AL., 1999; PHILLIPS ET AL., 2000; ALEXANDER; TANG; ALEXANDER, 2002).

Generally, the bioremediation effectiveness is evaluated by chemical analyses that verify the presence or absence of target contaminant, but such analyses do not predict the effects of possible intermediary substances formed during the process. Therefore, to assure

the real bioremediation efficiency, biological assays must be used to monitor this process (HUND; TRAUNSPURGER, 1994).

According to Hansen et al. (2007) bioassays are tests that estimate deleterious biological effects of individual chemical compounds or a mixture of them, including environmental samples. To be considered efficient, bioassays require a quick and reliable methodology to characterize the extent of contamination and to measure contaminant bioavailability and toxicity (MAILA; CLOETE, 2005).

Maila and Cloete (2005) affirmed that the variability of soil properties must be considered when a bioassay is used in soil evaluation since these properties can interfere in the results. Thus, it is believed that further research should be done on soil bioindicators before they could be used to monitor contamination and bioremediation, by using more relevant ecological test species, by standardization of new assays or improvement of existing tests, and by the selection of relevant endpoints.

One of the most widely used bioassays to monitor soil bioremediation process is the Microtox® test. This method employs a bioluminescent bacterium (*Vibrio fischeri* or *Photobacterium phosphoreum*) as test organism. This assay measures the light intensity generated by the luminescent bacteria. A decrease in the produced bioluminescence means that the sample is toxic.

Seed germination and earthworm survival tests are also considered useful to be used for the same purpose due to their easy and simple methodology and moderate sensitivity to contaminants (MAILA; CLOETE, 2005).

Tests that assess parameters like reproduction represent important tools to evaluate ecosystem functions, since they allow predicting effects on population (HANSEN et al., 2007). Generally, the main organisms employed are crustaceans and earthworms.

Biological assays that detect genotoxic and mutagenic effects have also been used to verify the success of bioremediation. These tests assess the possibility of a compound interact with the genetic material causing DNA breaks or losses and mutations that can lead to cell death or to carcinogenic processes.

Thus, this chapter focuses on studies that apply, besides chemical analyses, bioassays to monitor soil bioremediation process. Different types of bioremediation technologies associated with several bioassays are discussed along the text to highlight the importance of the use of the biological tests as a complementary tool to chemical analyses.

2. DIFFERENT BIOREMEDIATION PROCESSES ASSOCIATED WITH BIOASSAYS

The objectives of soil remediation processes are based on threshold levels of soil contaminants. Bioremediation has been successful in several applications for contaminated soils, either by pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) or many other chemical compounds. Although, during the different bioremediation processes, it is very provable to occur changes both in bioavailability of those chemicals and metabolites formation. Thereby, it is necessary to incorporate ecotoxicity assays in conjunction with chemical analysis to assess the effectiveness of the bioremediation processes (FRUTOS et al., 2012)

2.1. *In situ* bioremediation

The process of *in situ* bioremediation of contaminated soils aims to initiate or stimulate the elimination of contaminants by biological pathway in the field without soil extraction. In this process, different organisms that could be introduced in the soil and/or the indigenous soil biota are stimulated *in situ* attempting to increase the local biological activity for possibly reducing the toxicity of contaminated soils (TRAPP, 2000 apud FRISCHE; HÖPER, 2003).

A study performed by Frische and Höper (2003) monitored the *in situ* bioremediation process of topsoil contaminated with 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and other contaminants, due to military activities that occurred during the Second World War on a site situated in northern Germany. The authors evaluated changes within 6 experimental fields (without, with medium, and with high contamination by TNT) for a 17-months remediation period and compared the toxicity results of soil microbial and luminescent bacteria assays with chemical monitoring analyses. They observed a significant reduction of the soil contaminants in the treated fields after the 17 months remediation period, detected by the luminescent bacteria assay. On the other hand, the soil microbial assay, that analyzes the abundance and activity of the indigenous soil microbial community, did not minimize the soil contamination after the 17 months of bioremediation, but it evidenced the persistent adverse effects of chronic TNT contamination on the site-specific microbial community associated to the local carbon cycle in the soil. As in contrast to luminescent bacteria assays, the study did not reveal recovery of the soil at the end of the remediation period (17 months), there is a clear evidence for persistent adverse effects of chronic TNT contamination on the site-specific microbial community and the local carbon cycle in the soil.

Steliga, Jakubowicz and Kapusta (2012) monitored the toxicity during and after *in situ* bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons, located in an oil and gas plant in Grabownica (Poland). In this study, the *in situ* bioremediation process was implemented during three years and in three different phases: initial remediation (drainage), basic bioremediation (by inoculation with an indigenous bacteria-based biopreparation, as species that use hydrocarbons as the only source of carbon), and inoculation (with an indigenous bacteria-based biopreparation enriched with selected fungi species, which are able to degrade hydrocarbons). By the chemical analyses of petroleum hydrocarbons, it was detected the presence of aliphatic hydrocarbons, n-alkanes, isoprenoids as pristane and phytane, aromatic hydrocarbons (benzene, toluene, ethylbenzene and xylene - BTEX and PAH) and heavy metals in several soil samples. The basic bioremediation carried out with Actinomycetales bacteria showed that such microorganisms are able to degrade aliphatic and aromatic hydrocarbons. Other important conclusion was that the phases of inoculation with fungi species added to the bacterial consortium substantially increased the effectiveness of long-chain aliphatic and aromatic hydrocarbons biodegradation. All the toxicological tests used (Microtox®, Ostracodtoxkit^{TM}, Phytotoxkit^{TM} and Ames) indicated that changes in toxicity during the *in situ* bioremediation were not connected with the decrease in the contents of petroleum contaminants, due to the formation of toxic metabolites. These assays also demonstrated that, after the *in situ* bioremediation process, non-toxicity (by the Microtox®, Ostracodtoxkit^{TM} and Phytotoxkit^{TM} tests) and non-mutagenicity (by the Ames test) were found in the soil. Analyzing these results, the authors indicated that the studied soil after bioremediation could be used for agricultural purposes.

2.2. Natural attenuation

Natural attenuation, also known as bioattenuation, refers to the decrease of the concentration of a certain contaminant in the soil as a result of a natural process, such as dilution, transformation, volatilization, sorption, run-off, volatilization, biodegradation and others (YONG; MULLIGAN, 2003; MEGHARAJ et al., 2011). Nevertheless, according to Megharaj et al. (2011), in nutrient-poor soils and without the presence of degrading microorganisms, this process become slow and inadequate and require other technologies to improve this method.

Dawson et al. (2008) optimized the process of natural attenuation in a soil contaminated with BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylene), by amending with N and P. As the studied site had a long historical contamination by this mixture, it was not

necessary the addition of BTEX-degraders microorganisms to the soil. The use of bioluminescent-based bacterial bioassays (constitutively expressed biosensor and BTEX-specific induced biosensor) indicated an increase in the toxicity for the first days of bioremediation, but after 38 days of the process, a reduction in the toxic potential of the samples was observed, corroborating the chemical analyses. Thus, the applied bioassays were able to detect the formation of toxic metabolites and alterations in the bioavailability of BTEX compounds.

2.3. Bioaugmentation/ biostimulation

One of the most used bioremediation technologies is the bioaugmentation strategy. Bioaugmentation can be defined as the addition of microorganisms that are capable of biodegrading the target pollutant aiming to enhance and accelerate the biodegradation process. According to Lens et al. (2005) and Stroo, Leeson and Ward (2013), this strategy provides the enlargement of genes, enzymes and microbial diversity in the contaminated site to increase the variety of metabolic pathways that were not present in the indigenous population.

Another tool that is frequently used to promote a better biodegradation in contaminated soils is the biostimulation. This process aims to supply stimulating agents such as nutrients and oxygen to stimulate the growth of the natural microbial population present in the local. According to Singh, Parmar and Kehad (2011), factors such as adjusted pH, ideal C:N:P nutrient ratio in the medium, addition of biosurfactants or enzymes may contribute to the success of the biostimulation.

Xu and Lu (2010) assessed the efficiency of different biostimulation and bioaugmentation processes to bioremediate soils contaminated with crude oil under laboratory conditions. The authors selected an indigenous hydrocarbon-degrading bacterial consortium, using crude oil as the sole source of carbon, to promote bioaugmentation. To promote biostimulation peanut hull powder was used as a bulking agent and as a carrier material to immobilize bacteria cells. The Microtox® bioassay was used to evaluate the soil toxicity during the bioremediation processes. After 12 weeks of test, it was observed that bioaugmentation with immobilized cell on peanut hull powder soil was the most efficient treatment, removing 61% of crude oil. The performed bioassay indicated a high toxicity during the initial phase of the treatment probably due to the formation of toxic metabolites (e.g. aldehydes). However, a significant reduction in the toxicity of the samples was observed at the end, thus, proving the efficiency of this process.

A loamy sand soil contaminated with crude oil (38,300 mg/kg of total petroleum hydrocarbons) was bioremediated in laboratory by the combination of biostimulation and a modified Fenton oxidation (GONG, 2012). The toxicity was monitored along the process by the Microtox® bioassay. The efficiency of a treatment carried out with the addition of peanut hull and inorganic nutrients such as $(NH_4)_2SO_4$ and K_2HPO_4 (C:N:P ratio of 100:10:5) was compared with another treatment containing the same nutrients and the same bulking agent plus Fe(III) chelated with nitrilotriacetic acid (molar ratio of 1:1) to promote modified Fenton reactions. After 20 weeks, a decrease of 55.1% was observed for the biostimulation treatment and 88.9% for the combined treatment. The Microtox® test revealed an increase in the toxicity from week 2 until week 8, for both treatments. However, this toxic effect had a significant reduction after the chemical oxidation process, mainly for the last one. Thus, the use of toxicity test can contribute to determine the ideal treatment time and the most appropriated process to perform a more effective bioremediation.

Chemical and ecotoxicological assessments were carried out by Elgh-Dalgren, Arwidsson and Ribé (2011) to evaluate the efficiency of two commercial methods to biodegrade PAH in an arsenic co-contaminated soil. The Daramend® and BioSan methods were chosen to study biostimulation and bioaugmentation, respectively. A non-ionic surfactant was added to the treatments to increase the PAH bioavailability. After 30 weeks, although a decrease in the PAH was observed for the majority of the treatments, none of them significantly reduced the contaminant concentrations. This was probably because the time used was not sufficient to biodegrade the contaminants at satisfactory levels. However, the microbial activity induced an arsenic remobilization in the soil, increasing the concentration of this metal in the available fraction, which is very harmful to the ecosystem. The Microtox® bioassay indicated that all the treatments induced a higher toxicity than the non-treated soil, mainly for the treatments that used surfactants to help in the biodegradation, possibly due to an increase in the PAH bioavailability. This study highlights the importance of using bioassays associated with bioremediation processes because besides identifying the presence of toxic metabolites they also provide information about changes in the bioavailability of the contaminants.

Spent mushroom compost was used to promote biostimulation and bioaugmentation in soils polluted with benzo[α]pyrene (RUSSO; RIZZO; BELGIORNO, 2012). The residual soil toxicity was evaluated by using Microtox® test with *V. fischeri* and by seed germination/root elongation tests with *Lepidium sativum*. Despite the reduction of 35% in the benzo[α]pyrene concentration by this treatment, the combination with ozone oxidation could contributed to a

better efficiency, above 75%. Furthermore, the combination of these two processes also contributed to a decrease in soil toxicity.

Lettuce root elongation bioassay, growth inhibition and mortality of the ostracod *Heterocypris incongruens* were used to verify the efficiency of bioaugmentation and biostimulation treatments in the degradation of PAH-contaminated soils (HAMDI et al., 2007a). The authors added sewage sludge compost, decaying rice straw and/or known microorganisms PAH-degrader to soils contaminated with a mixture of anthracene, pyrene and benzo[α]pyrene to obtain a final concentration of 1000 mg of each PAH per kg of dry soil. After 120 days, it was observed that the use of decaying rice straw and bioaugmentation were the most efficient treatments, contributing to a decrease of 96% of the initial concentration of anthracene and pyrene. For the ecotoxicological assays, the ostracod showed a high sensibility to these compounds, since all the samples were toxic, causing 100% of mortality, while a decrease in the presence of PAHs in the samples also decreased the toxicity for lettuce. However, the addition of sewage sludge to the soil inhibited the seed germination, increasing the sample toxicity, even after 120 days of treatment.

Parameters such as low temperatures and lack of nutrients in the soil can jeopardize the microbial biodegradation. In an attempt to improve the biodegradation process of soils contaminated with petroleum hydrocarbons in high latitude environments, Coulon et al. (2005) determined the effects of adding nutrients and rising the temperature on the biodegradation of sub-Antarctic soils contaminated with diesel and crude oil. Despite the significant hydrocarbons degradation confirmed by chemical analyses, the toxicity evaluated by the modified Microtox® solid phase (STP) test remained almost the same after 180 days of bioremediation. Therefore, the authors suggested that as chemical and toxicity information do not always support each other, a bioassay to evaluate residual soil toxicity should be performed to confirm the bioremediation successfully.

Souza et al. (2013) studied the efficacy of the addition of sugar cane vinasse (by-product of the sugar industry) in a landfarming soil from a petroleum refinery in the reduction of genetic damages on *Allium cepa* meristematic cells. Although the use of this bulking agent in contaminated soils can favour the bioremediation to increase microbial activity, the authors concluded that the sugar cane vinasse contributed to an increase of chromosome breakages in this species, suggesting that the use of this compound associated with bioremediated organic residues can be harmful to the organism.

A study performed by Hu et al. (2012) evaluated the toxic and genotoxic potentials of a PAH-contaminated soil, before and after bioremediation using the chicken DT40 B-

lymphocyte isogenic cell line and 15DNA-repair-deficient DT40 mutant cells. The soil used (66% sand, 28% silt, 6% clay, total organic matter of 16.6%) contained 14 of the 16 USEPA priority PAHs (not including acenaphthylene and indeno-[1,2,3-cd]pyrene) with a total concentration of 556 ± 50 ng/mg (dry mass basis, w/w). The aerobic bioreactor system used for the *ex situ* bioremediation of the soil was able to remove 69% of the total PAH. The *in situ* applied treatment, a biostimulated continuous-flow column system, removed 84% of the total PAH. The bioassays results indicated an increase in toxicity and genotoxicity for the bioreactor system over the course of a treatment cycle (7 days) and a decrease in these parameters for the long-term flow column system (2.5 years). So, the authors concluded that for PAH-contaminated soil, although different bioremediation strategies can reduce the contaminants, they can also lead to different results of toxicity, confirming the importance of using bioassays to verify the risks of bioremediation.

Another study also assessed the biodegradation of the 16 USEPA priority PAHs during 274 days and used the comet assay with RTL-W1 cells and the CALUX bioassay with H4IIE rat hepatoma cells to verify the toxic potential of samples from different periods (ANDERSSON; ROTANDER, 2009). A particulate material made from plant fibres and phosphate was added to the clayey contaminated soil. Although the chemical analysis indicated a small biodegradation after bioremediation, an increase in the biological activity was observed for both bioassays. The authors suggested that these results are due to the formation of toxic metabolites or the increase of PAHs bioavailability. So, bioassays can contribute to the choice for a safer bioremediation strategy, since the soil can become more toxic and harmful to the living organisms after this process.

Phillips et al. (2000) proved the importance of using more than one bioassay to monitor soil bioremediation. After adjusting the moisture content, temperature and nitrogen and/or phosphorus concentrations of soils contaminated with creosote, the authors used the Microtox® STP test, seed germination assay, earthworm survival test, the SOS-chromotest, Toxi-chromotest and a red blood cell (RBC) haemolysis assay to verify the success of bioremediation in a bench-scale microcosms. Chemical and biological analyses did not corroborate with each other, because an increase in toxicity was observed for earthworm, seed germination, RBC and Microtox® tests in spite of the biodegradation of total petroleum hydrocarbons. Moreover, it was observed that different bioassays can present different responses depending on the sensitivity of the organism used to a certain contaminant.

Different ecotoxicological endpoints (plant biomass production, earthworm reproduction, collembolans reproduction, microalgae growth and cladoceran reproduction)

were used to verify the efficiency of a bioaugmentation with *Pseudomonas* sp ADP and a biostimulation with citrate in the improvement of the bioremediation of a soil contaminated with the atrazine herbicide (CHELINHO et al., 2010). After 42 days of experiment, atrazine levels decreased to 98-99% of the initial concentration, proving the effectiveness of these combined strategies. For the ecotoxicological assays, after 10 days, no toxic effect was observed for the organisms tested.

2.4. Biosorption

Biosorption is also a widely used bioremediation strategy. This technique is based on the fact that a microbial biomass can bind and accumulate contaminants, removing them from the environment. The xenobiotics can bind to the cell walls, pigments and extracellular polysaccharides or accumulate inside the cells of bacteria, fungi and algae (KOTRBA; MACKOVA; MACEK, 2011).

Srivastava and Thakur (2006) used the fungus *Aspergillus niger* to bioremediate a soil microcosm contaminated with different concentrations of chromium (250, 500, 1000, 1500 and 2000 mg/L). In addition, the seed germination inhibition test with wheat and the peroxidase enzyme assay with the leaves of wheat were used to verify the possible reduction on the toxicity of the samples. After 15 days, the authors observed a decrease of 75% for the lowest concentration and of 45% for the highest concentration, probably due to the bioaccumulation by the fungal mycelium. However, this reduction in the concentration of chromium in soil was not sufficient so that the values of seed germination, seedling length and peroxidase activity of the treatment became similar to the control.

2.5. Biopiles

An *ex situ* bioremediation methodology, known as biopile, mounted with excavation of contaminated soil, making it available in layers, promotes an improvement in the microbial anaerobic degradation (WU; CRAPPER, 2009). Biopiles generally are from 2 to 4 metres high (JØRGENSEN; PUUSTINEN; SUORTTI, 2000), depending on the type of contaminated soil, space available and handling requirements (KODRES, 1999). Concentration of oxygen, soil humidity, concentration of nutrients and pH are controlled in the biopiles in order to optimize the growth and activity of the microorganisms (KODRES, 1999). Different agents such as straws and husks, wood chips, among other organic materials can be added to biopiles to increase their volume (JØRGENSEN; PUUSTINEN; SUORTTI, 2000).

Brooks et al. (1998) elaborated a pilot project to evaluate the efficiency of different methodologies based on their capacity in reducing total PAHs in soil, as well as analyze their toxic potentials. One of the methodologies chosen for the bioremediation was biopiles. In this experiment, the soil used was removed from a site contaminated with PAHs of creosote. Aiming to biomagnify the microbial population of this soil, cow manure (1%) was added to the biopile. The assessment and identification of the mutagenic agents in the soil, before and after the bioremediation, were estimated by fractionated extracts, subjected to the *Salmonella* histidine reversion assay. The authors also performed chromatographic chemical analyses of the samples (GC/MS). At the end of the experiment, it was observed a reduction in the concentrations of PAHs in the soils, when compared to the periods before and after the treatments. However, the authors observed an increase in the mutagenic activity, in relation to the control test. This result may be related with the presence of azaarenes, which are recognized mutagenic agents. This study proved the importance of the combination of bioassays with chemical analyses for a safer determination of the toxicity of environmental mixtures.

In order to evaluate the differences in the degradation of petroleum hydrocarbons, Delille, Duval and Peletier (2008) proposed several treatments for the bioremediation by biopiles. Soil samples from the Kerguelen Archipelago added with 180 g of diesel oil were used to make different biopiles. They were all exposed to different treatments, regarding ventilation, mechanical agitation, aggregation of organic nutrients and addition of surfactants. After one year of treatment, the authors performed analyses of the rates of the contaminants degradation (by chemical analyses - GC/MS) and toxicity assays with the luminescent bacterium *V. fischeri* (Microtox® SPT). In this study, it was observed almost total disappearance of the hydrocarbons for all the treatments. The researchers realized a reduction to less than 0.2% of total hydrocarbons for the biopiles treated with organic nutrients (fish compound), while the assays without this organic nutrient presented a reduction of less than 7%. This study showed a higher efficiency in the hydrocarbons biodegradation when an organic compound was added. Also, a higher amount of PAHs was observed in the biopiles that received the fish compound but did not receive physical treatment in relation to those that were ventilated or agitated. However, for several biopiles treated with organic compounds (fish compound), residual toxicity was observed as determined by the Microtox® assay. Thus, although the biopiles have been more efficient in the chemical reduction of the hydrocarbons with the addition of the fish compound, this nutrient contributed for an increase in the toxicity of the bioremediated sample, leading to an unsatisfactory result for this type of contaminant.

Plaza et al. (2005) studied two biopiles from stabilization ponds of a petroleum refinery in Czechowice, Poland. One of the analyzed biopiles, built in 1997, which had several active and passive aeration sections, was subjected to bioremediation process for four years and it was called biopile 1. The other biopile, built in 2001 (biopile 2), was treated passively for eight months. Thus, both biopiles received different biostimulation treatments. Then, hydrocarbons degradation rate was measured and the following bioassays were applied: Spirotox; Microtox®; Ostracodtoxkit F™; umu-test with S-9 activation; and assays with six species of higher plants (*Secale cereale*, *Lactuca sativa*, *Zea mays*, *Lepidium*, *Triticum vulgare*, *Brassica oleracea*). Toxicity of the soils contaminated with the bioremediated petroleum was evaluated by means of these bioassays. At each period, the authors observed a substantial decrease of the petroleum hydrocarbons in both treatments, being higher for biopile 1. A less toxic effect was also observed for biopile 1. The differences observed in this study can be assigned to the different treatment strategies employed for bioremediation, besides the exposure period of each treatment. The authors emphasized the importance of toxicological tests as environmental monitoring to evaluate the effectiveness of bioremediation technologies.

2.6. Landfarming

Landfarming is a medium to long term solid-phase remediation technology considered adequate for the treatment of soils contaminated by petroleum hydrocarbons, due to its containment, low cost, and high potential for success (HARMSEN, 1991; PEARCE; OELLERMANN, 1998). It is a soil bioremediation technology practiced by several oil refineries intended to reduce or eliminate hydrocarbons from petroleum sludge (SOUZA et al., 2009), using biological, chemical and physical natural processes (POPE; MATTHEWS, 1993 *apud* MARIN; HERNANDEZ; GARCIA, 2005). According to these authors, the landfarming concept serves as a fundament for the design and operation of soil bioremediation technologies in many waste sites requiring cleanup.

A study developed by Mendonça and Picado (2002) monitored a coke oven soil belonging to a industrial site in operation located in Coina Estuary, Portugal, which is contaminated with high concentrations of PAHs (PICADO et al., 2001), after the landfarming process, by chemical analysis and some ecotoxicological tests (Microtox® test, using *V. fischeri* for verifying bacterial toxicity; alga test, using *Pseudokirchneriella subcapitata* for measuring its growth inhibition; Daphnia test, for assessing the inhibition of the mobility of *Daphnia magna*; Mutatox test, analysis of the activation of the luminescence of *V. fischeri* to

evaluate the samples genotoxicity; seed test, using *L. sativa* seeds to measure their inhibition of germination). In the beginning of the landfarming process, the aqueous elutriates of soil samples showed ecotoxic effects for *V. fischeri, D. magna* and *P. subcapitata*, but after two months of landfarming treatment it was observed a reduction in acute toxicity to *V. fischeri* and to *D. magna*, in addition to a gradual decrease of the soil chronic toxicity to the sensitive alga along the five months of treatment. Besides, toxic effects were verified for *L. sativa* only for the initial sample. Genotoxic effects were also detected in the initial soil sample, although after 2 months of landfarming treatment no genotoxic effects were registered. The toxic effects observed for all tested species in the beginning of the landfarming process were mainly related to the high concentrations of PAHs. The reduction of such effects, during the treatment, was associated to the biodegradation of low molecular weight PAH with two, three and four rings. All this demonstrated the effectiveness of the landfarming process as an efficient soil decontamination technology. In addition, according to the authors, the comparative analysis of these different ecotoxicity assays allowed to considerate that the alga test is the best procedure for the monitoring of soils polluted with PAHs.

Marin, Hernandez and Garcia (2005) evaluated the ability of landfarming to decrease or eliminate the total hydrocarbon content added to the soil with refinery sludge in an area with a semiarid climate (Cantagena, Murcia, Spain), they also investigated the effect of this technique on the evolution of the microbial activity of the soil, using biological parameters (carbon fractions, microbial biomass carbon, basal respiration and ATP), determining biochemical parameters (enzymatic activities) and verifying the soil toxicity by the Microtox® assay after the landfarming technique. 80% of the hydrocarbons were eliminated after eleven months. Biological parameters of the samples of soils treated with landfarming technique showed higher values than the control soil during the first months, but these values were later reduced whereby the labile hydrocarbons were mineralized. The enzymatic activities (oxydoreductases and hydrolases) presented higher values in the soils impacted with the refinery sludge than in the control, although these values were reduced until levels similar to those of the control soil after eleven months. The percentage of inhibition of luminescent bacteria significantly decreased in the soils submitted to the landfarming process, which indicates that the water-soluble toxic compounds were totally cleaned after 9 months. All the results indicated that bioremediation of refinery sludge by landfarming technique is possible to be applied and good effectiveness in the tested conditions are obtained.

One research developed in Okayama, Japan, aimed to assess the ecotoxicity of a silt loam soil spiked with three PAHs at four levels (15, 75, 150, 300 mg $\sum$ 3 PAHs/Kg soil) after

a long-term bioremediation process simulating landfarming, by using physico-chemical analysis, solid-phase bioassays and soil microbial activities. The bioremediation process consisted of irrigations in the presence (treated soil) or absence (control soil) of sewage sludge compost under greenhouse conditions. Fifteen months later, two PAHs (anthracene and pyrene) were almost completely degraded whereas benzo[α]pyrene persisted, especially in samples treated with sewage sludge compost. The application of this sludge was performed to evaluate the biowaste and stimulate PAHs biodegradation. Although, it caused soil salinization and pH reduction at the end of the bioremediation process, which consequently induced both strong phytotoxicity to lettuce as detected by the high inhibition of its germination. Also, it produced high rates of mortality to the ostracod *H. incongruens* in soils amended with sewage sludge compost. Moreover, in treated soils, the enzymatic activities of dehydrogenase and extracellular lignin peroxidase were not affected by the organic amendment and residual PAHs. Thereby, the authors concluded that the bioremediation efficiency was likely to be more limited by the bioavailability of PAHs rather than by the total number of PAH-degraders (HAMDI et al., 2007b).

Souza et al. (2009) assessed the genotoxicity of landfarming soil, before and after the addition of rice hulls using the *A. cepa* bioassay. They verified that the landfarming soil presented release of CO_2, besides high levels of total petroleum hydrocarbons and induced significant clastogenic and mutagenic effects in *A. cepa*, which were reduced after 108 days of biodegradation. Furthermore, landfarming treated with rice hulls promoted a considerable diminution in total petroleum hydrocarbons associated with the higher release of CO_2 and it caused the highest inhibition in the frequencies of mitotic indices and chromosome aberrations (mainly chromosomal adherence, bridges and breaks), micronuclei and nuclear buds. The authors inferred that the use of rice hulls accelerated the biodegradation effectiveness of landfarming, due to the increase of CO_2 release associated to the reduction of total petroleum hydrocarbons and the addition of rice hulls was able to reduce the landfarming genotoxicity. Therefore, such treatment could be a relevant indication to improve the efficiency of soils bioremediation processes and it may be a cost effective alternative for hydrocarbon bioremediation.

One study carried out by Frutos et al. (2012) evaluated the efficiency of two technologies (landfarming and slurry bioremediation) for the treatment of sludge (fine fraction with clay and silt) contaminated with diesel hydrocarbons from a soil washing process, by some chemical (gas chromatography) and ecotoxicity assays (survival test of the earthworm *Eisenia fetida*; seeds germination test with wheat, rape and red clover; microorganisms

toxicity assays – soil respiration test and soil enzymatic activities; mobility test of *D. magna*; Algal (*Chlorella vulgaris*) growth inhibition test). Laboratory and pilot-real scales were studied, both for bioslurry (laboratory scale: microcosms – respirometry – and stirred reactors; pilot scale: air-lift pilot plant) and landfarming (laboratory scale: microcosms – respirometry – and mesocosms – columns+trays; demonstration scale: field – landfarming cell). The initial sample of sludge presented a total petroleum hydrocarbon content of 2243 mg/kg, which was decreased after both bioremediation treatments. In the case of bioslurry, there was a considerable reduction in the rates of total petroleum hydrocarbon of 57 and 65% in 28 days (laboratory and pilot scale, respectively). For landfarming process, there was a significant reduction in the levels of such hydrocarbons in six months (85% and 42%, for laboratory and real-scales, respectively). For earthworms, plants and microorganisms tested, the ecotoxic effects in the initial sludge sample were low, but after slurry and landfarming treatments, a decrease in such effects was observed, mainly in earthworm survival and in carbon mineralization at various concentrations tested. There was no relationship detected between the effects on seedling emergence and plant growth for untreated and treated sludge samples. No toxicity to aquatic organisms (algae and *Daphnia*) was observed in soil leachates, due to a strong adsorption onto the clay. Even though the results in real-scales of total petroleum hydrocarbons reduction efficiency were lower than that obtained at the laboratory scale, Frutos et al. (2012) indicated that the two bioremediation technologies studied, landfarming and slurry, are feasible alternatives for the recovery of sludges contaminated with hydrocarbons.

2.7. Soil decomposer animals

According to Haimi (2000), microorganisms are not the only responsible for degrading soil contaminants in bioremediation processes. Soil animals also have an important indirect role in these processes, because they are able to increase the microbial metabolic activities in the soil. In addition, they can be used as indicators of soil contamination before, during and after bioremediation. In addition to chemical analyses, soil animal studies are relevant to reveal associations between soil contamination levels and negative effects on local biota. For example, earthworms (*E. fetida, Eisenia andrei, Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus terrestris*) are considered soil decomposer animals highly accepted for use in simple assays of growth, reproduction and/or survival that evaluate effects of different chemical compounds on soil organisms. Other relevant soil decomposer organisms belonging to the Enchytraedis, Collembola, Mites, Isopods and Nematodes groups are also frequently used in the assessment

of chemical toxicity and contaminated soils, by the analyses of reproduction and survival, besides the long life cycle analysis in the case of *Platynothrus peltifer* (Mites group), and the measurement of nutrient mineralization for *Porcellio scaber* and *Trichoniscus pusillus* (Isopods group). Despite the benefits that some studies show about minimizing the toxicity of contaminated soils using decomposer animals, it should be also considered that, in some cases, such animals may transfer toxicants accumulated in them to the above-ground food webs.

2.7.1. *Vermicomposting*

The vermicomposting is a type of bioremediation process that specifically uses earthworms, which eat, triturate, and digest organic wastes with the aid of aerobic and some anaerobic microflora, converting them into a much finer, humified and microbially active material (NDEGWA; THOMPSON, 2001; MABOETA; VAN RENSBURG, 2003). Such process is able to reduce the toxicity of soils and sludges, because earthworms are capable of bioaccumulating heavy metals in their body tissues, as in chloragocytes, and their intestinal microflora that have the capacity of detoxifying some chemicals, like several pesticides (SRIVASTAVA; KUMAR; GUPTA, 2005). Wherefore, the earthworms could also provide an index of the bioavailability of heavy metals that might be present in the materials that are bioconverted, pointing out potential environmental hazards (MABOETA; VAN RENSBURG, 2003). According to Ndegwa and Thompson (2001), the product generated after the vermicomposting is generally stable and homogenous, and may have reduced levels of contaminants.

Srivastava, Kumar and Gupta (2005) evaluated the toxic, genotoxic and the phytotoxic potentials of three concentrations (2.5, 5 and 10%) of municipal sludge from a disposal site located on Lucknow-Kanpur, State of Uttar Pradesh, India, near to one automobile industry, by the *A. cepa* test, before and after the vermicomposting that used the species *E. fetida*. By Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry (ICP, Labtam Plasmalab 8440), the researchers determined some heavy metals (Cr, Cu, Ni e Pb) in the leachate of municipal sludge (10%), which were also detected in the leachate after the vermicomposting treatment, although showing lower values. Additionally, they observed that the municipal sludge before the vermicomposting process inhibited the mitotic index of the onion bulbs, plant weight, root elongation and chlorophyll contents in a concentration dependent manner. In contrast, the vermicomposting sludge induced similar values to the negative control. Only the highest concentration of the leachate tested (10%) without the vermicomposting induced significant morphological abnormalities and significant mitotic aberrations in the *A. cepa* roots, which

became coiled or wavy and presented chromosomal bridges and fragments, unlike the leachate of the vermicomposting sludge. Therefore, the authors concluded that the municipal sludge tested was able to cause toxic, genotoxic and phytotoxic effects in *A. cepa*, which could be due to heavy metals or other organic compounds present in such sample. After the vermicomposting, this sludge induced a significant reduction of those negative responses, demonstrating that this bioremediation process can be employed as an important technique for recycling the municipal sludge, before depositing it in landfills or dumps.

Studies performed by Laine et al. (1995) apud Haimi (2000), corroborate the Srivastava, Kumar and Gupta (2005) conclusions, by demonstrating the effectiveness of the vermicomposting to recuperate contaminated soils. Although, those authors had used other standard test species (*E. andrei*) that reduced the organic halogen compound levels in contaminated sawmill soils. On the other hand, Chang, Meier and Smith (1997) showed that artificial soils treated by vermicomposting presented an increased toxicity when compared to the original lead-contaminated soil, due to the high salt levels originated from the bioremediation process with earthworms. Another study by Nedgwa and Thompson (2001) used a system consisting of two bioremediation processes – firstly the traditional thermophilic composting and after the vermicomposting with *E. fetida* – to degrade biosolids (activated sewage sludge) added with mixed paper-mulch as the carbon base. This system was able to reduce the stabilization time and ameliorate the biodegraded products quality, making it more stable and homogenous and with lower impact on the environment.

2.8. Phytoremediation

Phytoremediation is an emergent and low cost methodology, which makes use of vascular plants to remove or attenuate the effects of environmental pollutants (CUNNINGHAM; BERTI, 1993; RASKING ET AL., 1994; SALT; SMITH; RASKIN, 1998). Plants present a great capacity to absorb, adsorb, degrade and transform substances (CUNNINGHAM; BERTI, 1993); therefore, they are considered efficient solar-driven pumping and filtering systems of pollutants (CUNNINGHAM et al., 1996). Associations established between microorganisms present in the soil and the root surfaces of plants can significantly increase the contact of the roots with the soil, helping in the remediation of contaminated environments (CUNNINGHAM; BERTI, 1993). According to Salt, Smith and Raskin (1998), the phytoremediation technique can be applied in environments contaminated by organic and inorganic pollutants, present in several substrates. Plants can accumulate the pollutants in different parts of their biomass, such as, for example, in the aerial parts and

roots. The roots can absorb or adsorb contaminants and can also decrease their bioavailability in the environment, besides enabling the volatilization of certain molecules or even removing them from the atmosphere around them (SALT; SMITH; RASKIN, 1998).

Cofield, Banks and Schwab (2008) assessed the efficiency of the phytoremediation in the decontamination of soils contaminated by PAHs. The authors subjected samples of soils highly contaminated with PAHs of an old industrial complex of gas manufactured in Bedford, Indiana (USA) to the phyroremediation process for a period of 12 months. This was carried out with the species *Festuca arundinacea* and *Panicum virgatum*, besides performing two unvegetated controls, one unvegetated-unfertilized and the other unvegetated-fertilized. Bioassays were developed (3, 6, 9 and 12 months) to evaluate the survival of earthworms (*E. fetida*), survival of nematodes (*Caenorhabditis elegans*), germination of lettuce seeds (*L. sativa*) and microbial respiration. The authors observed that before the application of the phytoremediation process, the samples had toxic effects on all the bioassays (except for nematodes). After phytoremediation, total concentration of PAHs present in the soil decreased, and the concentration of many of the labile compounds became almost undetectable at the end of the bioassay. Moreover, there was an increase in the survival of earthworms, germination of lettuce and emission of CO_2. The results observed in the bioassays showed a correlation between the decrease in the soil toxicity at the end of the experiment and the decrease in the labile concentrations of the PAHs due to the Tenax-TA extraction procedure. This corroborates the importance of methodological associations to evaluate the residual toxicity, after remediation methodologies, as well as correlations of the bioassays with the presence of the substances in the samples.

Hamdi et al. (2012) conducted a study of phytoremediation with *Medicago sativa* (alfalfa) to remove PAHs present in contaminated soils. Besides the phytoremediation, the authors adopted a strategy of adding a bioresidue to the substrate (sewage sludge - SS) to increase/introduce new microorganisms to the indigenous microbiota. Also, a monitoring of the toxicity of the soil collected in a rice field (from the Research Institute for Bioresources – Japan) was carried out with Ostracoda (*H. incongruens*) and with *L. sativa* (lettuce germination test). To perform this study, besides a control test made with *in natura* soil, the soil was experimentally contaminated with a mixture of anthracene, pyrene and benzo[α]pyrene (proportion of 1:1:1) at four different concentrations (5, 25, 50 and 100 mg/kg dry soil). Moreover, the authors also tested the efficiency of adding SS in the samples that presented the same conditions as the previous ones. Firstly, the soils were subjected to 15 months of bioremediation, simulating a landfarming process (absence of phytoremediation) to

activate the microbial communities present there, aiming an improvement in the removal of PAHs. After this period, the soil samples were prepared to receive the alfalfa seeds, initiating the phytoremediation process, which was conducted in greenhouse for six months. Initially, the alfalfa germination rate in soils treated with SS was lower than in the untreated soils. However, at the end of the experimental period, this difference between the treatments was no longer significant, since, in both soils the plant growth was vigorous. No presence of PAHs was found in dried aerial parts of the plant, regardless the treatment performed. However, the phytoremediation had an important role, since it acted positively in the physicochemical properties of the soil, especially in those treated with SS, which were more acid and saline at the end of the 15 months exposure (simulating landfarming). After the phytoremediation period, anthracene was no longer detected in the treatments and pyrene was almost completely degraded. In this assessment, the benzo[α]pyrene was still persistent, but at concentrations below the initial levels. According to the authors, this persistence was due to the benzo[α]pyrene irreversibly bound to the soil solid phase, which possibly is not bioavailable and does not represent a risk. The authors also alert for the possibility that the phytoremediation period have been insufficient or even to the inadequacy of the plant species (alfalfa) used in the process. Regarding the toxicity tests, the ecotoxicological data were directly correlated with the physicochemical alterations of the soil. After the phytoremediation period, survival of the ostracod increased, while phytotoxicity decrased. Thus, it confirms the suitability of both assays to reflect the direct toxicity of the soil.

Phytotoxicity tests can be useful to evaluate the persistence of PAHs in soils. These techniques can, eventually, be used to monitor the presence of these compounds in the soil. In this context, Maila and Cloete (2002) studied the phytoremediation of the species *Panacum maximum* (white buffalo grass) in the removal of these pollutants and the species *L. sativum* (garden cress) as a potential bioindicator. The soils employed in the study were: soil A (predominantly sandy loam soil taken from the CSIR site; Pretoria, SA); soil B (industrial soil taken from an industrial oil site; Secunda, South Africa and artificially contaminated with 1.2 g of PAH per kg of soil); soil C (industrial soil; Kwazulu-Natal, SA- containing 6% ilmenite, 0,4% rutile, 1 % zircon, 0,3% leucoxene, 1% magnetite and 1% kyanite); and soil D (white playpen sand bought from Lion Bridge SA Pty. Ltd.). The germination of *L. sativum* was performed in these different types of soil and the seeds were exposed to different concentrations of PAHs. In order to establish the treatments, the authors made several combinations with the soils previously described with absence or presence of vegetation and with or without PAHs (1000 mg/L) rendering a total of 5 different treatments and a control

test. The levels of seed germination and the fresh weight of *L. sativum* decreased with the increase in the concentration of PAHs. Phytoremediation by *P. maximum* effectively decreased the levels of PAHs when compared with non-vegetated soil, suggesting a positive effect of the species to remove and detoxify PAHs.

Varun et al. (2011) evaluated the possibility of remediating environments contaminated with lead (Pb) with the plant species *Crinum asiaticum* (family Amaryllidaceae). The authors also assessed the efficacy of applying a bioassay to monitor the levels of this contaminant in the environment, using the germination index of the species *Hordeum vulgare* (barley). The authors prepared the samples, adding different concentrations of Pb (300, 600 and 1200 mg/L) to uncontaminated soils, resulting in three different treatments (T1, T2 and T3, respectively). The period of study was of four months and in 30-days intervals leaf samples of the plant and soil samples were collected both for the analysis of the Pb levels and to perform the bioassays. In the first periods of the experiment (30 and 60 days) similar results for the germination indices of the barley germination were obtained for the three treatments and the highest values were observed for the lower concentrations of the metal. At 90 days, the best germination persisted for the soils with lower levels of Pb, but the aspect of the seedlings was better when compared to the previous periods (which was curled, characteristic that indicates response to the toxicity of the environment). At the end of the experiment (120 days), the germination percentage improved significantly for all the treatments and it could be observed 90% of germination for T1 and T2, about 80% for T3 and 100% for the control. Furthermore, there was a reduction in the content of lead in the soil and an increase of it in the aerial part of the plant. Therefore, the species *C. asiaticum* can be considered an efficient biological material to remediate of soils contaminated with Pb. Also, *H. vulgare* seems to be a good bioindicator, characterizing itself as an important tool for the evaluation of the effectiveness of phytoremediation processes.

Pires et al. (2005) evaluated the ability of some plant species (*Cajanus cajan, Canavalia ensiformes, Dolichos lablab, Pannisetum glaucum, Estizolobium deeringianum, Estizolobium aterrimum* and *Lupinus albus*) to bioremediate soils contaminated with the herbicide tebuthiuron. For the experiment, Red-yellow Clay soil collected in secondary forest, plus four concentrations of tebuthiuron (0; 0.5; 1.0 and 1.5 Kg/ha) were used. As controls, soil samples with the same concentrations of the herbicide without the addition of plants were used. After 60 days of the phytoremediation, soils were fertilized, the bioindicator species *A. strigosa* (black oat) was sown and cultivated for another 60 days. After this period, height, dry weight of the aerial parts and intoxication symptoms of this plant were evaluated. The

researchers observed that the plant height and the biomass of the aerial part of *A. strigosa* decreased as the levels of tebuthiuron increased. Lower phytotoxicity of the herbicide was observed when the soil was phytoremediated with the species *P. glaucum, L. albus* and *C. cajan* at a concentration of 0.5 kg/ha. For higher concentrations, the plants presented intoxication symptoms. However, lower effects were observed when the bioindicator was cultivated after the treatment with *C. ensiformes*. This suggests that, for this study, *C. ensiformes* was the best phytoremediator for tebuthiuron contaminated soils.

3. CONCLUSION

According to our review on the literature, it is possible to conclude that different bioremediation processes have been extensively studied, proposing several technologies to be applied to remediate soil contamination. These technologies seem to be very efficient in the mineralization of pollutants commonly found in the soils, as petroleum hydrocarbons, pesticides, metals, complex mixtures and others. Furthermore, these bioremediation methods are considered a low cost and an environmentally friendly methodology. However, to better evaluate the effectiveness of bioremediation, especially regarding the formation of toxic intermediate metabolites and their bioavailability, we believe that some bioassays should be incorporated, before and after the bioremediation process. In table 1, we show some examples of endpoints and bioassays that are successfully used to verify the reduction of toxicity during different types of bioremediation.

4. REFERENCES

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. Academic Press, 1994. 302p.

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

ALEXANDER, R.R., TANG, J., ALEXANDER, M. Genotoxicity is unrelated to total concentration of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in soils undergoing biological treatment. **J. Environ. Qual.**, v.31, p.150-154, 2002.

ANDERSSON, E., ROTANDER, A. AhR agonist and genotoxicant bioavailability in a PAH-contaminated soil undergoing biological treatment. **Environ. Sci. Pollut. R.**, v.16, p.521-530, 2009.

BAMFORTH, S.M, SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v.80, p.723-736, 2005.

BROOKS, L.R., HUGHES, T.J., CLAXTON, L.D., AUSTERN, B., BRENNER, R., KREMER, F. Bioassay-Directed Fractionation and Chemical Identification of Mutagens in Bioremediated Soils. **Environ. Health Perspect.**, v.106, p.1435-1440, 1998.

CHANG, L., MEIER, J., SMITH, M. Application of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of a lead-contaminated soil. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.32, p.166-171, 1997.

CHELINHO, S., MOREIRA-SANTOS, M., LIMA, D., SILVA, C., VIANA, P., ANDRÉ, S., LOPES, I., RIBEIRO, R., FIALHO, A.M., VIEGAS, C. A., SOUSA, J. P. Cleanup of atrazine-contaminated soils: ecotoxicological study on the efficacy of a bioremediation tool with *Pseudomonas* sp. ADP. **J. Soil. Sediment.**, v.10, p.568-578, 2010.

COFIELD, N., BANKS, M.K., SCHWAB, A.P. Lability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. **Chemosphere**, v.70, p.1644-1652, 2008.

COULON, F., PELLETIER, E., GOURHANT, L., DELILLE, D. Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. **Chemosphere**, v.58, p.1439-1448, 2005.

CUNNINGHAM, S.D., ANDERSON, T.A., SCHWAB, A.P., HSU, F.C. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Adv. Agron.**, v.56, p.55-107, 1996.

CUNNINGHAM, S.D., BERTI, W.R. Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v.29, p.207-212, 1993.

DAWSON, J.J.C., IROEGBU, C.O., MACIEL, H., PATON, G.I. Application of luminescent biosensors for monitoring the degradation and toxicity of BTEX compounds in soils. **J. Appl. Microbiol.**, v.104, p.141-51, 2008.

DELILLE, D., DUVAL, A., PELLETIER, E. Highly efficient pilot biopiles for on-site fertilization treatment of diesel oil-contaminated sub-Antarctic soil. **Cold Reg. Sci. Technol.**, v.54, p.7-18, 2008.

DORAN, J.W., ZEISS, M.R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Appl. Soil Ecol.**, 15, 3-11, 2000.

ELGH-DALGREN, K., ARWIDSSON, Z., RIBÉ, V. Bioremediation of a Soil Industrially Contaminated by Wood Preservatives—Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Monitoring of Coupled Arsenic. **Water Air Soil Poll.**, v.214, p.275-285, 2011.

EWEIS, J.B., ERGAS, S.J., CHANG, D.P.Y., SCHROEDER, E.D. **Bioremediation Principles**. WCB/McGraw-Hill, 1998. 530p.

FRISCHE, T., HÖPER, H. Soil microbial parameters and luminescent bacteria assays as indicators for *in situ* bioremediation of TNT-contaminated soils. **Chemosphere**, v.50, p.415-427, 2003.

FRUTOS, F.J.G., PÉREZ, R., ESCOLANO, O., RUBIO, A., GIMENO, A., FERNANDEZ, M.D., CARBONELL, G., PERUCHA, C., LAGUNA, J. Remediation trials for hydrocarbon-contaminated sludge from a soil washing process: evaluation of bioremediation technologies. **J. Hazard. Mater.**, p.262-271, 2012.

GLANZ, J.T. **Saving Our Soil: Solutions for Sustaining Earth's Vital Resource**. Johnson Books, 1995. 182p.

GONG, X.B. Remediation of weathered petroleum oil-contaminated soil using a combination of biostimulation and modified Fenton oxidation. **Int. Biodeter. Biodegr.**, v.70, p.89-95, 2012.

HAIGH, S.D. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. **Sci. Total Environ.**, v.185, p.161-170, 1996.

HAIMI, J. Decomposer animals and bioremediation of soils. **Environ. Pollut.**, v.107, p.233-238, 2000.

HAMDI, H., BENZARTI, S., MANUSADŽIANAS, L., AOYAMA, I., JEDIDI, N. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biol. Biochem.**, v.39, p1926-1935, 2007a.

HAMDI, H., BENZARTI, S., MANUSADŽIANAS, L., AOYAMA, I., JEDIDI, N. Solid-phase bioassays and soil microbial activities to evaluate PAH-spiked soil ecotoxicity after a long-term bioremediation process simulating landfarming. **Chemosphere**, v.70, p.135-143, 2007b.

HAMDI, H., BENZARTI, S., AOYAMA, I., JEDIDI, N. Rehabilitation of degraded soils containing aged PAHs based on phytoremediation with alfafa (*Medicago sativa L.*). **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, *v.*67, p.40-47, 2012.

HANSEN, P.-D., BLASCO, J., DELVALLS, T.A., POULSEN, V., VAN DEN HEUVEL-GREVE, M. Biological analysis (Bioassays, Biomarkers, Biosensors). In: BARCELÓ, D., PETROVIC, M., (Eds.), **Sustainable Management of Sediment Resources: Sediment Quality and Impact Assessment of Pollutants**, 2007. pp.131-161.

HARMSEN, J. Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated soils. In: OLFENBUTTEL, R.F.H. (Ed.), **On-site bioremediation process for xenobiotic and hydrocarbons treatment**. Butterwort-Hetmann Publishimg, 1991. pp.255-272.

HU, J., NAKAMURA, J., RICHARDSON, S.D., AITKEN, M.D. Evaluating the effects of bioremediation on genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil using genetically engineered, higher eukaryotic cell lines. **Environ. Sci. Technol.**, v.46, p.4607-4613, 2012.

HUND, K., TRAUNSPURGER, W. Ecotox - Evaluation Strategy for Soil Bioremediation exemplified for a PAH - Contaminated Site. **Chemosphere**, v.29, p.371-390, 1994.

JØRGENSEN, K.S., PUUSTINEN, J., SUORTTI, A.M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. **Environ. Pollut.**, v.107, p.245-254, 2000.

KODRES, C.A. Coupled water and air flows through a bioremediation soil pile. **Environ. Model. Softw.**, v.14, p.37-47, 1999.

KOTRBA, P., MACKOVA, M., MACEK. T. **Microbial biosorption of metals**. Springer Science and Business Media, 2011. 329p.

LENS, P., GROTENHUIS, T., MALINA, G., TABAK, H. **Soil and Sediment Remediation: Mechanisms, Technologies and Applications**. IWA Publishing, 2005. 544p.

MABOETA, M.S., VAN RENSBURG, L. Vermicomposting of industrially produced woodchips and sewage sludge utilizing *Eisenia fetida*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.56, p.265-270, 2003.

MAILA, M.P., CLOETE, T.E. Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v.50, p.107-113, 2002.

MAILA, M.P., CLOETE, T.E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants – perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. **Int. Biodeter. Biodegr.**, v.55, p.1-8, 2005.

MARIN, J.A., HERNANDEZ, T., GARCIA, C. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. **Environ. Res.**, v.98, p.185-195, 2005.

MEGHARAJ, M., RAMAKRISHNAN, B., VENKATESWARLU, K., SETHUNATHAN, N., NAIDU, R. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. **Environ. Int.**, v.37, p.1362-1375, 2011.

MENDONÇA, E., PICADO, A. Ecotoxicological Monitoring of Remediation in a Coke Oven Soil. **Environ. Toxicol.**, v.17, p.74-79, 2002.

NDEGWA, P.M., THOMPSON, S.A. Integrating composting and vermicomposting in the treatment and bioconversion of biosolids. **Bioresource Technol.**, v.76, p.107-112, 2001.

PEARCE, K., OELLERMANN, R.A. Status and scope of bioremediation in South Africa. In: SIKDAR, S.K., IRVINE, R.L., (Eds), **Bioremediation: Principles and practice – Bioremediation technologies**, Technomic. Vol. III, 1998. pp.155-182.

PHILLIPS, T.M., LIU, D., SEECH, A.G., LEE, H., TREVORS, J. T. Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests. **J. Ind. Microbiol. Biot.**, v.24, p.132-139, 2000.

PICADO, A., NOGUEIRA, A., BAETA-HALL, L., MENDONÇA, E., RODRIGUES, M.F., SÀÁGUA, M.C., MARTINS, A., ANSELMO, A.M. Landfarming in a PAH-contaminated soil. **J. Environ. Sci. Health.**, v.36, p.1579-1588, 2001.

PIRES, F.R., SOUZA, C.M., SILVA, A.A., CECON, P.R., PROCÓPIO, S.O., SANTOS, J.B., FERREIRA, L.R. Fitorremediação de solos contaminados com tebuthiuron utilizando-se espécies cultivadas para adubação verde. **Planta Daninha**, v.23, p.711-717, 2005.

PLAZA, G., NALECZ-JAWECKI, G., ULFIG, K., BRIGMON, R.L. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. **Chemosphere**, v.59, p.289-296, 2005.

RANDERATH, K., RANDERATH, E., ZHOU,G.D., SUPONPONG, N., HE, L.Y., MCDONALD, T.J., DONNELLY, K.C. Genotoxicity of complex PAH mixtures recovered

from contaminated lake sediments as assayed by three different methods. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.33, p.303-312, 1999.

RASKIN, I., KUMAR, P.B.A.N., DUSHENKOV, S., SALT, D.E. Bioconcentration of heavy metals by plants. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.5, p.285-290, 1994.

RUSSO, L., RIZZO, L., BELGIORNO, V. Ozone oxidation and aerobic biodegradation with spent mushroom compost for detoxification and benzo(a)pyrene removal from contaminated soil. **Chemosphere**, v.87, p.595-601, 2012.

SALT, D.E., SMITH, R.D., RASKIN, I. Phytoremediation. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.49, p.643-668, 1998.

SEABRA, P.N.C. **Aplicação de biopilha na biorremediação de solos argilosos contaminados com petróleo**.: Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) UFRJ, 2005. 169 p.

SINGH, A., PARMAR, N., KUHAD, R.C. **Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol**. Springer, Vol. 28, 2011. 364p.

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

SOUZA, T.S., HENCKLEIN, F.A., DE ANGELIS, D.F., FONTANETTI, C. S. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Ecotox. Environ. Safe.**, v.185, p.1627-1636, 2013.

SRIVASTAVA, R., KUMAR, D., GUPTA, S.K. Bioremediation of municipal sludge by vermitechnology and toxicity assessment by *Allium cepa*. **Bioresource Technol.**, v.96, p.1867-1871, 2005.

SRIVASTAVA, S., THAKUR, I.S. Evaluation of bioremediation and detoxification potentiality of *Aspergillus niger* for removal of hexavalent chromium in soil microcosm. **Soil Biol. Biochem.**, v.38, p.1904-1911, 2006.

STELIGA, T., JAKUBOWICZ, P. KAPUSTA, P. Changes in toxicity during *in situ* bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technol.**, v.125, p.1-10, 2012.

STOKES, J.D., PATON, G.I., SEMPLE, K.T. Behaviour and assessment of bioavailability of organic contaminants in soil: relevance for risk assessment and remediation. **Soil Use Manage.**, v.21, p.475-486, 2005.

STROO, H.F., LEESON, A., WARD, C.H. **Bioaugmentation for Groundwater Remediation**. Springer, 2013. 389p.

VARUN, M., D'SOUZA, R., KUMAR, D., PAUL, M.S. Bioassay as monitoring system for lead phytoremediation through *Crinum asiaticum* L. **Environ. Monit. Assess.**, v.178, p.373-381, 2011.

WHITE, P.A., CLAXTON, L.D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutat. Res.**, v.567, p.227-345, 2004.

WU, T., CRAPPER, M. Simulation of biopile processes using a hydraulics approach. **J. Hazard. Mater.**, v.171, p.1103–1111, 2009.

XU, Y., LU, M. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **J. Haz. Mater.**, v.183, p.395-401, 2010.

YONG, R.N., MULLIGAN, C.N. **Natural Attenuation of Contaminants in Soils**. CRC Press, 2003. 336p.

YU, H., LI, F., YU, W., LI, Y., YANG, G., ZHOU, S. Assessment of organochlorine pesticide contamination in relation to soil properties in the Pearl River Delta, China. **Sci. Total Environ.**, v.447, p.160-168, 2013.

Table 1. List of the main researches carried out with several endpoints and bioassays to evaluate the efficiency of different bioremediation processes of contaminated soils.

Bioremediation technologies	Contaminants	Bioassays	Endpoints	References
In situ bioremediation	TNT	Soil microbial assay Luminescent bacteria assay (*V. fischeri*)	Toxicity (CO_2-production rate) Toxicity (luminescence inhibition)	Frische and Höper (2003)
	Petroleum hydrocarbons (aliphatic hydrocarbons; n-alkanes; soprenoids; aromatic hydrocarbons) Heavy metals	Microtox® SPT (*V. fischeri*) Ostracodtoxkit™ (*H. incongruens*) Phytotoxkit™ (*Sorghum saccharatum*, *L. sativum*, *Sinapis alba*) Ames test (*Salmonella typhimurium*)	Toxicity (luminescence inhibition) Toxicity (mortality, growth inhibition) Toxicity (germination and growth inhibition) Mutagenicity (number of revertants)	Steliga et al. (2012)
Natural attenuation	BTEX	Bioluminescence-based bacterial bioassays	Toxicity (BTEX-specific induced biosensor, luminescence inhibition)	Dawson et al. (2008)
Bioaugmentation/ Biostimulation	Crude oil	Microtox® test (*P. phosphoreum*)	Toxicity (luminescence inhibition)	Xu and Lu (2010)
	Crude oil	Microtox® test (*P. phosphoreum*)	Toxicity (luminescence inhibition)	Gong (2012)
	PAHs and arsenic co-contamination	Microtox® (*V. fischeri*)	Toxicity (luminescence inhibition)	Elgh-Dalgren et al. (2011)
	Benzo[α]pyrene	Microtox® (*V. fischeri*) Seed germination and root elongation test (*L. sativum*)	Toxicity (luminescence inhibition) Toxicity (mortality, growth inhibition)	Russo et al. (2012)
	PAHs – anthracene, benzo[α]pyrene, pyrene	Root elongation test (*L. sativa*) Ostracod (*H. incongruens*)	Toxicity (growth inhibition) Toxicity (mortality)	Hamdi et al. (2007a)
	Diesel Crude oil	Microtox® SPT (*V. fischeri*)	Toxicity (luminescence inhibition)	Coulon et al. (2005)
	Petroleum hydrocarbons	Mitotic, nuclear and chromosomal aberrations assays (*A. cepa*)	Genotoxicity (chromosomal breaks, losses, bridges, adherences, multipolar anaphases, polyploidy cells, micronucleus and nuclear buds)	Souza et al. (2013)
	PAHs	DT 40 DNA damage response analysis (chicken DT40 B-lymphocyte isogenic cell line and 15DNA-repair-deficient DT40 mutant cells)	Toxicity (mortality) Genotoxicity (DNA damage)	Hu et al. (2012)
	PAHs	Comet assay (RTL-W1 cells) CALUX AhR agonist bioassay (H4IIE rat hepatoma cells)	Genotoxicity (DNA damage) Ah receptor (AhR) activating compounds	Andersson et al. (2009)

Table 1 (continued)

	Creosote	Microtox® SPT (*P. phosphoreum*)	Toxicity (luminescence inhibition)	Phillips et al. (2000)
		Seed germination and root elongation test (*L. sativa*)	Toxicity (germination and growth inhibition)	
		Earthworm survival test (*E. fetida*)	Toxicity (mortality)	
		SOS-chromotest (*Escherichia coli*)	Genotoxicity (DNA damage)	
		Toxi-chromotest (*E. coli*)	Toxicity (inhibition of β-galactosidase production)	
		RBC haemolysis assay	Toxicity (mortality)	
	Atrazine herbicide	Earthworm reproduction test (*E.fetida*)	Toxicity (reproduction)	Chelinho et al. (2010)
		Collembolans reproduction test (*Folsomia candida*)	Toxicity (reproduction)	
		Cladoceran reproduction test (*D. magna*)	Toxicity (reproduction)	
		Microalgae test (*P. subcapitata*)	Toxicity (algal growth)	
		Biomass production test (*Avena sativa*)	Toxicity (biomass production)	
Biosorption	Chromium	Seed germination test (wheat)	Toxicity (germination and growth inhibition)	Srivastava and Thakur (2006)
		Peroxidase enzyme assay (wheat leaves)	Toxicity (peroxidase activity)	
Biopiles	PAHs	Ames test (*S. typhimurium*)	Mutagenicity (number of revertants)	Brooks et al. (1998)
	Petroleum hydrocarbons	Microtox® SPT (*V. fischeri*)	Toxicity (luminescence inhibition)	Delille et al. (2008)
	Petroleum hydrocarbons	Spirotox (*Spirostomum ambiguum*)	Toxicity (mortality, bending and shortening of the cell)	Plaza et al. (2005)
		Microtox® (*V. fischeri*)	Toxicity (luminescence inhibition)	
		Ostracodtoxkit F^{TM} (*H. incongruens*)	Toxicity (mortality, growth inhibition)	
		Umu-test with S9-activation (*S. typhimurium*)	Genotoxicity (DNA damage)	
		Seed germination and root elongation test (*S. cereale*, *L. sativa*, *Z. mays*, *L. sativum*, *T. vulgare*, *B. oleracea*)	Toxicity (germination and growth inhibition)	

Table 1 (continued)

Landfarming	PAHs	Microtox® test (*V. fischeri*) Alga test (*P. subcapitata*) *Daphnia* test (*D. magna*) Mutatox® test (*V. fischeri*) Seed test (*L. sativa*)	Toxicity (luminescence inhibition) Toxicity (growth inhibition) Toxicity (mobility inhibition) Genotoxicity (number of revertants) Toxicity (germination inhibition)	Mendonça and Picado (2002)
	PAHs	Microtox® test (*P.phosphoreum*)	Toxicity (luminescence inhibition)	Marin et al. (2005)
	PAHs	Phytotoxicity assay (*L. sativa*) Ostracod (*H. incongruens*)	Toxicity (growth inhibition) Toxicity (mortality)	Hamdi et al. (2007b)
	PAHs	Mitotic, nuclear and chromosomal aberrations assays (*A. cepa*)	Genotoxicity (chromosomal breaks, losses, bridges, adherences, multipolar anaphases, polyploidy cells, micronucleus and nuclear buds)	Souza et al. (2009)
	Diesel hydrocarbons	Earthworm survival test (*E.fetida*) Seed germination test (wheat, rape and red clover) *Daphnia* test (*D. magna*) Microbial assay Algal growth inhibition test (*C. vulgaris*)	Toxicity (mortality and weight) Toxicity (seedling emergence, wet weight) Toxicity (mobility inhibition) Toxicity (soil respiration inhibition, soil enzymatic activities inhibition) Toxicity (growth inhibition)	Frutos et al. (2012)
Vermicomposting	Municipal sludge (heavy metals; other organic compounds)	Mitotic index (*A. cepa*) Mitotic and chromosomal aberrations (*A. cepa*) Phytotoxicity assay (*A. cepa*)	Toxicity (mitotic index inhibition) Genotoxicity (chromosomal bridges, fragments and gaps) Phytotoxicity (plant weight, root elongation and chlorophyll contents)	Srivastava et al. (2005)
	Lead	Earthworm acute toxicity test (*L. terrestris*, *E. fetida*) Seed germination/Root elongation test (*L. sativa*, *A. sativa*) Mitotic index (*A. cepa*) Mitotic and chromosomal aberrations (*A. cepa*)	Toxicity (mortality) Toxicity (mortality, germination and growth inhibition) Toxicity (mitotic index inhibition) Genotoxicity (chromosomal aberrations)	Chang et al. (1997)

Table 1 (continued)

Phytoremediation	PAHs	Earthworm survival test (*E. fetida*) Nematodes survival test (*C. elegans*) Seed germination test (*L. sativa*) Microbial respiration	Toxicity (mortality and weight) Toxicity (mortality) Toxicity (germination inhibition) Toxicity (CO_2-production rate)	Cofield et al. (2008)
	PAHs – anthracene, benzo[α]pyrene, pyrene	OstracodToxKit F^{TM} (*H. incongruens*) Seed germination test (*L. sativa*)	Toxicity (mortality) Toxicity (germination inhibition)	Hamdi et al. (2012)
	PAHs – naphthalene, anthracene, phenanthrene, fluorine, pyrene	Seed germination and seedlings fresh weight tests (*L. sativum*)	Toxicity (germination inhibition and fresh weight reduction)	Maila and Cloete (2002)
	Lead	Seed germination test, root and shoot elongation test (*H. vulgare*)	Toxicity (germination and growth inhibition)	Varun et al. (2011)
	Tebuthiuron herbicide	Seed elongation and biomass test (*Avena strigosa*)	Toxicity (biomass, growth inhibition)	Pires et al. (2005)

Artigo 2. Eficiência da atenuação natural monitorada de lodo de esgoto para produção de recondicionantes de solos agrícolas

RESUMO

A disposição final adequada de resíduos sólidos (lodo de esgoto – LE) gerados pelas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE). vem sendo considerada um sério problema ambiental, mas também uma alternativa viável para ser aplicado na agricultura, por ser rico em matéria orgânica e nutrientes. No entanto, o LE pode ser fonte de contaminação de diversos agentes tóxico. Por isso, sua aplicação na agricultura envolve cuidados especiais, para que sejam evitados danos ao ambiente e, consequentemente aos organismos expostos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a possibilidade de descontaminação do LE, após diferentes períodos de atenuação natural monitorada. Para isso, amostras de LE e de associações de solo/LE, nas proporções de 10, 25 e 50% de LE, foram enterradas, por um período de 0, 2, 6 e 12 meses, em covas feitas em um ambiente controle, livre de contaminação. A espécie *Allium cepa* foi utilizada como organismo teste para verificação da eficiência do processo de biorremediação. Entre as diferentes substâncias analisadas, a caracterização química do LE revelou a presença de *m*- e *p*-cresol em concentrações bastante elevadas, principalmente para os períodos 0 e 2 meses de atenuação natural. A identificação dos micro-organismos mostrou a presença de 17 gêneros diferentes de bactérias e uma variação na composição microbiana entre as amostras, ao longo dos períodos testados. Tanto o LE bruto como seu extrato aquoso, induziram danos no material genético de *A. cepa*, mesmo quando associado a amostra de solo. No entanto, foi observada uma diminuição desses efeitos com o passar do tempo de biorremediação, embora tenham sido observados efeitos significativos para a concentração mais alta testada (100% de LE). Assim, esses resultados mostram a necessidade de realizar processos de atenuação natural de associações de LE/solo, por um tempo de, pelo menos, 12 meses, pois o LE bruto não se caracteriza em um material viável de ser utilizado como recondicionante de solo, mesmo após a atenuação natural. Por isso sugerimos muita cautela na utilização agrícola do LE, bem como a necessidade da realização de metodologias que contribuam para a sua detoxificação. Todas as associações de solo/LE se mostraram eficientes para utilização como recondicionantes de solo, desde que passem primeiramente por um período de atenuação natural de 12 meses.

Palavras-chave: *Allium cepa*, aberrações cromossômicas, micronúcleo, biorremediação, citotoxicidade, genotoxicidade.

1. INTRODUÇÃO

Lodos de esgoto (LEs) são resíduos semi-sólidos, predominantemente orgânicos, resultantes do tratamento de efluentes urbanos ou industriais. Embora o LE possa apresentar uma composição muito variada, ele é rico em matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, além de conter outros nutrientes como potássio, cálcio e magnésio (GRAY, 2010). Dessa forma, por apresentar uma alta concentração de matéria orgânica e alguns elementos básicos para as plantas, ele pode se caracterizar em uma alternativa viável para a sua utilização como fertilizante em áreas agrícolas e/ou como recondicionante das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (SÁNCHEZ-BRUNETE et al., 2007).

Pela crescente quantidade de LE produzido nas cidades, decorrente do aumento do esgoto gerado pela população, seu uso em atividades agrícolas pode se caracterizar em um importante destino para este resíduo, tanto no aspecto econômico como ambiental (BRIGHT; HEALEY, 2003). No entanto, o LE pode conter contaminantes químicos como metais e substâncias orgânicas tóxicas, além de micro-organismos patogênicos (HOLMSTRUP et al., 2001; TSAKOU et al., 2001; LOPES et al., 2005), que podem descaracterizar as condições físicas do solo. Por isso, sua aplicação na agricultura envolve cuidados especiais para que sejam evitados danos ao meio ambiente, aos organismos diretamente expostos e também ao homem (CLARKE; SMITH, 2011).

A aplicação de LE contaminado com metais, patógenos e poluentes orgânicos em solos agrícolas pode afetar a funcionalidade e a biodiversidade edáfica (TAS, 2010) que, em longo prazo, pode prejudicar toda a cadeia trófica associada (ROIG et al., 2012). Outro problema ainda é a possibilidade de haver uma lixiviação química dos solos receptores de LE pelas águas pluviais, o que pode transferir a contaminação para águas superficiais e até mesmos as subterrâneas (KELLER; MCGRATH; DUNHAM, 2002). Tais fatos têm estimulado ações mundiais no desenvolvimento de novas tecnologias que permitam otimizar o destino do LE (TAS, 2010). Entre os diferentes processos de biorremediação, a atenuação natural monitorada é considerada uma metodologia bastante vantajosa para diminuir a toxicidade de resíduos orgânicos presentes em ambientes contaminados, por apresentar baixo custo e utilizar micro-organismos presentes no próprio local da contaminação (BHUPATHIRAJU et al., 2002).

A realização de análises químicas de amostras ambientais é de extrema importância para a caracterização do comprometimento de áreas contaminadas, embora estas análises somente estimem as concentrações das substâncias tóxicas presentes no ambiente, mas não refletem na biodisponibilidade desses químicos para a biota (MOREIRA; SOUSA;

CANHOTO, 2008). Assim, tem sido cada vez mais importante a realização de bioensaios que possam estabelecer os reais impactos dos contaminantes sobre os ambientes (PLAZA et al., 2005). Os bioensaios permitem observar os efeitos isolados ou associados de substâncias presentes no meio e, assim, reconhecer a complexidade dos seus processos bioquímicos e fisiológicos (ROOS et al., 2004).

Dentre os organismos utilizados para avaliação da eficiência de processos de biorremediação, a espécie *A. cepa* tem se destacado como um bioindicador adequado para este fim (MAZZEO et al., 2010; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011; MIRANDA et al., 2013; SOUZA et al., 2013).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a efetividade do processo de atenuação natural monitorada de um LE de origem doméstica, por meio de ensaios com o organismo-teste *A. cepa*, a fim de se avaliar, comparativamente, o seu potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico, antes e após diferentes períodos de biorremediação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material e preparo das amostras

O material utilizado foi um LE anaeróbio centrifugado, proveniente de uma ETE localizada na cidade de Rio Claro (São Paulo, Brasil), a qual recebe somente efluente de esgoto de origem doméstica. Após a coleta, amostras do LE foram misturadas com solo coletado no Jardim Experimental da UNESP de Rio Claro, nas proporções de 10, 25 e 50% de LE.

O solo utilizado foi caracterizado quanto à sua granulometria, matéria orgânica e condutividade elétrica (Tabela 1).

2.2. Biorremediação do LE por atenuação natural monitorada

As amostras de LE 100% e as associações com 10, 25 e 50% de LE em solo foram colocadas em sacos plásticos individuais, microperfurados com furos de 0,5 mm de diâmetro e espaçamento de 1 cm entre eles. Os sacos foram enterrados no Jardim Experimental da UNESP de Rio Claro (São Paulo, Brasil), em covas com, no máximo, 50 cm de profundidade, a fim de permitir a interação entre as amostras e o solo do meio externo. O experimento foi realizado em duplicata durante um período de 2, 6 e 12 meses, antes de serem realizados os bioensaios.

2.3. Obtenção do extrato aquoso (solubilizado)

O extrato aquoso de cada amostra foi obtido seguindo a metodologia proposta pela norma NBR 10.006 da ABNT (2004), suspendendo 125g da amostra (peso seco) em 500 mL de água ultra pura, seguido de agitação constante em baixa velocidade por 5 minutos. Para as amostras de LE 100%, foi adicionado o dobro de água (1000 mL). Após 7 dias de decantação da mistura amostra/água a 22 °C, foi coletada a fase líquida da mistura, sendo a mesma filtrada em membrana com 0,45 μm de porosidade, para a obtenção de extratos contendo substâncias solúveis em água.

2.4. Análise química

A análise das amostras de LE 100%, após cada período de atenuação natural monitorada, foi realizada pelo laboratório Analytical Technology Company (São Paulo – Brasil), utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS). Os parâmetros analisados foram baseados na Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 375 (BRASIL, 2006), a qual determina os limites máximos de poluentes para uso de LE em solos agrícolas no Brasil.

Foram também identificados por cromatografia gasosa, os principais compostos presentes no extrato aquoso do LE.

2.5. Identificação e quantificação dos micro-organismos

Para a identificação dos micro-organismos presentes no LE e no solo, foi adicionado 1 g da amostra (LE 100% ou solo controle) em 100 mL de solução salina estéril, após cada período de atenuação natural monitorada. Para avaliar a diversidade de micro-organismos das amostras, 10 μL da solução foram semeados com o auxílio de uma alça, por esgotamento, em placas de Petri contendo Agar Sangue, Agar Mac Conkey, Agar SS e Agar Sabouraud. As placas foram incubadas a 35 °C, com exceção do Agar Sabouraud, cujas placas foram mantidas em temperatura ambiente. A leitura das placas foi realizada a cada 24h, durante 7 dias. Os diferentes micro-organismos encontrados nas amostras foram isolados e identificados, inicialmente, por testes bioquímicos convencionais. Posteriormente, esses micro-organismos foram identificados por meio do equipamento de automação Vitek II BioMerieux®.

A quantificação de micro-organismos foi feita pela contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônia), referente a 1 g do material original.

2.6. Ensaio com sementes de *A. cepa*

Sementes de *A. cepa* (2n = 16 cromossomos), de um mesmo lote e mesma variedade (cebola baia periforme) foram submetidas à germinação em placas de Petri individuais contendo: 1- as próprias associações de solo/LE e o LE 100%; 2- os respectivos extratos aquosos dessas associações de solo/LE e do LE 100%, ambos realizados antes e após o processo de atenuação natural monitorada.

Os tratamentos controles foram realizados em água ultra pura (controle negativo - CN), em extrato aquoso de solo referência, em solo referência, (solo controle) e em 10 mg/L de metilmetano sulfonato (Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3) (controle positivo - CP). Todos os testes foram realizados em duplicata.

Após a germinação, as radículas com cerca de 2,0 cm de comprimento foram coletadas e fixadas em uma mistura de álcool e ácido acético (3:1 – v/v) por 6 a 18 h em temperatura ambiente. Decorrido esse período, foi preparado um novo fixador onde as radículas foram armazenadas a 4 °C até a sua utilização. Para o preparo das lâminas da região meristemática e da região F_1 das radículas, seguiu-se o protocolo descrito por Leme e Marin-Morales (2008).

2.7. Análise dos resultados

Os endpoints de genotoxicidade foram estimados em células meristemáticas de *A. cepa* que apresentaram diferentes tipos de aberrações cromossômicas (perdas, pontes, atrasos, aderências cromossômicas, entre outros) e de anormalidades nucleares (broto, células binucleadas, núcleo lobulado, etc). A citotoxicidade foi avaliada por meio e alterações no índice mitótico dessas células e o potencial mutagênico foi avaliado pela presença de micronúcleos em células meristemáticas e F_1 e de quebras cromossômicas em células meristemáticas.

A análise destes parâmetros foi feita em microscópio de luz, pela contagem de cerca de 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina, para um total de 10 lâminas avaliadas por tratamento.

A eficiência do processo de atenuação natural monitorada foi avaliada comparando os resultados obtidos para cada amostra, em cada período testado, com o CN, por meio do teste estatístico de Mann-Whitney ($p<0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise química

Uma das grandes preocupações em relação a aplicação do LE em solos agrícolas é a presença de grandes quantidades de metais no LE, o que pode impactar negativamente o solo. Uma vez adicionados ao solo, os metais são muito difíceis de serem removidos, principalmente devido a sua mobilidade e seu tempo residual, o que leva a uma interferência, por longo prazo, nas propriedades do solo e, consequentemente, na qualidade da cultura agrícola (JIANG; FAN, 2008). Além disso, ao contrário dos contaminantes orgânicos, a maioria dos metais não sofre degradação microbiana ou química (PARK et al., 2011), necessitando de tecnologias mais específicas para a sua remoção do ambiente, o que, muitas vezes, inviabiliza seu uso na agricultura.

De acordo com Andrade e Abreu (2006), o LE de ETEs que recebem efluentes estritamente domésticos possui uma quantidade baixa de metais potencialmente tóxicos, o que o caracteriza como um promissor fertilizante agrícola. Pelos resultados obtidos em nossos estudos (Tabela 2), observamos que as concentrações de metais encontradas no LE da ETE de Rio Claro estão abaixo das estabelecidas pelo CONAMA 375 (BRASIL, 2006), o que corrobora as afirmações de Andrade e Abreu (2006). O fato deste LE não conter altas concentrações de metais o caracteriza como um LE com potencialidade de ser utilizado como fertilizante de solos agricultáveis.

Os resultados das análises químicas do LE indicaram a presença de *m*- e *p*-cresol, em concentrações muito acima do valor estabelecido pela legislação (BRASIL, 2006), tanto para o LE inicial, como para o LE degradado por 2 meses (Tabela 2). Essas substâncias também foram detectadas em altas concentrações nos extratos aquosos de LE, tanto para os tempos 0 e 2 meses (Tabela 3).

Os cresóis são substâncias pertencentes a um grupo de compostos químicos fenólicos utilizados, principalmente, como intermediários em diversos processos industriais. Os *m*- e *p*-cresol são utilizados na produção de herbicidas de contato, inseticidas piretróides, fragrâncias, aromas, antioxidantes, anti-chamas, resinas sintéticas, desinfetantes, explosivos, entre outros (OECD, 2003; ATSDR, 2008; TALLUR; MEGADI; NINNEKAR, 2009). Segundo Arya, Kumar e Kumar (2011), essas substâncias também estão presentes em efluentes de indústrias têxteis, de papel e celulose, de conversão de carvão e em fungicidas. Os isômeros de cresóis também são amplamente distribuídos na natureza, por estarem naturalmente presentes em óleos de algumas plantas (p.e. jasmim, canela, hortelã, eucalipto, coníferas e cânfora), petróleo, carvão de alcatrão e em materiais geológicos das erupções vulcânicas, além de

serem frequentemente produzidos por micro-organismos de solo, como metabólitos intermediários da biodegradação (IPCS, 1995). Dessa forma, os cresóis chegam ao ambiente tanto por fontes naturais como pela combustão de carvão e madeira, escape de veículos, refinarias de petróleo e até mesmo pela fumaça de cigarro (ATSDR, 2008). Assim como em nosso estudo, Bright e Healey (2003) também detectaram a presença de *m*- e *p*-cresol em LEs provenientes de 5 ETEs da região metropolitana da cidade de Vancouver (Canadá), em concentrações que variaram de 0,46 e 940 μg/g, sendo que o valor mais alto encontrado excedeu os limites permitidos para a disposição do LE em solos. Harrison et al. (2006) também relataram, em sua revisão, trabalhos que identificaram a presença de metilfenóis em LE em concentrações de até 1160 mg/kg de peso seco.

O processo de atenuação natural realizado neste estudo mostrou que, após 6 meses de biorremediação, o *m*- e *p*-cresol já não estavam mais presentes nas amostras brutas de LE (6 e 12 meses), em quantidades detectáveis pelos métodos utilizados nas nossas análises químicas, indicando que houve degradação.

Outras substâncias preocupantes que estavam presentes no LE estudado foram as dioxinas (dibenzo-p-dioxinas policloradas - PCDD) e os furanos (dibenzofuranos policlorados - PCDF) (Tabelas 2 e 4). Segundo Kulkarni, Crespo e Afonso (2008) e Suzuki et al. (2011), a presença de dioxinas e furanos no ambiente ocorre, principalmente, como resultado de ações antropogênicas referentes a incinerações de resíduos sólidos domésticos e hospitalares; processos de combustão do diesel, madeira e carvão; atividades industriais, como o branqueamento da celulose; siderurgia; fabricação de pesticidas e incineração de químicos halogênicos; além de ações de micro-organismos e reações fotoquímicas de determinadas substâncias. A presença de dioxinas e furanos no LE também foi relatada por Klimm et al. (1998). Os autores atribuíram a presença dessas substâncias à transformação microbiana de substâncias como o pentaclorofenol durante o processo de tratamento de esgoto.

O governo brasileiro não estabelece limites dessas substâncias em LE a ser disponibilizado em solo agrícola. Porém, a legislação canadense estabelece, para solos agricultáveis, um valor limite, variando de 17 a 50 ng TEQ/kg peso seco de LE e, para solos não agricultáveis, de até 100 ng TEQ/kg peso seco de LE (LEBLANC; MATTHEWS; RICHARD, 2008). No presente estudo, o LE 100% inicial (tempo 0) apresentou o valor de 4,149 ng I-TEQ/kg, tendo este valor aumentado para 6,601 ng I-TEQ/kg, após permanecer enterrado por 2 meses; para 7,579 ng I-TEQ/kg após 6 meses e para 10,105 ng I-TEQ/kg após 12 meses (Tabela 4). Por estes resultados podemos inferir que a presença destas

substâncias pode estar relacionada à degradação microbiana de outros compostos não identificados nas análises químicas, como as bifenilas cloradas (PCBs), pois quanto maior o tempo de degradação, maior foi a quantidade observada dessas substâncias nas amostras, devido ao fato destes compostos se caracterizarem como produtos persistentes. Outra explicação seria pela diminuição da massa total do LE, conforme apresentado na Tabela 5, ao longo do processo de atenuação natural, com uma consequente perda de água, sem perdas das dioxinas e furanos, resultando em uma concentração final mais elevada dessas substâncias. Embora tenha havido um aumento nos valores de dioxinas e furanos ao longo do tempo de biodegradação, os resultados ainda não se mostraram preocupantes, segundo os índices da legislação canadense, pois estão abaixo de 17 ng I-TEQ/kg de peso seco de LE.

Na análise química realizada com o LE que permaneceu enterrado por 2 meses apareceu uma nova substância (bis[2-Etilexil]ftalato) que não estava presente na análise do LE inicial. Esta substância é um plastificante sintético que apresenta alta estabilidade, fluidez e baixa volatilidade, sendo amplamente adicionado aos plásticos para torná-los mais flexíveis, em especial aqueles feitos de cloreto de polivinila (PVC) (CARRARA; MORITA; BOSCOV, 2011). Como essa substância não foi detectada na análise química inicial, acreditamos que sua presença na amostra de LE atenuado por 2 meses seja decorrente do contato da amostra com o saco plástico utilizado no experimento, o qual, possivelmente, liberou o plastificante para a amostra. No entanto, esta substância não foi mais encontrada nas análises químicas subsequentes realizadas com as amostras de LE enterradas por 6 e 12 meses (Tabela 2). Entendemos que a liberação de ftalato ocorreu durante os primeiros contatos do plástico com as amostras, que deve ter ocorrido até o segundo mês do experimento. Após este período, o ftalato já havia se esgotado do material acondicionante das amostras e também sofrido processo de degradação (saco plástico).

3.2. Caracterização microbiológica do LE

Os resultados referentes à caracterização microbiológica do LE, após os períodos de atenuação testados e do solo referência estão apresentados na Tabela 6.

Para a amostra de solo referência, foi encontrada uma baixa diversidade de micro-organismos, especificamente, a bactéria *Bacillus* sp e o fungo *Penicillium* sp. Em relação às amostras de LE, houve uma maior diversidade de micro-organismos, porém foram, em sua maioria, constituídas exclusivamente por bactérias.

Segundo Cavallet e Selbach (2008), a aplicação de LE, derivado de tratamento de curtumes, em solo agrícola promoveu um aumento de populações microbianas do solo, com

um crescimento mais acentuado de bactérias, as quais apresentaram estreita relação com a quantidade de matéria orgânica no solo. Esses autores também concluíram que a aplicação dos LEs de curtume não prejudicou a população microbiana e, consequentemente, o processo de biodegradação.

Em nossas análises, foram encontrados 17 gêneros diferentes de bactérias, pertencentes tanto ao grupo das Gram-positivas como das Gram-negativas. Entre as Gram-positivas encontradas, todas as bactérias são anaeróbias facultativas, pertencentes às famílias Enterococcaceae (*Enterococcus fecalis*), Staphylococcaceae (*Staphylococcus*) e Bacillaceae (*Bacillus* sp). Entre as Gram-negativas, foram observadas bactérias aeróbias, pertencente à família Pseudomonadaceae (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida/fluorescens*), Alcaligenaceae (*Achromobacter denitrificans*), Brucellaceae (*Ochrobactrum anthropi*), Burkholderiaceae (Complexo *Burkholderia cepacia*), um bacilo Gram negativo não fermentador não identificado quanto a espécie, além de bactérias anaeróbias facultativas, todas pertencentes à família Enterobacteriaceae (*Buttiauxella agrestis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis, Providencia rettgeri* e *Serratia marcescens*). A característica principal dessa última família (que também permitiu, inclusive, o seu agrupamento) é que são bactérias oxidases negativas e catalases positivas, produtoras de ácidos e/ou gases, redutoras de nitrato e que fermentam glicose a ácido (DOWNES; ITO, 2001; WINN et al., 2006). Outros estudos também mostraram resultados semelhantes quanto à presença de bactérias, como descrito por Sengupta et al. (2010), onde os autores determinaram a biodiversidade microbiana de diversas amostras de solo úmido e arenoso, coletados em regiões onde ocorriam o descarte de efluentes de esgoto na Índia. A contagem dos autores quanto à presença de colônias de bactérias anaeróbias na amostra indicou um valor máximo de $8{,}8.10^7$ UFC/g. Em relação à diversidade microbiológica, foram encontrado pelos autores cinco diferentes gêneros de bactérias: *Clostridium* (79,34%), *Staphylococcus* (9,09%); *Bacillus* (7,44%); *Escherichia* (2,48%) e *Enterobacter* (1,65%). Estudos realizados por Turovskiy e Mathai (2006) também apontaram a presença de micro-organismos pertencentes aos grupos de coliformes totais, coliformes fecais e estreptococos fecais, além de bactérias do gênero *Salmonella* sp e da espécie *P. aeruginosa* em lodos de tratamentos primários, secundários e misturas.

Pelos nossos resultados foi possível observar que *Bacillus* sp foi a única bactéria presente em todas as amostras analisadas (Tabela 6, Figura 1), podendo ser uma espécie importante para a biodegradação de poluentes, pela sua resistência às condições do LE. Além disso, foi possível observar uma alternância na composição microbiana das amostras (Figura

1), envolvendo enterobactérias e bactérias não fermentadoras, durante os períodos em que o LE permaneceu enterrado, possivelmente pelo fato de que grupos específicos de micro-organismos tenham atuado nas diferentes etapas do processo de biodegradação. Isto pode ser explicado pela capacidade de degradação por determinadas bactérias em cada uma das etapas do processo de biodegradação, onde metabólitos resultantes de quebras de moléculas grandes podem servir como substrato para outros micro-organismos degradadores, estabelecendo assim, uma sucessão microbiológica ao longo das várias etapas da degradação dos componentes do LE.

Diversos estudos sugerem que alguns dos micro-organismos identificados nas amostras de LE estudadas são potencialmente degradadores das substâncias inicialmente presentes nessas amostras. Saravanan, Pakshirajan e Saha (2008) concluíram que o uso de um consórcio microbiano misto em biorreatores, isolado de uma ETE, constituído predominantemente por *Pseudomonas* sp, foi potencialmente capaz de degradar compostos fenólicos por estas bactérias consumir, completamente, o fenol e o *m*-cresol em um curto período de tempo (concentração individual de 600 $mg.L^{-1}$ em 26 h e 37 h, respectivamente).

Ho, Chen e Lee (2010) testaram o potencial de biodegradação dos três isômeros de cresol (*o*, *m* e *p*) por micro-organismos isolados de lodo ativado, obtido de uma ETE. Esses autores encontraram cerca de 30 espécies diferentes de bactérias, evidenciando uma alta diversidade bacteriana para o LE estudado. O consórcio formado pelas espécies *Bdellovibrio* sp, *Acinetobacter* sp, *Streptococcus* sp, *Pseudomonas* sp, *Alcaligenes* sp e *Nocardiodes* sp foi considerado o mais eficiente para a degradação do *o*-cresol, assim como as bactérias *Corynebacterium* sp, *Pseudomonas* sp e *Alcaligenes* sp foram consideradas mais eficientes para a degradação do *m*-cresol. Para o *p*-cresol, o grupo de bactérias que mais se destacou foi o constituído por *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Corynebacterium* sp e *Rhodococcus* sp. Dentre todas as bactérias citadas pelos autores, destacamos que a *Pseudomonas* sp e *Bacillus* sp também estavam presentes em nossas amostras.

Em estudos de degradação do *p*-cresol, realizados com a bactéria *Bacillus* sp linhagem PHN 1, constatou-se que esta é eficiente na mineralização dessa substância, podendo ser empregada tanto como células livres (TALLUR et al., 2006) como células imobilizadas (TALLUR; MEGADI; NINNEKAR, 2009).

Um consórcio de bactérias constituído por *B. cereus*, *Arthrobacter* sp, *B. licheniformis*, *Halomonas salina*, *B. pumilus* e *P. aeruginosa* mostrou eficiência na degradação de compostos fenólicos de ambientes salinos, podendo ser utilizado para tratamentos de efluentes industriais de alta salinidade (GAYATHRI; VASUDEVAN, 2010).

Poucos estudos relatam a biodegradação de compostos fenólicos por *Serratia* sp. Dentre estes estudos, Sharma, Kachroo e Kumar (2002) observaram que a bactéria *S. liquefaciens* foi capaz de degradar fenol; Pradhan e Ingle (2007) concluíram que a espécie *S. plymuthica* foi eficiente na mineralização de derivados fenólicos, incluindo o *p*-cresol. Outros estudos mostraram ainda que a espécie *S. marcescens*, também encontrada no nosso estudo, apresenta potencial para degradar pentaclorofenol (SINGH et al., 2007) e hexaclorobutadieno (LI et al., 2008).

Dentre as bactérias identificadas em nosso estudo, especificamente para o LE, observamos que as espécies *Bacillus* sp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia* sp já foram identificadas em outros LEs, sendo reconhecidas como potenciais agentes de degradação deste resíduo. O *Bacillus* sp foi encontrado na amostra de LE em todas as etapas da atenuação natural monitorada (tempos de 0, 2, 6 e 12 meses), confirmando o seu papel biodegradador de componentes de LE. Este micro-organismo já foi citado anteriormente por outros autores por se tratar de um agente biológico degradador de compostos fenólicos. Assim, nossos dados corroboram estas citações de que este organismo pode ser considerado um agente com potencial de degradar fenóis. Dentre os outros micro-organismos identificados neste estudo, as bactérias *P. aeruginosa* e uma espécie do gênero *Serratia* foram citadas por outros autores como eficiente na degradação de LE. Porém, não podemos atribuir a degradação dos isômeros de cresol encontradas no nosso material de estudo, pois estas bactérias não estavam presentes na amostra de LE com 2 meses de atenuação natural. Como estes compostos não persistiram além deste tempo, mesmo estas bactérias estando presentes no LE após 2 meses de atenuação, elas não poderiam então estar relacionadas com a degradação destes compostos (Figura 1).

Além do *Bacillus* sp, podemos inferir ainda como possíveis degradadores dos fenóis presentes no LE aqui estudado a *Enterobacter cloacae*, *Providencia rettgeri*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e um bacilo gram negativo não fermentador. Estas espécies não foram citadas em outros trabalhos de degradação de LE, sendo então uma citação inédita para este tipo de ação.

Chang, Wang e Yuan (2007) estudaram a biodegradação de quatro ésteres de ftalatos (dietilftalato, benzil-butilftalato, di-n-butilftalato e bis(2-etilexil)ftalato). Os autores isolaram 11 linhagens diferentes de bactérias aeróbias capazes de metabolizar os ftalatos, dentre elas a *Enterococcus* sp, *Bacillus benzoevorans*, *Sphingomonas* sp, *Corynebacterium* sp e um coco gram-positivo não identificado, que foram citados como os principais agentes biodegradadores. Esses mesmos autores também sugeriram que o LE pode fornecer nutrientes

que estimulam o crescimento de micro-organismos, o que favorece a degradação de compostos como o bis(2-etilexil)ftalato.

Yuan, Huang e Chang (2010) estudaram a degradação do dibutilftalato e do bis(2-etilexil)ftalato presentes em sedimentos de mangue do rio Tanshui (Taiwan). Os autores observaram que todas as bactérias que participaram do processo de biodegradação desses ftalatos pertenciam ao gênero *Bacillus*. Segundo estudos realizados por Niazi, Prasad e Karegoudar (2001), espécies do gênero *Bacillus* são capazes de metabolizar os ftalatos, utilizando-os como única fonte de carbono, por meio de reações de de-esterificação. Juneson, Ward e Singh (2001), ao estudarem a biodegradação de solos contaminados com bis(2-etilexil)ftalato em reatores sequenciais, também constataram que a espécie *B. brevis* estavam entre as bactérias predominantes da cultura, juntamente com as espécies *Brevibacterium iodinum* e *Rhodococcus luteus*. Os micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens* e *Bacillus* sp foram identificados por Azarova et al. (2003) como bactérias potencialmente degradadoras de bis(2-etilexil)ftalato, embora os autores considerem a bactéria *Micromonospora purpurea* M110 como a mais eficiente na degradação desse contaminante.

Nossos dados também sugerem a efetividade de gênero *Bacillus* na degradação de LE, corroborando as citações de Juneson, Ward e Singh (2001) sobre a capacidade de metabolização do ftalato por esta bactéria. Embora as bactérias *P. aeruginosa* e *P. putida* tenham sido citadas como degradadoras de compostos presentes no LE, não podemos inferir este potencial degradador a estas bactérias, uma vez que durante o período que estes compostos estavam presentes no LE, elas não foram identificadas nas amostras. Em nosso estudo, observamos ainda que as bactérias *Enterobacter cloacae*, *Providencia rettgeri*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e um bacilo gram negativo não fermentador também estar envolvidos com a biodegradação dos ftalatos.

Vários micro-organismos foram descritos na literatura como degradadores de dioxinas e furanos. No entanto, de acordo com Chang (2008), nenhuma bactéria isolada utiliza as dioxinas cloradas como fonte primária de carbono, sendo estas degradadas em baixas quantidades co-metabolicamente. Suzuki et al. (2011) relataram que a bactéria *Geobacillus* sp UZO 3 quebra a 2,7-diclorodibenzo-p-dioxina nos produtos intermediários 4',5-dicloro-2-hidroxidifenil e 4-clorofenol. Foi sugerido por Habe et al. (2002) que a espécie *Terrabacter* sp linhagem DBF63 degradada mais efetivamente dibenzofuranos mono e diclorados do que as dibenzo-p-dioxinas mono e dicloradas, quando estes estão presentes em solos. As bactérias *Pseudomonas* sp HH69 (FORTNAGEL et al., 1990), *Sphingomonas* sp RW1 (WILKES et al.,

1996), *Burkholderia* JB1 (PARSONS; BRUIJNE; WEILAND, 1998) também foram citadas como degradadoras de dibenzofuranos e dibenzo-p-dioxinas. Entretanto, em nossos estudos, dentro das condições propostas nos nossos ensaios, nenhum dos micro-organismos encontrados parece ter sido capaz de degradar as dioxinas e furanos, visto que estes compostos aumentaram ao longo do processo de atenuação.

Embora as bactérias encontradas neste estudo tenham origem da microbiota intestinal, portanto associadas a um potencial patogênico, elas também podem estar presentes em corpos d'água e em solos atuando como agentes degradadores. Os nossos resultados de caracterização microbiana do LE indicam que estas bactérias podem ser efetivas em biodegradar os compostos tóxicos do LE, como, por exemplo, o *m*- e *p*-cresol e o bis(2-etilexil)ftalato, mas não as dioxinas e furanos.

3.3. Avaliação da ação do LE sobre o organismo teste *A. cepa*

As Tabelas 7 e 8 apresentam os resultados obtidos em relação ao efeito do LE sobre o organismo *A. cepa*. O extrato aquoso de LE 100%, nos tempos 0 e 2 meses, bem como a amostra bruta de LE 100%, no tempo 2 meses, foram consideradas altamente tóxicos para este organismo teste, por inibir totalmente a germinação das sementes, impossibilitando a avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade para essas amostras. Resultados semelhantes foram observados por Walter, Martínez e Cala (2006), para testes de germinação de sementes de rúculas (*Lepidium sativum* L.) expostas a LE processados de diferentes maneiras. Os autores verificaram uma inibição de 100% na germinação das sementes pelo LE proveniente de digestão anaeróbia e pelo LE seco por processo térmico.

A avaliação do potencial citotóxico das sementes germinadas diretamente sobre o LE indicou que a concentração de 100%, no tempo de 6 meses, inibiu a divisão celular mitótica dessa espécie. Contudo, após 12 meses de atenuação natural, esse efeito não foi mais observado. Para os ensaios realizados com os extratos aquosos, não foi observada nenhuma diferença em relação ao índice mitótico para o LE atenuado por 6 meses. Esses resultados indicam que as substâncias responsáveis pelo efeito citotóxico observado não são carreadas pela água, já que não estavam presentes no extrato aquoso, devendo então estarem aderidas às partículas do próprio LE. Entretanto, após 12 meses de atenuação natural, elas não se encontram mais presentes no LE. Os dados apresentados anteriormente indicam que a toxicidade do LE foi decrescendo com o tempo de atenuação natural das amostras de LE, o que confirma a eficiência deste processo de biodegradação para este resíduo estudado.

Quanto aos efeitos genotóxicos, foram observadas frequências significativas de alterações celulares para as concentrações de 10, 25 e 50% de LE, para os tempos 0 e 2 meses e para as concentrações 25, 50 e 100%, para o tempo de 6 meses, tanto para os ensaios realizados com o LE bruto como para os extratos aquosos (Figura 2). No entanto, o extrato aquoso mostrou um efeito genotóxico mais severo para as células, pois para o tempo de 12 meses, a concentração de 100% de LE ainda apresentou um efeito significativo de genotoxicidade, indicando que as substâncias com potencial genotóxico estão biodisponíveis no LE mesmo após 12 meses de atenuação natural. Nossos dados de genotoxicidade indicam que o LE 100% não se caracteriza em um material interessante para ser utilizado como recondicionante de solo, pois sua toxicidade parece ser consideravelmente persistente no ambiente. Desta forma, pelos resultados obtidos, as misturas de solo/LE são mais indicadas para este destino agrícola.

Em relação ao efeito mutagênico observado em células meristemáticas de *A. cepa*, resultados significativos foram encontrados para as concentrações de 25% e 50%, para o tempo de 2 meses, e para a concentração de 100%, para o tempo de 6 meses, para ambos os ensaios (LE bruto e extrato aquoso). Para o extrato aquoso, a amostra de LE 100%, no tempo de 2 meses, também induziu uma frequência de MN significativa (Figuras 2 A4, B4 e C4). Os resultados significativos encontrados para as células F_1 indicam que os danos observados nas células meristemáticas foram transferidos e fixados para células da região F_1. Dessa forma, mesmo em concentrações menores, o LE estudado ainda mostrou-se capaz de causar danos ao material genético do organismo. Estes dados reforçam os outros parâmetros de toxicidade aqui estudados, pois o LE 100% tem uma difícil detoxificação quando comparado com as amostras das associações de solo/LE. O tempo de 12 meses, por todos os resultados acima descritos, parece ser um excelente período para a degradação de muitas substâncias mutagênicas presentes em LE.

A indução de danos genotóxicos em *A. cepa* decorrentes da exposição a LE também foi relatado por outros autores, como Srivastava et al. (2005), que observaram uma diminuição do índice mitótico e uma frequência significativa de aberrações cromossômicas ocasionados pela exposição a extrato aquoso de LE coletado em uma cidade da Índia. Os autores inferiram que esse resultado possivelmente seja decorrente do efeito combinado de metais pesados ou de outros compostos orgânicos não identificados no LE estudado. Extratos aquosos de LE, provenientes de cinco ETEs da zona metropolitana de São Paulo, também causaram danos ao material genético de *A. cepa* (CARITÁ, 2007). Christofoletti; Francisco e

Fontanetti (2012) também observaram um efeito genotóxico significativo, quando sementes de *A. cepa* foram expostas a biossólido bruto de uma cidade do estado de São Paulo (Brasil).

Provavelmente, os efeitos genotóxicos e mutagênicos observados em nosso estudo sejam decorrentes da presença de substâncias orgânicas tóxicas, como por exemplo o cresol, bem como do efeito sinergístico de todas as substâncias presentes no LE, incluindo os metais pesados. De acordo com a ATSDR (2008), os resultados positivos obtidos em seres humanos e animais, em testes *in vitro*, sugerem que cresóis apresentam capacidade de reagir com o DNA, portanto de ação genotóxica. Estes compostos são ainda descritos como possíveis carcinógenos humanos. Embora os resultados das análises químicas indiquem uma ausência de substâncias acima do limite estabelecido pela legislação, para os períodos de 6 e 12 meses, foi observado um efeito significativo de genotoxicidade e mutagenicidade para a espécie *A. cepa*, o que sugere que outras substâncias mesmo não identificadas quimicamente no LE, por não serem exigidas pela legislação para a disposição do LE em ambientes agrícolas, possam estar presentes. Uma outra hipótese quanto ao efeito observado seria o sinergismo dos contaminantes presentes que podem estar proporcionando esses resultados. A presença de dioxinas e furanos parece não exercer influência prejudicial para este organismo, já que as concentrações dessas substâncias aumentaram nas amostras ao longo dos períodos de biorremediação, enquanto que os efeitos celulares diminuíram.

No entanto, pelo LE se caracterizar como uma matriz complexa, é difícil prever quais as substâncias que poderiam estar ocasionando esse efeito, o que reforça a necessidade de se realizar ensaios biológicos juntamente com as análises químicas, para uma melhor compreensão do potencial risco do LE (OLESZCZUK, 2008).

Embora valores significativos de alterações citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas tenham sido observados nesse estudo, todos os parâmetros avaliados indicam uma diminuição dos efeitos do LE ao longo do período de atenuação natural, em especial, para as associações de solo/LE. A redução na frequência de aberrações cromossômicas (CHRISTOFOLETTI; FRANCISCO; FONTANETTI, 2012) e o aumento no índice de germinação de sementes (WALTER, MARTÍNEZ; CALA, 2006) após bioprocessamento por diplópodas e compostagem, respectivamente, indicam, segundo os autores, que processos de estabilização do LE podem diminuir a toxicidade desse resíduo (WONG; CHEUNG; CHEUNG, 1983). Contudo, embora o processo de atenuação natural tenha sido eficiente na redução dos danos para as associações de solo/LE, o uso do LE 100%, mesmo após 12 meses de biorremediação parece não ser indicado para fins agrícolas.

Os resultados obtidos para os ensaios realizados com o LE bruto e com o extrato aquoso, apresentaram-se bastante semelhantes, o que indica que os contaminantes presentes nas amostras de LE, e que são responsáveis por induzir efeitos em *A. cepa*, encontram-se biodisponíveis na amostra. Um ponto importante a ser considerado para a aplicação do LE, é que a presença de substâncias tóxicas no extrato aquoso indica que estas podem ser carreadas pela água, podendo assim atingir e contaminar as camadas mais profundas do solo, bem como, as águas subterrâneas e os recursos hídricos adjacentes. Embora a maioria dos trabalhos relatem a presença de metais pesados em lixiviados do LE (MCBRIDE et al., 1997; KELLER; MCGRATH; DUNHAM, 2002; BHOGAL et al., 2003), ressaltamos que as substâncias orgânicas, como por exemplo o cresol, podem também ser carreados pela água, devendo ser consideradas como poluentes importantes do LE.

4. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos com o organismo teste *A. cepa*, o LE estudado se mostrou potencialmente genotóxico e mutagênico para células, inclusive quando presente em associações baixas em relação à porcentagem de solo. Desta forma entendemos que a aplicação do LE em solos agrícolas não deve ser praticada antes da realização de processos de estabilização, pois poderia implicar em riscos para os organismos expostos, bem como ser um potencial poluidor tanto de ambientes terrestres como aquáticos. No entanto, a partir da diminuição dos efeitos do LE, observada para o sistema-teste de *A. cepa*, foi possível concluir que a atenuação natural monitorada parece ser um método bastante eficiente e de baixo custo para a eliminação de substâncias orgânicas tóxicas presentes no LE, como por exemplo, o *m*- e o *p*-cresol. O período de 12 meses de atenuação natural se mostrou suficiente para diminuir a toxicidade de associações de solo/LE, porém para a disponibilização do LE 100%, recomendamos que este passe por um período superior a 12 meses de biorremediação, para a total eliminação de seu efeito tóxico.

A espécie *A. cepa* mostrou-se um eficiente organismo teste para detecção de efeitos tóxicos induzidos por contaminantes de LE. Ensaios de aberrações cromossômicas e de MN com estes organismos constituíram ferramentas bastante sensíveis na detecção de danos ao DNA induzidos por esse resíduo.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Processo No. 2009/09665-0 pelo suporte financeiro, à empresa Foz de Rio Claro pelo fornecimento do LE de esgoto utilizado neste estudo e à Profa. Dra. Dejanira Francheschi de Angelis, do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, por disponibilizar o seu laboratório para realização de algumas etapas deste trabalho, necessárias para a caracterização e obtenção de solubilizados do LE.

6. REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 10006*: **Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004.

ANDRADE, J. C.; ABREU, M. F. **Análise química de resíduos sólidos para monitoramento e estudos agroambientais.** Campinas: Instituto Agronômico, 2006. 178p.

ARYA, D.; KUMAR, S; KUMAR, S. Biodegradation dynamics and cell maintenance for the treatment of resorcinol and p-cresol by filamentous fungus *Gliomastix indicus*. **Journal of Hazardous Materials.** v.198, p.49-56, 2011.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for cresols**. Atlanta, 283p., 2008.

AZAROVA, I.N.; PARFENOVA, V.V.; BARAM, G.I.; TERKINA, I.A.; PAVLOVA, O.N.; SUSLOVA, M.Y. Degradation of bis-(2-ethylhexyl)phthalate by microorganisms of the water and bottom sediments of the Selenga River and Lake Baikal under experimental conditions. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.39, p.585-589, 2003.

BHOGAL, A.; NICHOLSON, F.A.; CHAMBERS, B.J.; SHEPHERD, M.A. Effects of past sewage sludge additions on heavy metal availability in light textured soils: implications for crop yields and metal uptakes. **Environmental Pollution**, v.121, p. 413-423, 2003.

BHUPATHIRAJU, V. K., KRAUTER, P., HOLMAN, H.-Y. N., CONRAD, M. E., DALEY, P. F., TEMPLETON, A. S., HUNT, J. R., HERNANDEZ, M. AND ALVAREZ-COHEN, L.: Assessment of *in situ* bioremediation at a refinery waste-contaminated site and an aviation gasoline contaminated site. **Biodegradation**, v.13, p.79-90, 2002.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n° 375, de 29 de agosto de 2006. Brasília, 2006.

BRIGHT, D.A.; HEALEY, N. Contaminant risks from biosolids land application: Contemporary organic contaminant levels in digested sewage sludge from five treatment plants in Greater Vancouver, British Columbia. **Environmental Pollution** v.126(1), p. 39–49, 2003.

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

CARRARA, S.M.C.M.; MORITA, D.M.; BOSCOV, M.E.G. Biodegradation of di(2-ethylhexyl)phthalate in a typical tropical soil. **Journal of Hazardous Materials**, v.197, p.40-48, 2011.

CAVALLET, L.E.; SELBACH, P.A. Seção IX – Poluição do solo e qualidade ambiental. Populações microbianas em solo agrícola sob aplicação de lodos de curtume. **R. Bras. Ci. Solo**, v.32, p.2863-2869, 2008.

CHANG, B.V.; WANG, T.H.; YUAN, S.Y. Biodegradation of four phthalate esters in sludges. **Chemosphere**, v.69, p.1116-1123, 2007.

CHANG, Y.S. Recent developments in microbial biotransformation and biodegradation of dioxins. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v.15, p.152-171, 2008.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; FRANCISCO, A.; FONTANETTI, C. S. Biosolid soil application: toxicity tests under laboratory conditions. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2012, p. 01-09, 2012.

CLARKE, B.O; SMITH, S.R. Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. **Environmental International**, v.37, p.226-247, 2011.

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, DC: American Public Health Association, NW. 2001.

FORTNAGEL, P.; HARMS, H.; WITTICH, R.M.; KROHN, S.; MEYER, H.; SINNWELL, V.; WILKES, H.; FRANCKE, W. Metabolism of dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. strain HH69 and the mixed culture HH27. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.56, p.1148–1156, 1990.

GAYATHRI, K.V.; VASUDEVAN, N. Enrichment of phenol degrading moderately halophilic bacterial consortium from saline environment. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, v.1, p.1-6, 2010.

GRAY, N.F. Sludge treatment and disposal. In: GRAY, N.F. **Water Technology.** An Introduction for Environmental Scientists and Engineers (Third Edition). Elsevier, 2010. p. 645-685.

HABE, H.; IDE, K.; YOTSUMOTO, M.; TSUJI, H.; YOSHIDA, T.; NOJIRI, H.; OMORI, T. Degradation characteristics of a dibenzofuran-degrader *Terrabacter* sp. strain DBF63 toward chlorinated dioxins in soil. **Chemosphere**, v.48, p.201-207, 2002.

HARRISON, E.Z.; OAKES, S.R.; HYSELL, M.; HAY, A. Organic chemicals in sewage sludges. **Science of Total Environment**, v.367, p.481-497, 2006.

HO, K.L.; CHEN, Y.Y.; LEE, D.J. Functional consortia for cresol-degrading activated sludges: Toxicity-to-extinction approach. **Bioresource Technology**, v.101, p.9000–9005, 2010.

HOLMSTRUP, M, KROGH, PH, LOKKE, H, DE WOLF, W, MARSHALL, S, FOX, K. Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. 4. The influence of salt speciation, soil type, and sewage sludge on toxicity using the collembolan Folsomia fimetaria and the earthworm *Aporrectodea calginosa* as test organisms. **Environ Toxicol Chem**, v.20, p.1680–1689, 2001.

IPCS. International Programme on Chemical Safety. 1995. **No. 168: Cresols**, Geneva: EHC (Environmental Health Criteria), World Health Organization.

JIANG, W.; FAN, W. Bioremediation of Heavy Metal–Contaminated Soils by Sulfate-Reducing Bacteria. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.1140, p.446-454, 2008.

JUNESON, C.; WARD, O.P.; SINGH, A. Biodegradation of bis(2-ethylhexyl)phthalate in a soil slurry-sequencing batch reactor. **Process Biochemistry**, v.37, p.305-313, 2001.

KELLER, C.; MCGRATH, P.; DUHAM, S.J. Trace Metal Leaching through a Soil–Grassland System after Sewage Sludge Application. **J. Environ. Qual.**, v.31, p.1550-1560, 2002.

KLIMM, C.; SCHRAMM, K.W.; HENKELMANN, B.; MARTENS, D.; KETTRUP, A. Formation of octa- and heptachlorodibenzo-p-dioxins during semi anaerobic digestion of sewage sludge. **Chemosphere**, v.37, p.2003-2011, 1998.

KULKARNI, P.S.; CRESPO, J.G.; AFONSO, C.A.M. Dioxins sources and current remediation technologies: A review. **Environment International**, v.34, p.139-153, 2008.

LEBLANC, R. J.; MATTHEWS, P.; RICHARD, R. P. **Global atlas of excreta, wastewater sludge, and biosolids management: moving forward the sustainable and welcome uses of a global resource welcome uses of a global resource.** Nairobi, Kenya: United Nations Human Settlements Programme (UN-HABITAT), 2008. 608p.

LEME, D.M., MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutat. Res.**, v.650, p.80-86, 2008.

LI, F.B.; WANG, X.G.; LIU, C.S.; LI, Y.T.; ZENG, F.; LIU, L. Reductive transformation of pentachloro-phenol on the interface of subtropical soil colloids and water. **Geoderma**, v.148, p.70–78, 2008.

LOPES, J.C.; RIBEIRO, L.G.; ARAÚJO, M.G.; BERALDO, M.R.B.S. Produção de alface

com doses de lodo de esgoto. **Horticultura Brasileira**, v.23, p.143-147, 2005.

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v.47, p. 1255-1264, 2010.

MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M.A. Cellular damages in the Allium cepa test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v.85, p.13-18, 2011.

MCBRIDE, M.B.; RICHARDS, B.K.; STEENHUIS, T.; RUSSO, J.J.; SAUVÉ, S. Mobility and solubility of toxic metals and nutrients in soil fifteen years after sludge application. **Soil Science**, v. 162, p. 487-500, 1997.

MIRANDA, R.C.M.; GOMES, E.B.; PEREIRA JR, N.; MARIN-MORALES, M.A.; MACHADO, K.M.G.; GUSMÃO, N.B. Biotreatment of textile effluent in static bioreactor by *Curvularia lunata* URM 6179 and *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181. **Bioresource Technology**, v.142, p.361–367, 2013.

MOREIRA, R.; SOUSA, J.P.; CANHOTO, C. Biological testing of a digested sewage sludge and derived composts. **Bioresource Technology**, v.99, n.17, p.8382–8389, 2008.

NIAZI, J.H.; PRASAD D.T.; KAREGOUDAR, T.B. Initial degradation of dimethylphthalate by esterases from *Bacillus* species. **FEMS Microbiol Lett** 196:201–205, 2001.

OECD. Organisation for economic co-operator and development. 2003. SIDS Initial Assessment Report. **m-/p-Cresol**. UNEP PUBLICATIONS.

OLESZCZUK, P. Phytotoxicity of municipal sewage sludge composts related to physic-chemical properties, PHAs and heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, p.496-505, 2008.

PARK, J.H.; LAMB, D.; PANEERSELVAM, P.; CHOPPALA, G.; BOLAN, N.; CHUNG, J.W. Role of amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**, v.185, p.549-574, 2011.

PARSONS, J.R.; BRUIJNE, J.A.; WEILAND, A.R. Biodegradation pathway of 2-chlorodibenzo-*p*-dioxin and 2-chlorodibenzofuran in the biphenyl-utilising strain JB1. **Chemosphere**, v.37, p.1915-1922, 1998.

PLAZA, G.; NALĘCZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R.L. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. **Chemosphere**, v.59, p.289-296, 2005.

PRADHAN, N.; INGLE, A.O. Mineralization of phenol by *Serratia plymuthica* strain GC isolated from sludge sample. **International Biodeterioration and biodegradation**, v.60, p.103-108, 2007.

ROIG, N.; SIERRA, J.; NADAL, M.; MARTÍ, E.; NAVALÓN-MADRIGAL, P.; SCHUMACHER, M.; DOMINGO, J.L. Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v.425, p.99-109, 2012.

ROOS, P. H.; Tschirbs, S.; Pfeifer, F.; Welge, P.; Hackc, A.; Wilhelm, M.; Bolt, H. M. Risk potentials for humans of original and remediated PAH-contaminated soils: application of biomarkers of effect. **Toxicology**, v. 205, p. 181-194, 2004.

SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; MIGUEL, E.; TADEO, J.L. Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid. **Journal of Chromatography A**, v.1148, p.219-227, 2007.

SARAVANAN, P.; PAKSHIRAJAN, K.; SAHA, P. Biodegradation of phenol and *m*-cresol in batch and fedd batch operated internal loop airlift bioreactor by indigenous mixed microbial culture predominantly *Pseudomonas* sp. **Bioresource Technology**, v.99, p.8553-8558, 2008.

SENGUPTA, S.; PETERSON, T.R.; SABATINI, D.M. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. **Molecular Cell**, v.40, p.310-322, 2010.

SHARMA, A.; KACHROO, D.; KUMAR, R. Time dependent influx and efflux of phenol by immobilized microbial consortium. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.76, p.195-211, 2002.

SINGH, S.; CHANDRA, R.; PATEL, D.K.; RAI, V. Isolation and characterization of novel *Serratia marcescens* (AY927692) for pentachlorophenol degradation from pulp and paper mill waste. **World J. Microboiol. Biotechnol.**, v.23, p.1747-1754, 2007.

SOUZA, T.S., HENCKLEIN, F.A., ANGELIS, D.F., FONTANETTI, C.S. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environ. Monit. Assess**., 185, 1627-1636, 2013.

SRIVASTAVA, R.; KUMAR, D.; GUPTA, S.K. Bioremediation of municipal sludge by vermitechnology and toxicity assessment by *Allium cepa*. **Bioresource Technology**, v.96, p.1867-1871, 2005.

SUZUKI, Y.; NAKAMURA, M.; OTSUKA, Y.; SUZUKI, N.; OHYMA, K.; KAWAKAMI, T.; SATO, K.; KAJITA, S.; HISHIYAMA, S.; FUJII, T,; TAKAHASHI, A.; KATAYAMA, Y. Novel enzymatic activity of cell extract from thermophilic *Geobacillus* sp. UZO 3 catalyses reductive cleavage of diaryl ether bonds of 2,7-dichorodibenzo-*p*-dioxin. **Chemosphere**, v.83, p.868-872, 2011.

TALLUR, P.N.; MEGADI, V.B.; KAMANAVALLI, C.M.; NINNEKAR, H.Z. Biodegradation of p-Cresol by *Bacillus* sp. strain PHN 1. **Curr. Microbiol**., v.53, p.529-533,

2006.

TALLUR, P.N.; MEGADI, V.B.; NINNEKAR, H.Z. Biodegradation of p-cresol by immobilized cells of Bacillus sp. strain PHN 1. **Biodegradation**, v.20, p.79-83, 2009.

TAS, D.O. Respirometric assessment of aerobic sludge stabilization. **Bioresource Technology**, v.101, p.2592-2599, 2010.

TSAKOU, A., ROULIA, M., CHRISTODOULAKIS, N.S. Growth of cotton plants (*Gossypium hirsutum*) as affected by water and sludge from a sewage treatment plant: II. Seed and fiber yield and heavy metal accumulation. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v.66, p.743-747, 2001.

TUROVSKIY, I. S.; MATHAI, P.K. **Wastewater sludge processing.** New Jersey: John Wiley and Sons, 2006. 354 p.

WALTER, I.; MARTÍNEZ, F.; CALA, V. Heavy metal speciation and phytotoxic effects of three representative sewage sludges for agricultural uses. **Environmental Pollution**, v.139, p.507-514, 2006.

WILKES, H.; WITTICH, R.M.; TIMMIS, K.N.; FORTNAGEL, P.; FRANCKE, W. Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-p-dioxins by *Sphingomonas* sp. strain RW1. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62, 367-371, 1996.

WINN, W.C.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology.** 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.1565p.

WONG, M.H.; CHEUNG, Y.H.; CHEUNG, C.L. The effects of ammonia and ethylene oxide in animal manure and sewage sludge on the seed germination and root elongation of *Brassica parachinensis*. **Environ. Pollut**. 30, 109-123, 1983.

YUAN, S.Y.; HUANG, I.C.; CHANG, B.V. Biodegradation of dibutyl and di-(2-ethylhexyl) phtahalate and microbial community changes in mangrove sediment. **Journal of Hazardous Materials**, v.184, p.826-831, 2010.

Tabela 1. Análise granulométrica e condutividade elétrica do solo referência.

Amostra	**Areias** (g/kg)						**Silte** (g/kg)	**Argila** (g/kg)		**Floculação** (%)	**Classe de Textura**	**Condutividade elétrica** (dS/m)
Solo	MG	G	M	F	MF	AT	79	c/disp.	água	78	argilosa	146,7
	6	16	119	257	72	469		451	100			

MG: muito grossa; G: grossa; M: média; F: fina; MF: muito fina; AT: areia total; c/disp.: com dispersante.

Tabela 2. Resultado das análises físico-químicas do solo referência e do LE 100%, após diferentes períodos de atenuação natural monitorada.

Parâmetro	**Unidade**	**Solo referência**	**Amostra Inicial**	**Amostra 2 meses**	**Amostra 6 meses**	**Amostra 12 meses**	**Valor máximo permitido pela legislação CONAMA 375**
1,2,3-Triclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	10
1,3,5-Triclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	500
1,2,4-Triclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	11
1,2-Diclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	730
1,3-Diclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	390
1,4-Diclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	390
1,2,3,4-Tetraclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	160
1,2,4,5-Tetraclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	10
1,2,3,5-Tetraclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	6,5
Di-N-Butilftalato	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	700
Dimetilftalato	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	250
2,4-Diclorofenol	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	31
2,4,6-Triclorofenol	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	2400
Pentaclorofenol	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	160
Benzo(a)antraceno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	25
Benzo(a)pireno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	52
Benzo(k)fluoranteno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	380
Indeno(1,2,3-cd)pireno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	31
Naftaleno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	120
Fenantreno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	3300
Hexaclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
m,p-Cresol	µg/kg	ND	276.089,8	256.743,4	ND	ND	160
o-Cresol	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	160
Bis[2-Etilexil]ftalato	µg/kg	ND	ND	117.154,0	ND	ND	1000
Heptacloro	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
Aldrin	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
g-BHC	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
a-Clordano	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
g-Clordano	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
Dieldrin	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
DDT	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
Endrin	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
Toxafeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
Mirex	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE

Tabela 2 (continuação**)**

Fósforo Total	mg/kg	457,7	3.756,1	13.645,8	11.235,8	8997,8	NE
Potássio Total	mg/kg	255,1	678,8	1.787,2	1.519,5	1.140,0	NE
Sódio Total	mg/kg	390,1	296,7	1.532,7	1.179,1	384,8	NE
Enxofre Total	mg/kg	246,5	6.089,0	17.961,3	17.561,0	13.589,3	NE
Cálcio Total	mg/kg	924,1	4.302,7	15.937,5	16.284,6	11473,2	NE
Magnésio Total	mg/kg	372,3	989,8	3.671,1	3.094,9	2354,9	NE
Arsênio Total	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	41
Bário Total	mg/kg	46,0	100,8	356,1	388,9	370,8	1300
Cádmio Total	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	39
Chumbo Total	mg/kg	13,7	13,9	45,0	45,1	45,4	300
Cobre Total	mg/kg	75,5	66,7	202,1	234,6	223,0	1500
Cromio Total	mg/kg	32,2	36,7	66,8	35,7	39,8	1000
Mercúrio Total	mg/kg	ND	0,202	ND	ND	0,675	17
Molibdênio Total	mg/kg	4,89	2,27	11,4	7,34	5,54	50
Níquel Total	mg/kg	14,6	7,45	20,7	23,7	17,6	420
Zinco Total	mg/kg	53,9	233,0	818,7	922,5	785,0	2800
Nitrato (como N)	mg/kg	13,7	ND	ND	0,637	ND	NE
Nitrito (como N)	mg/kg	ND	5,13	ND	ND	ND	NE
Nitrogênio Amoniacal	mg/kg	ND	ND	ND	ND	646,9	NE
Nitrogênio Kjeldahl Total	mg/kg	ND	ND	ND	ND	830,5	NE
Total de Dioxinas	ng/kg	72,1685	269,237	622,8792	884,16	975,5	NE
Total de Furanos	ng/kg	5,5511	74,575	135,0086	101,66	139,96	NE
pH 1	–	6,59	9,20	5,85	5,55	4,50	NE
Teor de Sólidos à 105 °C	%	75,9	69,7	16,8	36,9	42,9	NE
Umidade	%	24,1	30,3	83,2	63,1	57,1	NE
Carbono Orgânico Total	%	2,83	69,6	41,3	34,1	29,6	NE

ND: não detectado; NE: parâmetro com valores não estabelecidos.

Tabela 3. Quantificação de m-, p-cresol no extrato aquoso de LE proveniente de diferentes períodos de atenuação natural monitorada.

Parâmetro	**Unidade**	**Amostra Inicial**	**Amostra 2 meses**	**Amostra 6 meses**	**Amostra 12 meses**
m-, p-Cresol	mg/L	3,70	4,21	0,78 (81,47%)[a]	0,06 (98,58%)[a]

[a] porcentagem de diminuição da concentração de m-, p-cresol.

Tabela 4. Resultado das análises de dioxinas e furanos do LE 100%, após diferentes períodos de atenuação natural monitorada, expresso em toxicidade equivalente (TEQ), com base nos fatores tóxicos equivalentes (W-TEF) de 2005, estabelecidos pela World Health Organization (WHO).

Dioxinas	**Solo referência**	**Amostra Inicial**	**Amostra 2 meses**	**Amostra 6 meses**	**Amostra 12 meses**	**TEF**
	W-TEQ (ng/kg)	W-TEQ (ng/kg)	W-TEQ (ng/kg)	W-TEQ (ng/kg)	W-TEQ (ng/kg)	W-TEF
2,3,7,8-TCDD	ND	ND	0,9423	ND	0,42	1
1,2,3,7,8-PeCDD	0,2140	1,654	1,873	ND	2,56	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	ND	ND	0,0619	ND	0,499	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,03774	0,2513	0,4148	5,296	1,76	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,03071	ND	0,1377	ND	0,093	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,1199	0,3187	0,7052	1,678	1,86	0,01
OCDD	0,01778	0,06996	0,16302	0,19902	0,2289	0,0003
Total de dioxinas TEQ	0,42013	2,29396	4,29792	7,17302	7,4209	
Furanos						
2,3,7,8-TCDF	0,02031	0,2105	0,2503	ND	0,411	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,00659	ND	0,06858	ND	0,0804	0,03
2,3,4,7,8-PeCDF	0,10311	0,8442	0,7677	ND	0,627	0,3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,02150	0,2610	0,3212	ND	0,293	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,01535	0,1461	0,2531	ND	ND	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,01476	0,1665	0,2353	ND	0,304	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,01753	ND	0,04516	ND	0,440	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01196	0,2147	0,3251	0,3874	0,0171	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	ND	ND	0,01193	ND	0,491	0,01
OCDF	0,00087	0,01273	0,02562	0,018876	0,02097	0,0003
Total de furanos TEQ	0,21198	1,85573	2,30399	0,406276	2,68447	
Total geral TEQ	**0,63211**	**4,14969**	**6,60191**	**7,579296**	**10,10537**	

ND: não detectável

Tabela 5. Média e desvio padrão do peso seco do solo, do lodo de esgoto (LE) e das diferentes associações de solo/LE, antes e após atenuação natural.

Peso Seco (%) / **Amostras**	**Amostra inicial**	**Amostra 2 meses**	**Amostra 6 meses**	**Amostra 12 meses**
SOLO	87,289 ± 0,226	–	–	–
LE 100%	19,336 ± 0,061	19,991 ± 0,143	33,107 ± 2,080	43,966 ± 0,411

Tabela 6. Caracterização dos micro-organismos isolados do LE, durante os diferentes períodos de atenuação natural monitorada.

Micro-organismos	Solo referência	Amostra inicial	Amostra 2 meses	Amostra 6 meses	Amostra 12 meses
Bactérias					
Achromobacter denitrificans [a]	–	–	–	–	$2x10^4$
Bacillus sp [b]	$4x10^5$	10^7	$4x10^5$	10^5	$5x10^5$
Complexo *Burkholderia cepacia* [a]	–	–	–	–	$3x10^5$
Buttiauxella agrestis [a]	–	–	–	–	$3x10^5$
Citrobacter freundii [a]	–	–	–	10^7	–
Enterobacter cloacae [a]	–	$8x10^6$	$4x10^5$	10^7	–
Enterococcus faecalis [b]	–	$5x10^6$	–	–	–
Escherichia coli [a]	–	$9x10^6$	–	–	–
Klebsiella pneumoniae [a]	–	10^7	–	–	–
Morganella morganii [a]	–	10^7	10^5	–	–
Ochrobactrum anthropi [a]	–	–	–	10^4	–
Proteus mirabilis [a]	–	$9x10^6$	$3x10^6$	–	–
Providencia rettgeri [a]	–	–	$3x10^5$	–	–
Pseudomonas aeruginosa [a]	–	$8x10^6$	–	$2,2 \times 10^6$	–
Pseudomonas putida/fluorescens [a]	–	–	–	–	10^4
Serratia marcescens [a]	–	10^7	–	10^7	10^4
Staphylococcus [b] (coagulase negativo)	–	10^6	–	–	–
Bacilo Gram Negativo [a] (não fermentador)	–	–	$1x10^6$	–	–
Fungos					
Penicillium sp	$5x10^4$	–	–	–	10^6

[a] Gram-negativas; [b] Gram-positivas.

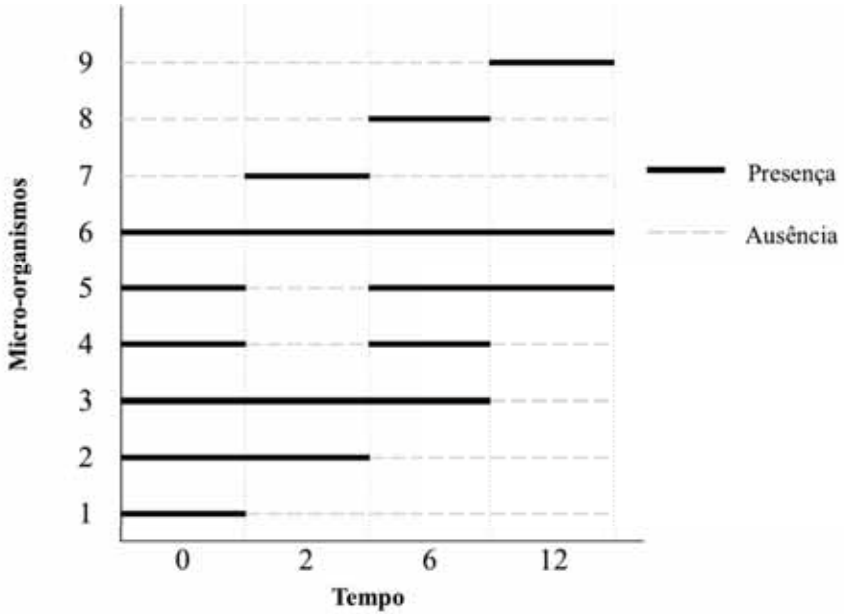


Figura 1. Sucessão microbiológica observada no processo de atenuação natural monitorada do LE. 1. *Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus* (coagulase negativo)*;* **2.** *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis;* **3.** *Enterobacter cloacae;* **4.** *Pseudomonas aeruginosa*; **5.** *Serratia marcescens;* **6.** *Bacillus* sp; **7.** Bacilo Gram Negativo (não fermentador), *Providencia rettgeri*; **8.** *Citrobacter freundii*, *Ochrobactrum anthropic;* **9.** *Achromobacter denitrificans*, Complexo *Burkholderia cepacia*, *Buttiauxella agrestis*, *Pseudomonas putida/fluorescens*.

Tabela 7. Presença de alterações em células de *A. cepa* expostas a concentrações de LE bruto após diferentes períodos de atenuação natural.

Parâmetros Avaliados	ANM (meses)	Amostras						
		Solo	CN	CP	LE 10%	LE 25%	LE 50%	LE 100%
Índice Mitótico	0	42,17 ± 7,23	34,88 ± 13,40	36,03 ± 9,02	41,78 ± 8,61	43,04 ± 6,62	44,21 ± 12,93	40,78 ± 8,24
	2		34,11 ± 5,09	38,08 ± 5,05	37,50 ± 10,01	37,95 ± 5,30	35,24 ± 5,68	-
	6		46,17 ± 8,25	44,73 ± 5,09	39,93 ± 7,56	39,71 ± 7,58	42,39 ± 5,66	34,22 ± 6,51*
	12		45,87 ± 6,76	49,03 ± 9,88	42,84 ± 7,71	40,40 ± 10,36	48,08 ± 7,46	44,58 ± 12,92
Alterações Genotóxicas	0	5,36 ± 1,88	2,20 ± 1,29	8,78 ± 1,47*	6,58 ± 1,73*	10,13 ± 2,62*	14,44 ± 3,70*	16,82 ± 3,08*
	2		3,73 ± 1,51	10,35 ± 1,65*	9,37 ± 3,60*	12,88 ± 5,27*	11,69 ± 3,70*	-
	6		4,89 ± 2,28	14,30 ± 5,14*	5,99 ± 3,15	7,39 ± 2,10*	7,00 ± 1,85*	10,60 ± 4,13*
	12		2,07 ± 1,42	10,72 ± 2,84*	1,81 ± 0,84	2,30 ± 1,14	1,42 ± 1,65	3,38 ± 1,75
Alterações Mutagênicas	0	0,59 ± 0,69	0,48 ± 0,68	16,71 ± 6,22*	0,88 ± 0,56	1,28 ± 1,32	0,98 ± 0,80	1,28 ± 1,32
	2		0,00 ± 0,00	10,62 ± 6,12*	0,49 ± 0,51	2,27 ± 2,71*	1,65 ± 1,71*	-
	6		0,79 ± 0,62	6,67 ± 3,32*	0,69 ± 0,67	1,52 ± 1,19	1,00 ± 1,25	2,22 ± 1,55*
	12		0,20 ± 0,41	12,34 ± 4,45*	0,57 ± 0,49	0,28 ± 0,46	0,57 ± 0,49	0,38 ± 0,49
MN F1	0	0,58 ± 0,68	0,38 ± 0,49	8,63 ± 6,80*	0,09 ± 0,29	0,29 ± 0,66	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,39
	2		0,78 ± 0,62	8,83 ± 5,44*	0,29 ± 0,65	0,30 ± 0,67	1,36 ± 0,51	-
	6		0,59 ± 0,68	8,09 ± 5,14*	0,39 ± 0,69	0,78 ± 0,77	1,27 ± 1,30	3,81 ± 4,73*
	12		0,39 ± 0,51	10,57 ± 4,28*	0,97 ± 1,22	0,20 ± 0,42	0,86 ± 2,09	0,58 ± 0,68

CN: controle negativo; CP: controle positivo; ANM: atenuação natural monitorada.

* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p<0,05$), pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

Tabela 8. Presença de alterações em células de *A. cepa* expostas a concentrações de extratos aquosos de LE (solubilizados) após diferentes períodos de atenuação natural.

Parâmetros Avaliados	ANM (meses)	Amostras						
		Solo	CN	CP	LE 10%	LE 25%	LE 50%	LE 100%
Índice Mitótico	0	30,58 ± 5,43	34,88 ± 13,40	36,03 ± 9,02	36,84 ± 13,04	35,44 ± 8,00	35,95 ± 7,11	-
	2		34,11 ± 5,09	38,08 ± 5,05	35,71 ± 7,59	36,61 ± 7,11	35,71 ± 13,12	-
	6		46,17 ± 8,25	44,73 ± 5,09	46,63 ± 9,85	47,78 ± 7,94	46,61 ± 8,17	48,31 ± 7,67
	12		45,87 ± 6,76	49,03 ± 9,88	48,86 ± 2,99	50,84 ± 7,38	51,05 ± 6,49	47,14 ± 5,48
Alterações Genotóxicas	0	3,02 ± 1,06	2,20 ± 1,29	8,78 ± 1,47*	4,34 ± 1,62*	8,00 ± 1,98*	7,41 ± 3,00*	-
	2		3,73 ± 1,51	10,35 ± 1,65*	5,69 ± 1,85*	9,59 ± 3,79*	10,49 ± 2,69*	-
	6		4,89 ± 2,28	14,30 ± 5,14*	4,95 ± 2,15	9,09 ± 2,58*	7,50 ± 2,54*	10,19 ± 3,32*
	12		2,07 ± 1,42	10,72 ± 2,84*	2,07 ± 0,85	1,34 ± 1,02	1,83 ± 1,33	4,38 ± 1,53*
Alterações Mutagênicas	0	0,55 ± 0,89	0,48 ± 0,68	16,71 ± 6,22*	0,76 ± 0,74	1,27 ± 1,61	1,45 ± 1,23	-
	2		0,00 ± 0,00	10,62 ± 6,12*	0,38 ± 0,67	2,67 ± 2,57*	1,42 ± 0,99*	-
	6		0,79 ± 0,62	6,67 ± 3,32*	0,69 ± 0,66	1,06 ± 1,13	0,49 ± 0,51	2,99 ± 2,73*
	12		0,20 ± 0,41	12,34 ± 4,45*	0,55 ± 0,64	0,28 ± 0,63	0,37 ± 0,63	1,13 ± 1,14*
MN F1	0	0,47 ± 0,80	0,38 ± 0,49	8,63 ± 6,80*	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,30	3,09 ± 1,28*	-
	2		0,78 ± 0,62	8,83 ± 5,44*	1,56 ± 0,84	3,65 ± 3,68*	2,25 ± 1,21*	-
	6		0,59 ± 0,68	8,09 ± 5,14*	1,56 ± 1,24	1,67 ± 1,49	1,48 ± 1,07	3,53 ± 4,53*
	12		0,39 ± 0,51	10,57 ± 4,28*	1,17 ± 0,77	0,78 ± 0,78	0,58 ± 0,66	0,88 ± 0,72

CN: controle negativo; CP: controle positivo; ANM: atenuação natural monitorada; LE: lodo de esgoto.
* Estatisticamente diferente do controle negativo ($p<0,05$), pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

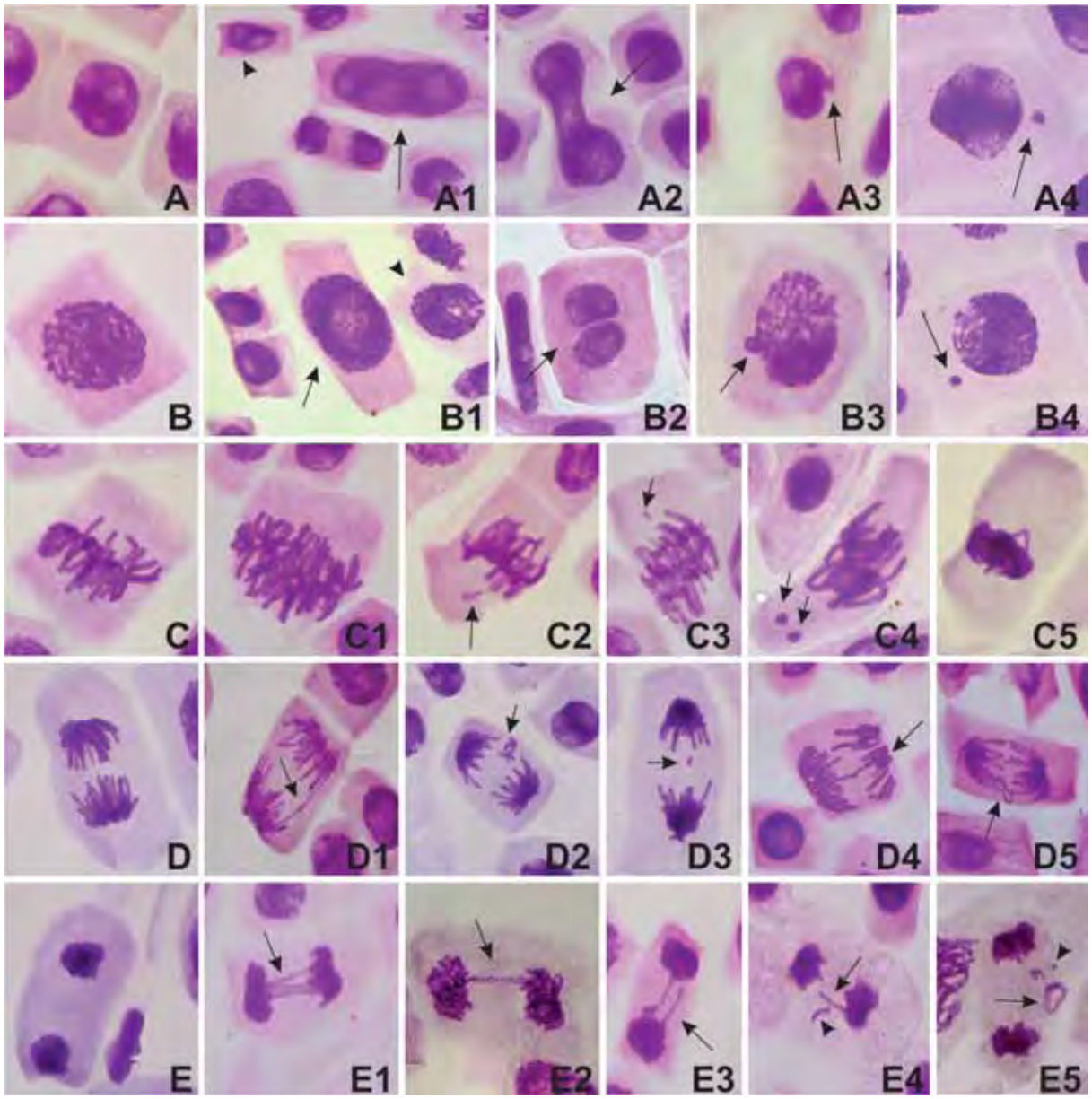


Figura 2. Células meristemáticas de *Allium cepa*. A. Intérfase normal; **A1.** Intérfase poliploide (seta). A cabeça de seta indica uma célula de tamanho normal; **A2.** Ponte nuclear entre dois núcleos interfásicos (seta); **A3.** Broto nuclear (seta); **A4.** Micronúcleo (seta); **B.** Prófase normal; **B1.** Prófase poliploide (seta). A cabeça de seta indica uma célula de tamanho normal; **B2.** Célula binucleada (seta); **B3.** Prófase com broto nuclear (seta); **B4.** Prófase com micronúcleo (seta); **C.** Metáfase normal; **C1.** Metáfase poliploide (seta); **C2.** e **C3.** Metáfase com quebra cromossômica (seta); **C4.** Metáfase com micronúcleos (setas); **C5.** Metáfase com aderência; **D.** Anáfase normal; **D1.** Anáfase com ponte cromossômica (seta); **D2.** Anáfase com perdas cromossômicas (seta)**; D3.** Anáfase com quebra cromossômica (seta); **D4.** Anáfase com multipolaridade (seta)**; D5.** Anáfase com perdas cromossômicas (seta)**; E.** Telófase normal; **E1.** Telófase com pontes cromossômicas (seta); **E2.** Telófase com ponte cromossômica (seta); **E3.** Telófase com atrasos cromossômicos (seta); **E4.** Telófase com atraso (seta) e quebra cromossômica (cabeça de seta); **E5.** Telófase com perda (seta) e quebras cromossômicas (cabeça de seta).

Artigo 3. Comprovação da eficiência do processo de atenuação natural monitorada de lodo de esgoto, por meio de bioensaios de mutagenicidade

RESUMO

Uma das alternativas viáveis para a utilização de resíduos sólidos gerados pelo processo de tratamento de esgoto, seria como recondicionante de solos agrícolas, uma vez que este resíduo apresenta alto teor de matéria orgânica e quantidades consideráveis de nutrientes. No entanto, essa possível solução também pode constituir uma via potencial de contaminantes dos solos, já que o lodo de esgoto (LE) pode conter substâncias tóxicas. A atenuação natural monitorada é um processo que pode ser empregado na descontaminação do LE, antes de sua disposição no ambiente, para se evitar os potenciais riscos que este resíduo pode promover ao ambiente e à saúde humana. Neste trabalho, foi avaliada a efetividade do processo de atenuação natural de um LE de origem doméstica, após diferentes períodos de atenuação natural, por meio dos ensaios de mutagenicidade de *Salmonella*/microssoma e do micronúcleo (MN) em células de hepatoma humano (HepG2). Uma atividade mutagênica significativa foi observada somente para a linhagem TA 100 de *Salmonella*, na presença de fração metabólica, para os extratos dos períodos de 0 e 6 meses. Foi observado um efeito mutagênico significativo em HepG2 para as amostras do tempo 0 e de 2 meses, em todas as concentrações testadas (exceção da concentração 10%, na amostra de 2 meses). Ao comparar os dados obtidos pelo teste do MN em células HepG2 com as análises químicas, é possível sugerir que as substâncias *m*- e *p*-cresol possam ser as responsáveis pelo aumento na frequência de MN observada, já que estes compostos estavam presentes no LE inicial e após 2 meses de biodegradação, mas em concentrações muito baixas nas amostras do LE de 6 e 12 meses. No entanto, o efeito observado pode ser decorrente também da ação conjunta das substâncias presentes no LE. Esses resultados indicam que o LE estudado, nos primeiros períodos testados, é potencialmente mutagênico e que sua disposição pode levar a problemas ambientais severos. Assim, alertamos para a necessidade de um pré-processamento de cerca de, no mínimo 12 meses, para que o LE possa ser utilizado como recondicionante de solos na agricultura.

Palavras-chave: mutagenicidade, teste *in vitro*, células HepG2, *Salmonella/*microssoma, biorremediação

1. Introdução

Com o crescente desenvolvimento urbano e o aumento no número de habitantes, a população mundial vem enfrentando um sério problema ambiental em relação à destinação do resíduo sólido gerado pelas estações de tratamento de esgoto (RATHOD et al., 2008; PATHAK; DASTIDAR; SREEKRISHNAN, 2009). A cada ano, são produzidos, mundialmente, milhões de toneladas de lodo de esgoto (LE) (APARICIO; SANTOS; ALONSO, 2009), produção esta que só apresenta perspectivas de crescimento.

Por conter altas concentrações de matéria orgânica e macronutrientes, como nitrogênio e fósforo, o LE tem sido considerado como um excelente material para ser utilizado como recondicionante de solos agrícolas (ÇIFCI; KINACI; ARIKAN, 2013). No entanto, o LE pode apresentar uma grande variedade de compostos tóxicos persistentes e bioacumulativos que, quando dispostos no ambiente, podem comprometer a qualidade do solo e de outros ambientes associados, como a atmosfera e as águas subterrâneas e superficiais (CINCINELLI et al., 2012). A exposição de plantas e animais a esses poluentes pode comprometer a cadeia trófica (ROIG et al., 2012), bem como conferir riscos à saúde humana.

Devido às consequências ambientais que a aplicação agrícola do LE pode gerar, vêm sendo propostas inúmeras metodologias na tentativa de garantir a estabilidade química e biológica deste resíduo (RATHOD et al., 2009). Dentre esses processos, a atenuação natural pode diminuir a concentração de determinados poluentes no ambiente, por meio de processos naturais como volatilização, transformação, diluição, dispersão (YONG; MULLIGAN, 2003; MEGHARAJ et al., 2011) e, principalmente pela biodegradação por micro-organismos naturalmente presentes no próprio local da contaminação. Desta forma, este processo vem sendo considerado bastante vantajoso, além de também apresentar um baixo custo de implantação (MILLS et al., 2003).

Para melhor caracterizar as substâncias tóxicas presentes no LE, é totalmente recomendável que seja feita uma associação entre as análises químicas e os ensaios biológicos (FARRÉ; BARCELÓ, 2003). Entre os diversos bioensaios existentes, o internacionalmente reconhecido teste de *Salmonella*/microssoma vem sendo utilizado, a muito tempo, na detecção da mutagenicidade de uma ampla variedade de químicos, incluindo de amostras ambientais complexas, por ser um teste simples, rápido, eficiente e de alta reprodutibilidade (McCANN et al., 1975; CLAXTON; UMBUZEIRO; DEMARINI, 2010).

O teste do MN tem sido muito utilizado para a avaliação de efeitos mutagênicos induzidos por LE (TEWARI et al., 2005; MIELLI et al., 2009; SOLANO et al., 2009; GAJSKI; OREŠČANIN; GARAJ-VRHOVAC, 2011), por ser um teste altamente sensível e eficiente na detecção dos efeitos biológicos de poluentes ambientais. Além disso, a indução de MN é considerado como um indicativo de risco de câncer em humanos (BONASSI et al., 2007).

Como o fígado desempenha a função principal na detoxificação de xenobióticos, células de hepatoma humano (HepG2) vem sendo rotineiramente utilizadas em estudos de genotoxicidade ambiental (BADERNA et al., 2013), principalmente por assemelharem-se às características das células humanas *in vivo* (van der WATER et al., 2011).

Este estudo investigou o efeito mutagênico de um LE de origem doméstica, por meio do teste do MN em cultura de células de hepatoma humano (HepG2) e do ensaio de *Salmonella*/microssoma, após diferentes períodos de atenuação natural. A efetividade desse processo de biorremediação foi avaliada pelo decaimento da atividade tóxica do LE, antes e após período de atenuação natural sobre os sistemas-testes estudados.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção das amostras

O LE estudado foi coletado em uma Estação de Tratamento de Esgoto doméstico localizada na cidade de Rio Claro (São Paulo – Brasil). Após coleta, uma parte deste LE foi misturada com um solo argiloso (146,7 dS/m) proveniente de um Jardim Experimental, nas proporções de 10%, 25% e 50% (v/v).

Posteriormente, todas as amostras (10%, 25%, 50% e 100% de LE) foram dispostas, em duplicata, em sacos plásticos com furos de 0,5 mm de diâmetro com espaçamento de 1 cm e enterradas em um local livre de contaminação por períodos de 0, 2, 6 e 12 meses, a fim de promover uma atenuação natural das amostras, como descrito por MAZZEO (2013).

A caracterização química do LE 100% e do solo utilizado, após cada período de biorremediação está apresentada na tabela 1.

2.2. Preparo do extrato aquoso de LE (solubilizado)

Para a obtenção de um extrato aquoso do LE, foi misturado 125g de cada amostra (peso seco) em 500 mL de água ultra pura, seguido de agitação constante, em baixa velocidade, por 5

minutos, de acordo com a norma NBR 10.006 da ABNT (2004). Para as amostras de LE 100%, foi adicionado o dobro de água (1000 mL). Após decantação por 7 dias, o sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana com 0,45 μm de porosidade. Com este processo, foram obtidos extratos que continham substâncias hidrossolúveis presentes em cada uma das amostras estudadas.

Dados preliminares mostraram que os extratos aquosos referentes às amostras de LE 100%, nos diferentes períodos de atenuação natural, continham *m*- e *p*-cresol nas concentrações de 3,70 mg/L, 4,21 mg/L, 0,78 mg/L e 0,06 mg/L, respectivamente.

2.3. Ensaio de microssuspensão com *Salmonella* – Teste de Kado

As linhagens de *S. typhimurium* empregadas neste estudo foram a TA98 e a T100, com presença e ausência de fração metabolizadora, as quais detectam mutações no quadro de leitura e mutações por substituição nos pares de base, respectivamente.

Este teste foi baseado no protocolo descrito por Kado, Langley e Eisenstadt (1983). As linhagens TA98 e TA100 foram colocadas para crescer em caldo nutriente, overnight, em incubadora shaker a 37ºC. Em seguida, 100 μL de cada linhagem (10^{10} células/mL) foram adicionados em tubos de cultura contendo 100 μL de tampão fosfato 0,1M e o volume da amostra correspondente as concentrações de 6,25; 12,5; 18,75; 25; 50; 100 mg de equivalente de LE seco. Nos ensaios com presença de ativação metabólica S9, o tampão fosfato foi substituído por 100 μL de mistura S9 [água destilada estéril, tampão fosfato 0,2 M, NADP 0,1 M, glicose-6-fosfato 1,0 M, solução de sais (KCl 1,65 M e $MgCl_2$ 0,4M) e fração S9]. Os tubos contendo as misturas foram pré-incubados a 37ºC por 90 minutos. Em seguida, o seu conteúdo, já acrescido de 2 mL de ágar de superfície, foi vertido em placas de Petri estéreis contendo ágar mínino solidificado. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37ºC por 72 horas. Cada teste foi realizado em triplicata.

Para o desenvolvimento do teste com ativação metabólica, foi utilizado um sistema de metabolização exógeno (sistema microssomal S9, Moltox), constituído de um homogenato de células do fígado de rato Sprague-Dawley, pré-tratado com a mistura bifenil policlorinada (Araclor 1254).

Cada um dos extratos referentes à amostra de LE 100% foi testado, para os quatro diferentes períodos de atenuação natural, nas 6 concentrações propostas (6,25; 12,5; 18,75; 25; 50; 100 mg de equivalente de LE seco).

O controle negativo (CN) foi realizado com 50 μL/placa da água ultra-pura utilizada na obtenção dos extratos. Para os controles positivos (CP), foram utilizados o óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) (Sigma, CAS No. 56-57-5), na concentração de 0,5 μg/placa, para os testes realizados na ausência de ativação metabólica e o 2-aminoantraceno (2AA) (Sigma, CAS No. 613-13-8), na concentração de 0,25 μg/placa, para os testes realizados na presença de ativação metabólica.

O potencial mutagênico de cada amostra foi avaliado quantificando o número de revertentes em cada placa. Os dados foram avaliados estatisticamente pelo programa SALANAL (Samonella Assay Analysis 1.0), selecionando os modelos de Bernstein ou Linear. As amostras foram consideradas mutagênicas quando ambos os resultados, do teste estatístico ANOVA ($p<0,05$) e da regressão linear ($p<0,05$), foram significativos. Os resultados da atividade mutagênica foram expressos pelo número de revertentes por grama equivalente da amostra seca testada.

2.4. Ensaios com células humanas

2.4.1. Linhagem celular

Células HepG2 (*Human-derived hepatoma cell*) foram utilizadas como sistema-teste para do ensaio do MN. Estas células, adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil, foram cultivadas em meio MEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e 0,1% de solução de antibiótico-antimocótico (10.000 U.I./mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina), sendo mantidas em frascos descartáveis de 25 cm^2 em estufa BOD a 37 °C com 5 % de CO_2.

2.4.2. Teste de viabilidade celular

Para a determinação das concentrações não citotóxicas para as células HepG2, foi realizado, primeiramente, o teste do MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide - CAS n. 298-93-1, Sigma), de acordo com o protocolo proposto por Mosmann (1983), com algumas modificações. Uma quantia de 2,34 x 10^4 células foram plaqueadas em cada um dos 96 poços de uma microplaca para estabilização, e mantidas, por 24 horas em câmara úmida a 37 °C com 5%

de CO_2. Posteriormente, as células foram tratadas, por mais 24 horas, com as diferentes concentrações do LE 100% (tempo 0) e depois incubadas, por 4 horas, com MTT (1 mg/mL). O CN foi realizado com o meio de cultura e o CP com Triton X-100 a 1%.

Em seguida, o MTT foi descartado e foram adicionados 100 µL de DMSO estéril por poço. A leitura das placas foi feita em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Aparelho Multiskan FC – Thermo Scientific) a 540 nm. As concentrações testadas foram consideradas citotóxicas quando apresentaram um valor inferior a 80% ao observado para o CN.

2.4.3. Teste do MN

Para a realização do teste do MN, seguiu-se o protocolo descrito por Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações. As células foram cultivadas por um ciclo celular completo (24 horas). Em seguida, foram realizados em frascos individuais e em triplicata, tratamentos simultâneos de 24 horas, com a adição de 50 µL de cada um dos extratos aquosos (10%, 25%, 50% e 100% de LE). O CP foi realizado adicionando 50 µL de metilmetano sulfonato ($4x10^{-2}$M), CN adicionando PBS e o controle ambiental adicionando extrato do solo. Após os tratamentos, as células foram lavadas, por duas vezes, com PBS e adicionados 5 mL de meio de cultura completo com 3 µg/mL de citocalasina B, onde permaneceram por 28 horas. Decorrido este tempo, as células foram colhidas e fixadas em Carnoy (metanol/ácido acético 3:1 – v:v). Posteriormente, foram depositadas algumas gotas da cultura de células sobre lâminas limpas, geladas e contendo um filme de água. Após secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 8 minutos. Esse ensaio foi realizado para os extratos referentes a cada um dos períodos de atenuação natural (0, 2, 6 e 12 meses).

Foram analisadas, sob microscopia de luz (aumento de 1000 vezes), cerca de 1000 células binucleadas com membrana citoplasmática e envoltório nuclear íntegros, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração por lâmina, sendo duas lâminas para cada repetição. Como todo experimento foi realizado em triplicata, obteve-se um total de cerca de 6000 células contabilizadas para cada concentração e controles avaliados. Para a avaliação do potencial mutagênico do LE, os resultados dos ensaios de MN foram comparados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney ($p<0,05$).

Foi comparado, pelo teste estatístico de Mann-Whitney ($p<0,05$), os efeitos induzidos por uma mesma associação de solo/lodo, após seus diferentes tempos de atenuação natural, em relação ao seu tempo 0, a vim de se verificar a eficiência desse processo.

3. Resultados

3.1. Atividade mutagênica - Ensaio de microssuspensão com *Salmonella*

A tabela 2 traz os resultados obtidos nos ensaios com *Salmonella*/microssoma para o solubilizado de LE 100% nos diferentes períodos de biorremediação, para as linhagens TA 98 e TA 100. Nenhuma amostra testada induziu mutagenicidade para a linhagem TA 98, tanto na presença como ausência de atividade metabólica. Para a linhagem TA 100, não foram observados resultados significativos para o ensaio na ausência da fração metabólica. No entanto, após metabolização, as amostras referentes ao período de 0 e 6 meses apresentaram um potencial mutagênico para esta linhagem (TA 100). Embora os resultados não foram significativos para a amostra correspondente ao período de 2 meses, no teste estatístico ANOVA, foi observado um efeito dose-resposta significativo que indica uma atividade mutagênica para esta amostra (Figura 1). Para o período de 12 meses, não foi mais observado esse efeito, indicando uma diminuição no potencial mutagênico do LE, após 12 meses de atenuação natural.

3.2. Mutagenicidade em cultura de células humana – HepG2

Os resultados obtidos para a viabilidade celular, avaliada pelo método do MTT, estão apresentados na Tabela 3. O teste foi realizado com 5 diferentes concentrações do extrato de LE 100%, antes da realização da atenuação natural (tempo 0). A única concentração que apresentou uma porcentagem de células vivas superior a 80% foi a de 10 μL/mL de meio de cultura. Dessa forma, essa concentração foi escolhida para o desenvolvimento do teste do MN.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos em relação à frequência de MN presente em células binucleadas de HepG2 (Figura 2), após exposição aos diferentes solubilizados de LE. Pelos resultados obtidos, foi possível observar que, para as amostras do tempo 0 e de 2 meses, todas as concentrações testadas induziram um efeito mutagênico significativo nas células HepG2, quando comparadas com o CN (com exceção da concentração de 10% para a amostra de 2 meses). No entanto, nenhum efeito mutagênico significativo foi observado para as amostras após 6 e 12 meses de biorremediação.

Ao se comparar as frequências de MN presentes nas células HepG2, após os diferentes períodos de atenuação natural, para uma mesma concentração de LE, foi observada uma redução significativa nesse parâmetro, para todas as concentrações testadas (Figura 3). A concentração de 10% mostrou, após 2 meses de biorremediação, valores próximos aos apresentados pelo CN, enquanto que para as demais concentrações essa diminuição passou a ser significativa após 6 meses, sendo mais pronunciada após o período de 12 meses de atenuação.

4. Discussão

Devido à preferência de diversos países em reaproveitar o LE como fertilizante agrícola, tornou-se necessária a realização de um constante monitoramento sobre a implicação que esse tipo de prática promove sobre o ambiente e, consequentemente, à saúde humana. Uma das estratégias para esta avaliação seria o uso de diferentes bioensaios capazes de identificar a biodisponibilidade do conjunto de contaminantes presentes no LE e assim, inferir sobre o real risco da exposição de organismos a este resíduo (ALVARENGA et al., 2007).

A avaliação de danos no DNA fornece respostas importantes quanto aos efeitos de substâncias tóxicas, uma vez que as mutações são eventos cruciais a serem considerados nos processos carcinogênicos (FENECH, 2008).

A avaliação da mutagenicidade de LE por meio do ensaio com *Salmonella* vem sendo realizada por diversos autores, há algum tempo (DONNELLY et al., 1990; OTTAVIANI et al., 1993; PÉREZ et al., 2003; KLEE et al., 2004). No presente estudo, o teste de *Salmonella*/microssoma foi realizado com as linhagens TA 98 e TA 100, que, segundo Silva Júnior e Vargas (2009), são as mais empregadas em estudos de mutagênese ambiental.

Ottaviani et al. (1993) também empregaram as linhagens TA 98 e TA 100 para avaliarem o potencial mutagênico de LE proveniente do município de Roma/Itália. No entanto, mesmo com a presença de PCBs, os autores observaram uma ausência de mutagenicidade para o LE e encontraram um efeito citotóxico para doses acima de 5 mg/placa. A detecção de mutagenicidade pelo ensaio de *Salmonella*, com as linhagens TA 98 e TA 100, também foi relatada por Klee et al. (2004) em amostras de LE de origem predominantemente industrial. A linhagem TA 98 também foi utilizada por Donnelly et al. (1990) para avaliar a mutagenicidade de compostos orgânicos presentes em solos que receberam incorporação de LE. Pelas respostas mutagênicas positivas obtidas, os autores sugeriram que a incorporação de LE em solos contribuiu para um aumento de

mutágenos no ambiente. A partir dos resultados verificados em nossos estudos, também sugerimos que o LE pode ser fonte de contaminantes potencialmente mutagênicos e que, quando disposto no ambiente, pode trazer riscos aos organismos expostos.

A ausência de resultados significativos para a linhagem TA 98 indicou que o LE testado não foi capaz de induzir mutações do tipo *frameshift*, mesmo na presença de fração metabolizadora. No entanto, a mutagenicidade observada para a TA 100, a qual detecta mutações por substituição de pares de base (MARON; AMES, 1983), na presença de S9, sugere que o LE contém pró-mutagenos capazes de induzir esse tipo de mutação, somente após serem metabolizados. Resultados semelhantes foram também observados por Pérez et al. (2003), quando os autores avaliaram um LE de origem doméstica e mista (doméstica e industrial), cujas atividades mutagênicas só foram observadas para as linhagens TA 98 e 100, na presença da fração metabolizadora.

Ensaios com cultura de células de mamíferos têm sido amplamente empregados em estudos de investigação do potencial mutagênico de poluentes ambientais (MATSUMOTO et al., 2005; CARDOZO et al., 2006; MAZZEO et al., 2010; 2013). Em nossos estudos, as células HepG2 mostraram-se bastante sensíveis na detecção de mutagenicidade do LE.

Bakare et al. (2007) avaliaram, por meio de cultura de células humanas, a potencialidade de indução de danos ao DNA por lixiviado de LE de origem municipal. Os autores verificaram um aumento significativo de danos em cultura de linfócitos, após exposição ao LE, indicando um risco potencial para o homem. Estudos realizados por Gajski, Oreščanin e Garaj-Vrhovac (2011) também mostraram um aumento significativo na frequência de micronúcleo de ensaios *in vitro* realizados com linfócitos humanos expostos a lixiviado de LE. Os autores concluíram que a amostra de LE testada foi mutagênica para linfócitos, podendo, então, causar efeitos adversos às populações humanas expostas. Um aumento significativo na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos de ratos, após 15 dias de exposição, por gavagem, a baixas concentrações de lixiviado de LE, foi também relatado por Tewari et al. (2005). Os autores inferiram que estes efeitos possivelmente foram decorrentes da ação combinada dos contaminantes presentes no LE. Dessa forma, a presença de substâncias tóxicas em extratos aquosos de LE pode, por percolação no solo, comprometer as águas subterrâneas e superficiais pela disseminação de substâncias mutagênicas e, assim, trazer sérios riscos à saúde pública.

Os efeitos mutagênicos observados pelo teste do MN em células HepG2 podem ser decorrentes da presença de *m*- e *p*-cresol no extrato aquoso de LE, já que as frequências significativas de MN foram observadas para os extratos referentes aos períodos de 0 e 2 meses de biorremediação, nos quais estas substâncias foram também detectadas. Foi observada uma redução da frequência de MN, para níveis próximos ao CN, nas amostras de 6 e 12 meses coincidente com a diminuição na concentração de *m*- e *p*-cresol.

Hikiba et al. (2005) observaram indução de aberrações cromossômicas (lesões acromáticas e quebras) em células de embrião de hamster sírio (teste *in vitro*) submetidas a 400, 800 e 1000 μM de *m*-cresol. Esse parâmetro teve sua frequência aumentada para as concentrações de 100, 300 e 1000 μM, para essas mesmas células, quando na presença da fração de ativação metabólica. Os autores sugeriram que, após conversão metabólica, o *m*-cresol torna-se um químico potencialmente genotóxico. De acordo com Hamaguchi e Tsutsui (2000), o *m*-cresol induziu alterações no DNA de células de embrião de hamster sírio mantidos em cultura na presença de ativação metabólica exógena, o que levou os autores a concluírem que essa substância é genotóxica para células de mamífero. Outros autores também concluíram que a toxicidade do LE parece estar mais relacionada com a presença de compostos fenólicos (p.e. cresol) do que com metais e poluentes orgânicos persistentes (POPs) (ROIG et al., 2012).

Como a célula HepG2 utilizada neste estudo possui sistema enzimático de metabolização de fase I e II, atuando na ativação e detoxificação de químicos reativos ao DNA (KNASMÜLLER et al., 1998; 2004), acreditamos que o efeito mutagênico observado seja referente à ação do cresol. No entanto, os resultados obtidos pelo ensaio de microssuspensão com *Salmonella*, sugerem que outras substâncias com potencial mutagênico também possam estar presentes no LE, uma vez que os resultados positivos de mutagenicidade para esse ensaio foram observados, igualmente, para o LE de 0 e 6 meses de atenuação natural. Como a concentração de cresol no LE de 6 meses era mais baixa, inferimos a presença de outros contaminantes com potencial mutagênico não identificados pelas análises químicas. Somado a isso, outros estudos relataram que o cresol não foi capaz de induzir um efeito mutagênico nas linhagens TA 98 e TA 100 de *S. typhimurium*, tanto na ausência com na presença da fração metabolizadora S9 mix (KUBO; URANO; UTSUMI, 2002).

As dioxinas, quando em altas doses, podem induzir uma ampla variedade de efeitos para o homem, como câncer, disfunção endócrina, imunotoxicidade, distúrbios fisiológicos e

reprodutivos, neurotoxicidade, entre outros (SCHECTER; COLACINO; BIRNBAUM, 2011). No entanto, os dados referentes aos efeitos genotóxicos em seres humanos são considerados inconclusivos e inconsistentes. Embora a maioria desses estudos evidencie que as dioxinas e furanos não são genotóxicos para animais, incluindo o homem (ATSDR, 1998), os estudos são baseados em amostras pequenas, o que não certifica essa ação. Valic et al. (2004) relataram que pacientes intoxicados com a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), com uma concentração sanguínea de 85,600 pg/g e 17,700 pg/g apresentaram uma frequência significativa de MN, indicando um efeito mutagênico da TCDD. Em nosso trabalho, embora os valores de dioxinas tenham aumentado na amostra de LE, após 6 e 12 meses de biorremediação (Tabela 1), as concentrações presentes destes compostos não induziram um aumento na frequência de micronúcleos em células HepG2 e mutagenicidade nos ensaios com *Salmonella*. Em estudos anteriores, a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, considerada a substâncias mais tóxicas dentre essa classe de compostos, não apresentou atividade mutagênica para as linhagens TA 98 e TA 100, por meio do teste de Ames (GEIGER; NEAL, 1981).

Entretanto, como o LE é uma mistura complexa, não podemos descartar um possível efeito sinergístico entre os seus componentes, o que pode ter levado à mutagenicidade observada. Segundo Oleszczuk (2008), como o LE é composto de uma matriz complexa constituída por diversas substâncias, é difícil atribuir o efeito toxicológico observado a compostos específicos, já que podem ocorrer inúmeras interações químicas entre as diferentes substâncias presentes.

Uma diminuição significativa dos efeitos observados ao longo do período de atenuação natural, tanto para o teste do MN como para o ensaio de microssuspensão com *Salmonella*, sugere a necessidade do emprego de metodologias de descontaminação antes da disposição do LE em solos agrícolas. Mesmo quando associado em pequenas concentrações ao solo, o LE, sem um pré-tratamento, mostrou-se capaz de induzir danos genéticos em células humanas, podendo caracterizar em um contaminante com potencial de danos para o ambiente.

Outros autores também relatam que, após a realização de um tratamento de descontaminação do LE, houve uma significativa diminuição dos efeitos mutagênicos, indicando a importância de tratamento prévios do LE, antes de sua disponibilização no ambiente (GAJSKI; OREŠČANIN; GARAJ-VRHOVAC, 2011). De acordo com Roig et al. (2012), a realização de pré-tratamento do LE, antes de seu descarte no ambiente, influencia diretamente algumas de suas propriedades, como por exemplo, a sua toxicidade. Esses autores, após estudarem diferentes tipos

de LE, concluíram que aqueles que não foram pré-tratados apresentaram os maiores índices de toxicidade para ensaios com vegetais e bactérias, enquanto o LE que foi submetido à compostagem foi considerado 2 a 3 vezes menos tóxico que os demais. Ramírez et al. (2008), ao avaliarem o potencial tóxico de LEs provenientes de estações de tratamento de esgoto urbano em 3 diferentes vegetais (*Brassica rapa*, *Lolium perenne* e *Trifolium pratense*) concluíram que a realização de compostagem reduziu significativamente a fitotoxicidade do LE. Estudos realizados por Domene et al. (2008) também indicaram que, para evitar impactos às comunidades edáficas, o LE deve ser estabilizado antes de ser aplicado ao solo. Donnelly et al. (1990) também verificou uma diminuição da atividade mutagênica com o aumento do período de disposição de LE no solo. Os autores observaram que as substâncias mutagênicas presentes inicialmente no LE persistiam por longos períodos no solo, sendo necessário um tempo de aproximadamente dois anos para que a atividade mutagênica dos solos estudados diminuísse a níveis basais. No entanto, em nosso estudo, um decaimento do potencial mutagênico do LE já foi observado após 6 meses de atenuação natural, culminando em uma diminuição mais pronunciada após 12 meses de biorremediação. Esses resultados descritos na literatura, juntamente com os observados no presente estudo, indicam a necessidade de pré-processamento do LE para que o mesmo possa ser utilizado na agricultura e, consequentemente, disponibilizado no ambiente.

5. Conclusão

A disposição de LE em solos agrícolas, sem um tratamento prévio, pode contribuir para um aumento da atividade mutagênica dos solos, implicando em danos ao ambiente e aos organismos expostos. A presença de substâncias mutagênicas no extrato aquoso do LE indica que os contaminantes presentes no LE podem ser carreados para outros meios físicos e, assim, contaminar águas subterrâneas e superficiais. Pelos resultados obtidos neste trabalho, é possível inferir que o efeito mutagênico observado para este LE parece estar relacionado com uma ação de pró-mutágenos, uma vez que a atividade mutagênica se mostrou mais relacionada com ensaios que apresentaram sistema de metabolização hepática.

O teste do MN em células HepG2 e o ensaio de *Salmonella*/microssoma com a linhagem TA 100 mostraram ser ferramentas bastante sensíveis para a detecção de danos mutagênico decorrentes da ação de LE.

O uso do LE como fertilizante só deve ser feito após a realização de sua detoxificação, sendo o processo de atenuação natural bastante eficiente para este propósito. No entanto, sugerimos que deva ser assegurado um período mínimo de 12 meses de biorremediação, para garantir a total eliminação das substâncias com ação mutagênica.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem à Profa. Dra. Dejanira Francheschi de Angelis, do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, por disponibilizar seu laboratório para a realização das etapas iniciais deste trabalho; à empresa Foz de Rio Claro pela disponibilização das amostras de lodo e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Processo No. 2009/09665-0, pelo suporte financeiro.

7. Referências Bibliográficas

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 10006*: **Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004.

ALVARENGA, P.; PALMA, P.; GONÇALVES, A.P.; FERNANDES, R.M.; CUNHA-QUEDA, A.C.; DUARTE, E.; VALLINI, G. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. **Environment International**, v.33, p.505–513, 2007.

APARICIO, I.; SANTOS, J.L.; ALONSO, E. Limitation of the concentration of organic pollutants in sewage sludge for agricultural purposes: A case study in South Spain. **Waste Manegement** v.29, p.1747-1753, 2009.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1998. **Toxicological Profile for Chlorinated dibenzo-p-dioxins.** Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

BADERNA, D.; COLOMBO, A.; AMODEI, G.; CANTÙ, S.; TEOLDI, F.; CAMBRIA, F.; ROTELLA, G.; NATOLINO, F.; LODI, M.; BENFENATI, E. Chemical-based risk assessment and in vitro models of human health effects induced by organic pollutants in soils from the Olona valley. **Science of Total Environment**, v.463-464, p.790-801, 2013.

BAKARE, A.A.; PANDEY, A.K.; BAJPAYEE, M.; BHARGAV, D.; CHOWDHURI, D.K.; SINGH, K.P.; MURTHY, R.C.; DHAWAN, A. DNA damage induced in human peripheral blood lymphocytes by industrial solid waste and municipal sludge leachates. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.48, p.30-37, 2007.

BONASSI S, ZNAOR A, CEPPI M, LANDO C, CHANG WP, HOLLAND N, KIRSCH-VOLDERS M, ZEIGER E, BAN S, BARALE R, BIGATTI MP, BOLOGNESI C, CEBULSKA-WASILEWSKA A, FABIANOVA E, FUCIC A, HAGMAR L, JOKSIC G, MARTELLI A, MIGLIORE L, MIRKOVA E, SCARFI MR, ZIJNO A, NORPPA H, FENECH M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v.28, p.625-631, 2007.

CARDOZO, T.R.; ROSA, D.P.; FEIDEN, I.R.; ROCHA, J.A.V.; D'AVILA DE OLIVEIRA, N.C.; PEREIRA, T.S.; PASTORIZA, T.F.; MARQUES, D.M.; LEMOSA, C.T.; TERRA, N.R.; VARGAS, V.M.F. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutation Research**, v.603, p.83–96, 2006.

ÇIFCI, D.İ.; KINACI, C,; ARIKAN, O.A. Occurrence of phthalates in sewage sludge from three wastewater treatment plants in Istanbul, Turkey. **Clean – Soil, Air, Water**, v.41, p. 851-855, 2013.

CINCINELLI, A., MARTELLINI, T., MISURI, L., LANCIOTTI, E., SWEETMEN, A., LASCHI, S., PALCHETTI, I. PBDEs in Italian sewage sludge and environmental risk of using sewage sludge for land applications. **Environ. Poll.** v.161, p.229-243, 2012.

CLAXTON, L.D.; UMBUZEIRO, G.A.; DEMARINI, D. The *Salmonella* Mutagenicity Assay: The Stethoscope of Genetic Toxicology for the 21st Century. **Environmental Health Perspectives**, v.118, p.1515-1522, 2010.

DOMENE X.; RAMÍREZ W.; MATTANA S.; ALCAÑIZ J.M.; ANDRÉS P. Ecological risk assessment of organic waste amendments using the species sensitivity distribution from a soil organisms test battery. **Environ Pollut.**, v.155, p.227-236, 2008.

DONNELLY, K.C.; THOMAS, J.C.; ANDERSON, C.S.; BROWN, K.W. The influence of application rate on the bacterial mutagenicity of soil amended with municipal sewage sludge. **Environmental Pollution**, v.68, p.147-159, 1990.

FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v.22, p.299-310, 2003.

FENECH, M. The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. **Methods in Molecular Biology**, v.410, p.185-216, 2008.

GAJSKI, G.; OREŠČANIN, V.; GARAJ-VRHOVAC, V. Cytogenotoxicity of sewage sludge leachate before and after calcium oxide-based solidification in human lymphocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.1408-1415, 2011.

GEIGER, L.E.; NEAL, R.A. Mutagenicity testing of 2,3,7,8-tertachlorodibenzo-*p*-dioxin in histidine auxotrophs of *Salmonella typhimurium*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.59, p.125-129, 1981.

HAMAGUCHI F, TSUTSUI T. Assessment of genotoxicity of dental antiseptics: ability of phenol, guaiacol, p-phenolsulfonic acid, sodium hypochlorite, p-chlorophenol, m-cresol or formaldehyde to

induce unscheduled DNA synthesis in cultured Syrian hamster embryo cells. **Jpn J Pharmacol.**, v.83, p.273-276, 2000.

HIKIBA, H.; WATANABE, E.; BARRET, C.; TSUTSUI, T. Ability of fourteen chemical agents used in dental practice to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.97, p.146-152, 2005.

KADO, N.Y.; LANGLEY, D.; EISENSTADT, E. A simple modification of *Salmonella* liquid incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. **Mutation Research**, v.121, p.25-32, 1983.

KLEE, N.; GUSTAVSSON, L.; KOSMEHL, T.; ENGWALL, M.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T.; HOLLERT, H. Changes in toxicity and genotoxicity of industrial sewage sludge samples containing nitro- and amino-aromatic compounds following treatment in bioreactors with different oxygen regimes. **Toxicity and Genotoxicity of Industrial Sewage Sludge**, v.11, p.313-320, 2004.

KNASMÜLLER, S.; GOTTMANN, E.; STEINKELLNER, H.; FOMIN, A.; PICKL, C.; PASCHKE, A.; GÖD, R.; KUNDI, M. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. **Mutation Research**, v.420, p.37-48, 1998.

KNASMÜLLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W.W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B.J. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants current state of knowledge. **Toxicology**, v.198, p.315-328, 2004.

KUBO, T.; URANO, K.; UTSUMI, H. Mutagenicity characteristics of 225 environmental chemicals. **Journal of Health Science**, v.48, p.545-554, 2002.

MARON, D.M., AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v.113, p.173-214, 1983.

MATSUMOTO, S.T.; RIGONATO, J.; MANTOVANI, M.S.; MARIN-MORALES, M.A. Evaluation of the genotoxic potential due to the action of an effluent contaminated with chromium, by the comet assay in CHO-K1 cultures. **Caryologia**, v.58, n.1, p.40-46, 2005.

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bactéria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v.47, p.1255-1264, 2010.

MAZZEO, D.E.C.; MATSUMOTO, S.T.; LEVY, C.E.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Application of micronucleus test and comet assay to evaluate BTEX biodegradation. **Chemosphere**, v.90, p.1030-1036, 2013.

McCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsoma test: Assay of 300 chemicals. **Medical Science**, v.72, p.5135-5139, 1975.

MEGHARAJ, M.; RAMAKRISHNAN, B.; VENKATESWARLU, K.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. **Environment International**, v.37, p.1362-1375, 2011.

MIELLI, A.C.; MATTA, M.E.M.; NERSESYAN, A.; SALDIVA, P.H.N.; UMBUZEIRO, G.A. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. **Mutation Research**, v.672, p.51-54, 2009.

MILLS, M.A.; BONNER, J.S.; MCDONALD, T.J.; PAGE, C.A.; AUTENRIETH, R.L. Intrinsic bioremediation of a petroleum-impacted wetland. **Marine Pollution Bulletin**, v.46, p.887-899, 2003.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods**., v.65, p.55-63, 1983.

NATARAJAN, A.T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, v.6, p.399- 403, 1991.

OLESZCZUK, P. Forms of polycyclic aromatic hydrocarbon in the formation of sewage sludge toxicity to *Heterocypris incongruens*. **Science of Total Environment**, v.404, p.94-102, 2008.

OTTAVIANI, M.; CREBELLI, R.; FUSELLI, S.; LA ROCCA, C.; BALDASSARRI, L.T. Chemical and mutagenic evaluation of sludge from a large wastewater treatment plant. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v.26, p.18-32, 1993.

PATHAK, A.; DASTIDAR, M.G.; SREEKRISHNAN, T.R. Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: A review. **Journal of Environmental Management**, v.90, p.2343-2353, 2009.

PÉREZ, S.; REIFFERSCHEID, G.; EICHHORN, P.; BARCELÓ, D. Assesment of the mutagenic potency of sewage sludges contaminated with polycyclic aromatic hidrocarbons by an Ames fluctuation assay. **Environmental Chemistry**, v.22, p.2576-2584, 2003.

RAMÍREZ W.A.; DOMENE X.; ORTIZ O.; ALCAÑIZ J.M. Toxic effects of digested, composted and thermally-dried sewage sludge on three plants. **Bioresour Technol**., v.99, p.7168–7175, 2008.

RATHOD, P.H., PATEL, J.C., SHAH, M.R., JHALA, A.J. Evaluation of gamma irradiation for bio-solid waste management. **Int. J. Environ. Waste Manage**, v.2, p.37-48, 2008.

RATHOD, P.H.; PATEL, J.C.; SHAH, M.R.; JHALA, A.J. Recycling gamma irradiated sewage sludge as fertilizer: A case study using onion (*Alium cepa*). **Applied Soil Ecology**, v.41, p.223-233, 2009.

ROIG, N.; SIERRA, J.; NADAL, M.; NAVALÓN-MADRIGAL, P.; SCHUHMACHER, M.; DOMINGO, J.L. Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants. **Science of Total Environment**, v.425, p.99-109, 2012.

SCHECTER, A.J.; COLACINO, J.A.; BIRNBAUM, L.S. Dioxins: Health Effects, In: NRIAGU, J. (Ed.). **Encyclopedia of Environmental Health**, Amsterdam: Elsevier, pp. 93-100, 2011.

SILVA JÚNIOR, F.M.R.; VARGAS, V.M.F. Using the Salmonella assay to delineate the dispersion routes of mutagenic compounds from coal wastes in contaminated soil. **Mutation Research**, v.673, p. 116-123, 2009.

SOLANO, M.L.M.; LIMA, P.L.A.; LUVIZUTTO, J.F.L.; SILVA, P.R.P.; UMBUZEIRO, G.A.; CAMARGO, J.L.V. *In vivo* genotoxicity evaluation of a treated urban sewage sludge. **Mutation Research**, v.676, p.69-73, 2009.

TEWARI, A.; CHAUHAN, L.K.S.; KUMAR, D.; GUPTA, S.K. Municipal sludge leachate-induced genotoxicity in mice – a subacute study. **Mutation Research**, v.587, p.9-15, 2005.

VALIC, E.; JAHN, O.; PAPKE, O.; WINKER, R.; WOLF, C.; RUDIGER, W.H. Transient increase in micronucleus frequency and DNA effects in the comet assay in two patients after intoxication with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 77, p. 301-306, 2004.

VAN DER WATER, F.M.; HAVINGA, J.; RAVESLOOT, W.T.; HORBACH, G.J.M.J.; SCOONEN, W.G.E.J. High content screening analysis of phospholipidosis: Validation of a 96-well assay with CHO-K1 and HepG2 cells for the prediction of in vivo based phospholipidosis. **Toxicology *in Vitro***, v.25, p.1870-1882, 2011.

YONG, R.N., MULLIGAN, C.N., 2003. **Natural Attenuation of Contaminants in Soils**. CRC Press, 336p.

Tabela 1. Caracterização química do solo referência e do LE 100% após diferentes períodos de atenuação natural monitorada.

Parâmetro	Unidade	Solo referência	Amostra Inicial	Amostra 2 meses	Amostra 6 meses	Amostra 12 meses	Valor máximo permitido pela legislação CONAMA 375
Benzenos Clorados							
1,2,3-Triclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	10
1,3,5-Triclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	500
1,2,4-Triclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	11
1,2-Diclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	730
1,3-Diclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	390
1,4-Diclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	390
1,2,3,4-Tetraclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	160
1,2,4,5-Tetraclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	10
1,2,3,5-Tetraclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	6,5
Ésteres de ftalatos							
Di-N-Butilftalato	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	700
Dimetilftalato	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	250
Bis[2-Etilexil]ftalato	µg/kg	ND	ND	117.154,0	ND	ND	1000
Fenóis clorados							
2,4-Diclorofenol	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	31
2,4,6-Triclorofenol	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	2400
Pentaclorofenol	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	160
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos							
Benzo(a)antraceno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	25
Benzo(a)pireno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	52
Benzo(k)fluoranteno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	380
Indeno(1,2,3-cd)pireno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	31
Naftaleno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	120
Fenantreno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	3300
Hexaclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
Fenóis não clorados							
m-, p-Cresol	µg/kg	ND	276.089,8	256.743,4	ND	ND	160
o-Cresol	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	160
Pesticidas Organoclorados							
Heptacloro	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
Aldrin	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
g-BHC	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
a-Clordano	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
g-Clordano	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
Dieldrin	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
DDT	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
Endrin	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
Toxafeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE
Mirex	µg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	NE

Tabela 1 (continuação)

Substâncias inorgânicas							
Fósforo Total	mg/kg	457,7	3.756,1	13.645,8	11.235,8	8997,8	NE
Potássio Total	mg/kg	255,1	678,8	1.787,2	1.519,5	1.140,0	NE
Sódio Total	mg/kg	390,1	296,7	1.532,7	1.179,1	384,8	NE
Enxofre Total	mg/kg	246,5	6.089,0	17.961,3	17.561,0	13.589,3	NE
Cálcio Total	mg/kg	924,1	4.302,7	15.937,5	16.284,6	11473,2	NE
Magnésio Total	mg/kg	372,3	989,8	3.671,1	3.094,9	2354,9	NE
Arsênio Total	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	41
Bário Total	mg/kg	46,0	100,8	356,1	388,9	370,8	1300
Cádmio Total	mg/kg	ND	ND	ND	ND	ND	39
Chumbo Total	mg/kg	13,7	13,9	45,0	45,1	45,4	300
Cobre Total	mg/kg	75,5	66,7	202,1	234,6	223,0	1500
Crômio Total	mg/kg	32,2	36,7	66,8	35,7	39,8	1000
Mercúrio Total	mg/kg	ND	0,202	ND	ND	0,675	17
Molibdênio Total	mg/kg	4,89	2,27	11,4	7,34	5,54	50
Níquel Total	mg/kg	14,6	7,45	20,7	23,7	17,6	420
Zinco Total	mg/kg	53,9	233,0	818,7	922,5	785,0	2800
Série Nitrogenada							
Nitrato (como N)	mg/kg	13,7	ND	ND	0,637	ND	NE
Nitrito (como N)	mg/kg	ND	5,13	ND	ND	ND	NE
Nitrogênio Amoniacal	mg/kg	ND	ND	ND	ND	646,9	NE
Nitrogênio Kjeldahl Total	mg/kg	ND	ND	ND	ND	830,5	NE
Dioxinas							
Total de Dioxinas	ng/kg	72,1685	269,237	622,8792	884,16	975,5	NE
Total de Furanos	ng/kg	5,5511	74,575	135,0086	101,66	139,96	NE
Carbono Orgânico Total	%	2,83	69,6	41,3	34,1	29,6	NE

ND: não detectado; NE: parâmetro com valores não estabelecidos.

Tabela 2. Mutagenicidade de extratos aquosos de LE para *Salmonella typhimurium* na presença (+S9) e ausência (-S9) de fração metabólica, após diferentes períodos de biorremediação.

Amostras	TA 98		TA 100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
LE 0 meses	NS	NS	NS	935 ± 0,25
LE 2 meses	NS	NS	NS	1018 ± 0,31[a]
LE 6 meses	NS	NS	NS	689 ± 0,25
LE 12 meses	NS	NS	NS	NS

Número de revertentes/g equivalente da amostra seca ± desvio padrão
NS: não significativo
[a] indicativo de mutagenicidade (não significativo para ANOVA)
Controle negativo: –S9: TA98 (42,50 ± 33,53), TA100 (181,40 ± 29,35); +S9: TA98 (53,20 ± 11,73), TA100 (197,00 ± 17,45)
Controle positivo: –S9: TA98 (476), TA100 (1512,00 ± 22,63); +S9: TA98 (787,00 ± 100,41), TA100 (1715,00 ± 284,26)

Tabela 3. Citotoxicidade do solubilizado do LE 100% (tempo 0) em diferentes concentrações em células HepG2.

LE 100% (tempo 0)	**Concentrações (µL/mL)**				
	5	**10**	**15**	**20**	**40**
Viabilidade	71,215%	82,325%	73,345%	68,585%	62,01%

Tabela 4. Média e desvio padrão da presença de micronúcleos (MN) presentes em células HepG2 expostas a diferentes concentrações de LE.

Tratamento	**Amostra inicial**	**Amostra 2 meses**	**Amostra 6 meses**	**Amostra 12 meses**
CN	27,27 ± 3,00	24,00 ± 2,00	29,00 ± 3,22	24,82 ± 3,41
Solo	30,70 ± 2,77	-	-	-
CP	122,61 ± 10,80*	130,93 ± 13,51*	104,67 ± 13,24*	102,17 ±12,38*
LE 10%	41,38 ± 5,82*	21,50 ± 4,23	31,64 ± 2,43	25,49 ± 5,00
LE 25%	48,50 ± 2,74*	53,67 ± 2,73*	30,66 ± 3,32	23,65 ± 3,00
LE 50%	56,83 ± 3,82*	56,83 ± 2,79*	31,33 ± 2,51	24,66 ± 1,86
LE 100%	63,83 ± 1,94*	67,17 ± 5,23*	31,30 ± 1,36	26,14 ± 3,53

CN. Controle negativo; CP. Controle positivo.
6000 células analisadas por ensaio. Média ± Desvio padrão.
*estatisticamente significativo em relação ao controle negativo ($p<0,05$), pelo teste de Mann-Whitney

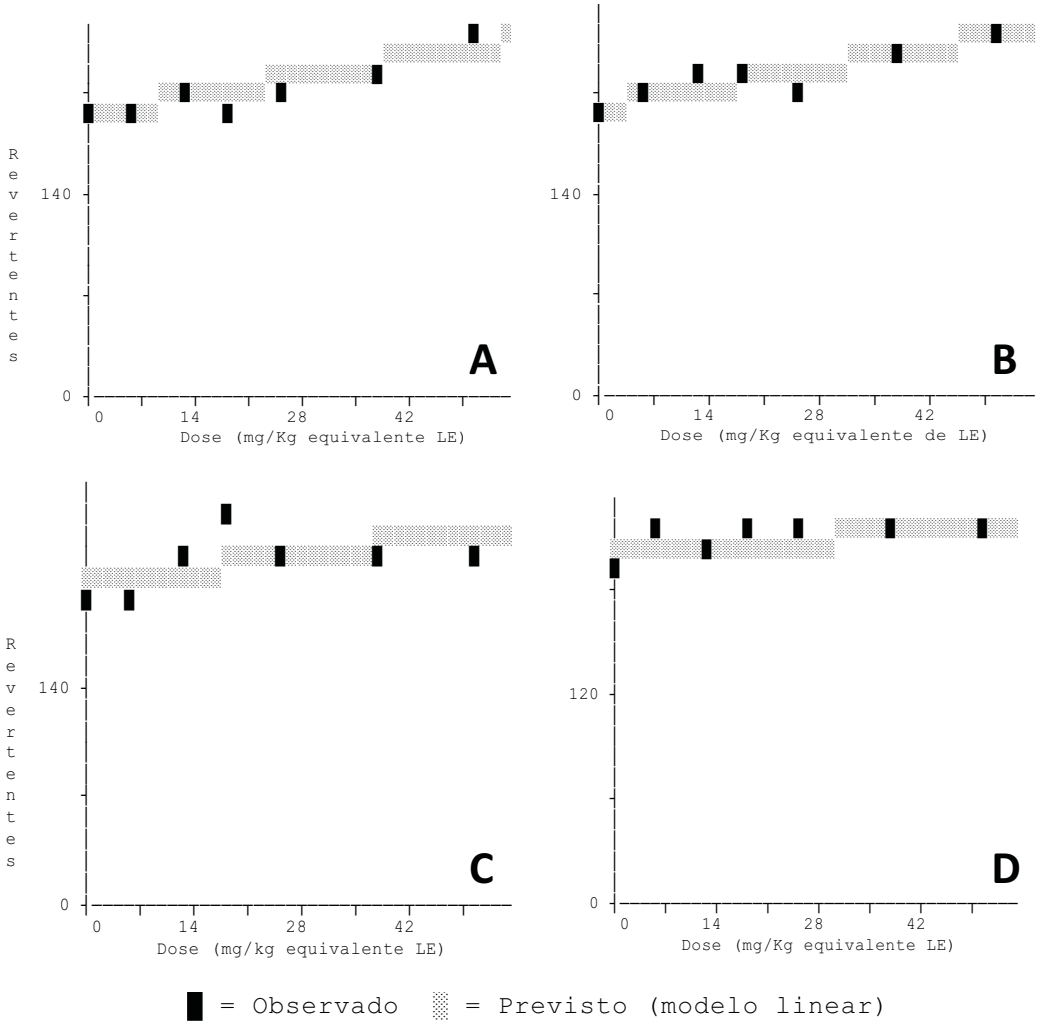


Figura 1. Comparação entre o efeito dose-resposta das diferentes amostras de LE observado para a linhagem TA 100, na presença de fração metabolizadora. A. 0 meses; **B.** 2 meses; **C.** 6 meses; **D.** 12 meses. Tempos 0 e 6 meses: respostas significativas para ANOVA e regressão linear; Tempo 2 meses: resposta significativa para regressão linear; Tempo 12 meses: ausência de significância.

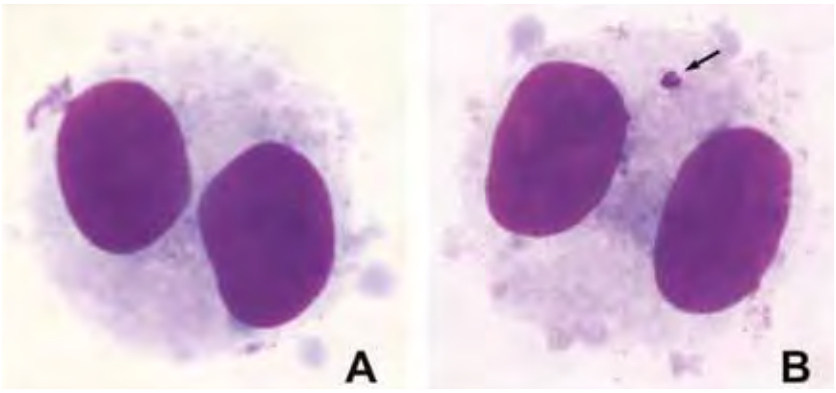


Figura 2. Imagens de células HepG2 – teste do MN. A. Célula binucleada (sem alteração); **B.** Célula binucleada com micronúcleo (seta).

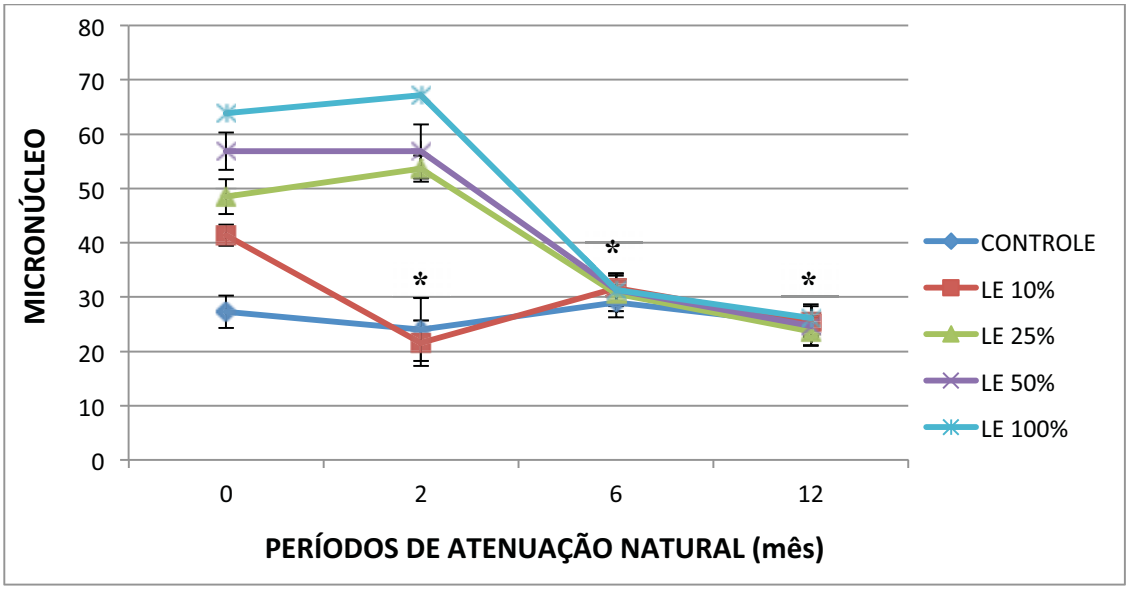


Figura 3. Comparação entre o valor médio de micronúcleos (MN) presentes em células HepG2, expostas a diferentes concentrações de LE, antes e após processo de atenuação natural. *Diferença significativa entre a concentração não biodegradada e sua respectiva concentração biodegradada, de acordo com o teste de Mann-Whitney ($p<0,05$).

Artigo 4. Decaimento da toxicidade do lodo de esgoto e possibilidade do seu uso como fertilizante de solos agrícolas

RESUMO

Lodos gerados em sistema de tratamento de esgoto podem constituir importantes fontes de nutrientes para solos degradados, caracterizando-se em uma alternativa viável para uso como fertilizantes agrícolas, mas também podem conter substâncias tóxicas e causar sérios impactos ao ambiente e aos organismos. Amostras de lodo de esgoto (LE) derivado de esgoto doméstico foram enterradas, por períodos de 0, 2, 6 e 12 meses, em covas feitas em um ambiente isento de contaminantes, de modo a promover uma atenuação natural desse resíduo, para avaliar possíveis alterações na sua atividade biológica quando disposto no ambiente. Após cada período de atenuação natural, foram obtidos um extrato aquoso e um extrato orgânico, que foram testados quanto ao potencial embriotóxico e estrogênico, bem como quanto à presença de compostos capazes de se ligarem ao receptor aril hidrocarboneto (AhR). Pelos ensaios com levedura recombinante (ER-RYA), foi observado que o LE possuiu uma baixa estrogenicidade. Foram observados efeitos embriotóxicos pronunciados para as amostras aos dois primeiros períodos testados (0 e 2 meses). Atividades *dioxin-like* foram detectadas por meio do ensaio com leveduras recombinantes portadoras do AhR (YCM-RYA) e por um aumento na resposta do gene CYP1A em embriões de *Danio rerio*. Foi observada, com o aumento do tempo de biorremediação, uma diminuição desses efeitos. Análises químicas mostraram altos índices de *m*- e *p*-cresol nas amostras de LE, além da presença de dioxinas e furanos. No entanto, os efeitos biológicos observados neste trabalho parecem não ser justificados apenas pela presença desses contaminantes. A presença de compostos solúveis em água com elevada atividade biológica, como por exemplo os reativos com o AhR, alerta para o fato do LE, quando disposto no ambiente, poder contaminar as águas subterrâneas. O processo de detoxificação utilizado contribuiu para uma diminuição progressiva das atividades biológicas das substâncias tóxicas presentes no LE.

Palavras chave: atividade *dioxin-like*, expressão gênica, embriotoxicidade, estrogenicidade, atenuação natural, poluentes emergentes.

1. INTRODUÇÃO

Uma das principais preocupações mundiais, em relação à contaminação ambiental, está relacionada com o gerenciamento de resíduos urbanos, uma vez que estes só tendem a aumentar em quantidade de produção (ZOTOS et al., 2009). Entre os resíduos mais preocupantes está o lodo de esgoto (LE), que é gerado em grandes quantidades durante o processo de tratamento de esgoto (PATHAK; DASTIDAR; SREEKRISHNAN, 2009). Por conter altas concentrações de matéria orgânica e ser uma possível fonte de nutrientes, a aplicação do LE em solos agrícolas vem sendo considerada como uma das melhores alternativas para sua disposição (RATHOD et al., 2009; ZULOAGA et al., 2013). No entanto, como consequência do tratamento do esgoto, o LE tende a acumular uma ampla variedade de contaminantes orgânicos e inorgânicos indesejáveis, além de micro-organismos patogênicos (GIBSON et al., 2005; HARRISON et al., 2006).

Dentre os contaminantes ambientais, existe uma classe de compostos que vem sendo foco de atenção e preocupação. Estes compostos fazem parte dos poluentes emergentes e são conhecidos como disruptores endócrinos ou agentes estrogênicos. Uma das principais preocupações com a contaminação ambiental por LE é se este possui substâncias com ação estrogênica (GIUDICE; YOUNG, 2011). Segundo Urase e Kikuta (2005), a remoção destes compostos dos efluentes de esgotos se dá pela simples transferência dessas substâncias da fase aquosa para o LE. Outra importante classe de substâncias que pode ser encontrada em LE são os compostos *dioxin-like*, substâncias estas que possuem a característica de se ligarem ao AhR (ENGWALL; HJELM, 2000). Linhagens de leveduras geneticamente modificadas, que são dotadas com receptores nucleares específicos para cada grupo de contaminante, possibilitam a identificação, de forma bastante eficiente, de substâncias biologicamente ativas presentes em amostras ambientais (PIÑA et al., 2009).

Além do LE ser fonte direta de contaminação dos solos, sua disposição também contribui para a disseminação de poluentes para o ambiente aquático, principalmente por escoamento superficial ou por lixiviação. Dessa forma, os organismos aquáticos também podem ser alvos de seus contaminantes (ERIKSEN et al., 2009).

Testes com embriões de peixe zebra vêm sendo bastante utilizados para a avaliação da toxicidade de amostras ambientais relacionadas com contaminações aquáticas, pela alta sensibilidade que estes organismos apresentam a xenobióticos (HALLARE et al., 2005). Por esta razão, os ensaios que avaliam a potencialidade de um agente químico induzir alterações na expressão gênica são importantes ferramentas para predizer, tanto os efeitos tóxicos de contaminantes como por fornecer informações altamente relevantes sobre o possível modo de ação do agente tóxico (VOELKER et al., 2008).

Diversos autores citam a necessidade da realização de um pré-processamento do LE antes de sua disposição no ambiente, a fim de promover sua descontaminação (DOMENE et al., 2008; RAMÍREZ et al. 2008; RATHOD et al., 2009; TAS, 2010; ROIG et al., 2012). Entre os processos indicados, a atenuação natural é considerada uma alternativa efetiva e de baixo custo na biorremediação de poluentes ambientais (BHUPATHIRAJU et al., 2002; MILLS et al., 2003).

Assim, neste trabalho foi avaliado e comparado o efeito do LE, antes e após diferentes períodos de atenuação natural, sobre embriões de *D. rerio*, quanto à sua potencialidade de induzir alterações no padrão de expressão do gene CYP1A. Adicionalmente, foi também avaliado se o LE apresenta, em sua composição, compostos com atividades estrogênicas e *dioxin-like* e se o processo de atenuação natural pode promover um decaimento da toxicidade do LE.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras de lodo

Nesse estudo, foi utilizado lodo anaeróbio centrifugado coletado na Estação de Tratamento de Esgoto Urbano Jardim das Flores localizada em Rio Claro, São Paulo, Brasil.

Após a coleta, as amostras foram dispostas em sacos plásticos perfurados (furos de 0,5 mm de diâmetro e espaçamento de 1 cm entre eles) em covas feitas em um ambiente livre de contaminação, onde permaneceram por períodos de 2, 6 e 12 meses, para a possível biorremediação do LE, por atenuação natural. Este procedimento foi realizado para avaliar o comportamento do LE quando este é aplicado como recondicionante de solos agrícolas.

Uma das características deste LE é sua alta concentração de *m*- e *p*-cresol e a presença de pequenas quantidades de dioxinas e furanos (Tabelas 1 e 2).

2.2. Processamento e obtenção dos extratos

Decorrido cada período de biorremediação, as amostras de LE foram liofilizadas, peneiradas em malha de 80 mm e armazenadas, protegidas da luz, em frascos de vidro a -20 ºC, até sua utilização.

Para a obtenção do extrato aquoso do LE, foi utilizada a metodologia proposta pela norma NBR 10.006, da ABNT (2004), que é indicada para avaliar a presença de substâncias hidrossolúveis. Em recipientes individuais, foram misturadas 1000 mL de água ultra pura e 125 g de cada amostra liofilizada. Após 7 dias, o sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana de 0,45 μm.

O extrato orgânico foi obtido pelo método de Soxhlet, seguindo o procedimento 3540C da USEPA (2008). Foram adicionadas em cartuchos de extração de celulose, individualmente, 10g de cada uma das amostras liofilizadas. Os cartuchos foram recobertos com lã de vidro. A extração foi realizada com 250 mL de acetona e diclorometano, na proporção 1:1 (v/v), por um período de 18 horas. As amostras extraídas foram evaporadas por meio de rotavapor (38º C e -200/300 mmHg) e, posteriormente, submetidas a uma suave corrente de nitrogênio gasoso, até todo líquido ser evaporado. Em seguida, o material restante foi ressuspendido em dimetilsufóxido (DMSO), em quantidade suficiente para que toda a parte solúvel presente fosse solubilizada, de forma que as concentrações finais obtidas foram de 0,5 g/mL, 0,5 g/mL, 0,91 g/mL e 1g/mL para as amostras de LE nos tempos 0, 2, 6 e 12 meses de atenuação natural, respectivamente.

2.3. Ensaios com levedura recombinante (RYA)

O protocolo utilizado para os ensaios com leveduras recombinantes foi baseado no protocolo proposto por Noguerol et al. (2006a; b). Para a detecção da atividade estrogênica das amostras (ER-RYA), foi utilizada a linhagem de levedura BY4741, a qual contém os plasmídeos pH5HEO (hER) e pVitBX2 (ERE-LacZ). Para a identificação de compostos capazes de se ligarem ao AhR (YCM-RYA), foi utilizada a linhagem de levedura YCM4 (MILLER, 1997), que apresenta uma construção cromossomicamente integrada que co-expressa os genes hAHR e ARNT na presença do promotor Gal1-10 e do plasmídeo pDRE23-Z (XRE5-CYC1-LacZ).

O crescimento da levedura ocorreu em meio não seletivo, incubado a 30 °C, *overnight*, sob agitação suave e constante. Após a incubação, foi inoculado 20 µL da cultura de leveduras em 20 mL de meio mínimo SD (seletivo), específico para cada linhagem, incubando novamente a 30° C, *overnight*, sob agitação suave e constante (150 rpm). O cultivo foi ajustado a uma densidade óptica a 600 nm de 0,1. Foram adicionados 100 µL do cultivo em cada um dos poços das colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 de uma placa de 96 poços. Na coluna 1, foi adicionado, com o auxílio de capilares de vidro, 190 µL da cultura e 10 µL das amostras, sendo uma amostra por poço. A partir da coluna 1, foram realizadas as diluições para as outras colunas, transferindo 50 µL dos poços 1 para os 2; 50 µL dos poços 2 para os 3; 50 µL dos poços 3 para os 4; e assim sucessivamente, até os poços da coluna 9, e destes últimos, eliminados 50 µL de cada poço. Na coluna 11, foi realizado o teste controle positivo, adicionando-se 100 µL do cultivo mais hormônio (0,1 µL de 17-β-estradiol a 10 µM para ER e 1 µL de β-naftoflavona a 100 µM para YCM). A coluna 12 foi destinada ao teste controle

negativo, onde foram adicionados 100 µL do cultivo mais o solvente utilizado nas amostras na concentração de 5%. Também foi realizado, na coluna 10, um controle para observar a toxicidade das amostras, colocando-se 100 µL do cultivo mais hormônio e 50 µL do conteúdo da coluna 1 e, após serem homogeneizados, foram eliminados 50 µL.

As placas foram incubadas por 6 horas a 30ºC em agitação suave e constante (100 rpm), sendo, após esse período, adicionado 100 µl de Y-PER (Yeast Protein Extraction Reagent) em cada poço. As placas foram incubadas novamente por mais 30 minutos a 30ºC, com a mesma agitação. A seguir, foram adicionados em cada poço, 100 µL de uma solução de MuGal (0,1% de 2-mercaptoetanol e 0,5% de 4-metil-umbelliferone β-D-galactopiranoside). Após centrifugação, foi feita a leitura da placa em espectrofluorímetro, com filtro de excitação de 355 nm e de emissão de 460 nm, com leitura registrada durante 10 minutos. Os valores de atividade da β-galactosidase foram calculados, baseando-se no aumento da fluorescência, em relação ao tempo, utilizando métodos de regressão linear.

2.3.1. Cálculo de hormônio equivalente

O cálculo de hormônio equivalente permite estabelecer qual concentração do hormônio padrão (17-β-estradiol para ER e β-naftoflavona para YCM) é requerida para fornecer a mesma resposta que a amostra testada no ensaio de RYA. Assumindo-se que a curva dose-resposta segue um padrão sigmoide, pode-se calcular qual a diluição de uma dada amostra produz 50% da resposta hormonal máxima (EC 50). Os valores obtidos nos ensaios foram convertidos para hormônio equivalente, assumindo um valor de conversão de 0,267 nM 17-β-estradiol para ER-RYA e de 47 nM β-naftoflavona para YCM-RYA.

2.4. Ensaio com embriões de *D. rerio*

2.4.1. Manutenção dos adultos e embriões

Adultos da espécie *D. rerio*, oriundos de piscicultura, foram mantidos em aquários com água reconstituída (Instant Ocean 90 mg/L; 0,58 M $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ em água ultrapura) na temperatura de 27 ± 1,5 ºC e com fotoperíodo de 12 h. Um dia antes da realização do ensaio, 5 fêmeas e 3 machos de *D. rerio* foram agrupados para acasalamento. Após a postura, que se deu nas primeiras horas de claro pós agrupamento, os ovos viáveis foram removidos e transferidos para um recipiente contendo água reconstituída, mantidos sob as mesmas condições dos adultos.

2.4.2. Teste de toxicidade com embriões de *D. rerio* (FET, ISO 15088, 2007)

Para a determinação de concentrações não tóxicas a serem utilizadas nas análises de expressão gênica, foi realizado o teste de embriotoxicidade com embriões com 24 horas de pós-fertilização. Os indivíduos foram distribuídos na proporção de 1 embrião por poço (placa de 24 poços), contendo 2 mL da amostra a ser testada. Após 48 horas de exposição, foram contabilizados os indivíduos mortos; com atraso na eclosão; e com deformidades (formação de edemas no coração ou saco vitelínico, malformação da cauda, diferenças no padrão de pigmentação e ausência de movimento). Cada ensaio foi realizado em duplicata, mantendo sempre uma linha de controle negativo por placa.

Para os extratos orgânicos, foram testadas as concentrações de 1:500, 1:1500 e 1:5000. Já para os solubilizados, as concentrações utilizadas foram 25%, 5% e 2%. Também foram testadas diversas concentrações (250; 125; 62,5; 31,5; 20,0; 15,615; 10,0; 3,0; 1,0 mg/L) de *m*-cresol e de *p*-cresol, os quais, segundo a análise química, eram os principais contaminantes presentes no LE. Todas as soluções utilizadas foram prepraradas com água reconstituída, de forma a manter a mesma concentração de sais dos aquários de manuntenção dos peixes. Um controle negativo foi feito com 0,2% de DMSO, para os extratos obtidos por soxhlet, e com água reconstituída, para os solubilizados e para os cresóis.

2.4.3. Ensaio de expressão gênica de CYP1A

Para avaliar as alterações no padrão de expressão do gene CYP1A seguiu-se o protocolo proposto por Olivares et al. (2013). Embriões saudáveis com 24 h de desenvolvimento foram selecionados e distribuídos em placas de Petri de vidro com 3 cm de diâmetro. Em cada placa, foram colocados 10 embriões e 2,5 mL da amostra, sendo 5 placas por amostra. O controle negativo foi feito com 0,2% de DMSO para os extratos obtidos por soxhlet, e com água reconstituída para os solubilizados, sendo 1 placa para cada amostra. O controle positivo foi feito com β-Naftoflavona a 250 µg/L.

Após 48 h, foi removida a solução presente nas placas e os embriões foram imediatamente congelados e mantidos a -80ºC, até serem processados.

2.4.3.1. Extração de RNA

A extração de RNA total dos embriões congelados foi realizada utilizando o protocolo Trizol® (Invitrogen, Eugene). A concentração de RNA foi medida por espectrofotometria de absorção a 260 nm em NanoDrop ND-8000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). O RNA foi tratado com DNAseI (Quiagen), para remover contaminações

por DNA genômico. O RNA tratado foi transcrito para cDNA, utilizando o Kit 'First Strand cDNA Synthesis" da Roche (F Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) e estocado a -20 ºC. Para quantificar transcritos específicos em PCR real time (F. Hoffmann-La Roche), foram utilizadas alíquotas de 100 ng do RNA total, utilizando SYBR® Green Mix (Roche, Germany).

O par de primers para o gene CYP1A de *D. rerio* (GeneBank acesso número AB078927) foi Fw-GGTTAAAGTTCACCGGGATGC; Rv-CTGTGGTGTGACCCGAAGAAG. Como gene referência foi utilizado o PPIA2 (FW-GGGTGGTAATGGAGCTGAGA; Rv-AATGGACTTGCCACCAGTTC).

A abundância relativa de mRNA foi calculada a partir da segunda derivativa máxima de sua curva de amplificação (Cp). Os valores de ΔCp (Cp PPIA2 – Cp CYP1A) foram utilizados para calcular a quantidade de mRNA, expressa como número de cópias de mRNA do CYP1A por 1000 cópias de mRNA do gene referência (1000 X $2^{\Delta Cp}$).

3. RESULTADOS

3.1. Ensaios com levedura recombinante (RYA)

Os resultados de atividade estrogênica, avaliados por meio do ensaio ER-RYA, estão apresentados na Tabela 3. Os extratos orgânicos foram tóxicos para as leveduras, para todas as amostras testadas, impossibilitando a avaliação de uma resposta estrogênica. Em relação à atividade estrogênica, apenas os extratos aquosos das amostras de LE nos tempos 0 e 2 meses apresentaram resposta (5,30 e 3,15 ng/g, respectivamente), a qual não foi mais observada para as amostras dos tempos de 6 e 12 meses.

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos por meio do ensaio com YCM-RYA, da avaliação dos compostos com atividade do tipo *dioxin-like*.

Em relação ao extrato orgânico, todos os tempos testados apresentaram atividade biológica, tendo sua resposta máxima no tempo 2 meses. O extrato relativo a amostra de 6 meses ainda foi responsável por uma atividade biológica elevada, correspondendo a mais de 70% da atividade máxima observada. Embora uma resposta residual, correspondente a cerca de 20% da atividade máxima encontrada, ainda tenha sido observada para o extrato orgânico de 12 meses no ensaio com RYA-YCM, também foi observada uma redução progressiva da atividade biológica do LE ao longo dos períodos de biorremediação testados.

Os extratos aquosos também apresentaram uma atividade máxima referente a amostra de 2 meses. No entanto, observou-se um decaimento acentuado da atividade já para a amostra de 6 meses, o qual chegou a 100% para a amostra de 12 meses.

3.2. Ensaio com embriões de *D. rerio*

As análises realizadas com os embriões de zebrafish indicam que a amostra de LE inicial mostrou um forte efeito tóxico para o solubilizado e, particularmente, para o extrato orgânico de soxhlet (Figuras 1 e 2). Esta toxicidade decresceu ao longo do tempo de disposição do LE, embora ainda tenha permanecido significativa para o tempo 2 meses para o extrato orgânico e para 6 meses para o extrato aquoso. Na Tabela 5, é possível comparar os resultados obtidos para os 2 extratos nos diversos períodos de tempo, levando em consideração os diferentes parâmetros avaliados (mortalidade, deformidade e não eclosão). A partir da realização deste ensaio, foi possível estabelecer a concentração mínima onde os efeitos são observados (LOEC) e qual a concentração máxima onde os efeitos não são observados (NOEC), para os dois extratos testados, em ambos os períodos, de modo a determinar a melhor concentração para ser utilizada nos ensaios de expressão gênica.

Como a caracterização química do LE, bem como de seu extrato aquoso, detectou a presença de *m*-cresol e *p*-cresol (Tabelas 1 e 2), foi realizado um teste com esses 2 compostos, para uma melhor compreensão da toxicidade dessas substâncias para peixe. Foram testadas diferentes concentrações de cada uma delas (250; 125; 62,5; 31,5; 20,0; 15,615; 10,0; 3,0; 1,0 mg/L). Embora tenha sido observado que as concentrações mais altas testadas de *m*- e *p*-cresol induziram efeito tóxico significativo (Tabela 6), a concentração estimada de cresol presente nos extratos de LE foram mais baixas que a necessária para induzir o efeito observado (Tabela 5). Em relação aos efeitos embriotóxicos registrados pela indução de deformidades, os principais efeitos ocasionados por essas substâncias foram a ausência de pigmentação no embrião, a qual não foi observada quando os embriões foram expostos aos extratos de LE (Figura 2).

Em relação ao ensaio de expressão gênica com CYP1A, foi observado um aumento na expressão para todas as amostras testadas, particularmente para as do extrato orgânico, que mostraram uma resposta cerca de 5 vezes maior do que as do extrato aquoso. Os maiores valores observados foram referentes às amostras do período de 0 e 2 meses, tanto para o extrato orgânico como para o aquoso. Entretanto, uma diminuição pronunciada nesses valores foi observada para as amostras dos períodos 6 e 12 meses, de ambos os extratos, indicando que um aumento no período de disposição do LE leva a uma redução de seu efeito tóxico (Tabela 7).

4. DISCUSSÃO

O LE é um resíduo altamente complexo, que pode conter uma ampla diversidade de contaminantes. Assim, a qualidade do LE para uso agrícola não pode ser somente avaliada por meio de análises químicas, devendo incluir também bioensaios que detectam a presença de grupos de substâncias potencialmente tóxicas (KAPANEN et al., 2013).

Entre os contaminantes presentes no LE, devem ser também investigados os que apresentam atividade estrogênica, pois, segundo Urase e Kikuta (2005), a remoção de compostos estrogênicos dos efluentes de esgotos tratados nem sempre ocorre por bidegradação, mas sim pela transferência desses compostos da fase aquosa para o LE. Este fato faz com que o LE, se aplicado ao solo, possa ser fonte de contaminação de substâncias estrogênicas para o ambiente.

Fernandez et al. (2009), ao estudarem LE proveniente de uma estação de tratamento de esgoto próxima a Barcelona (Espanha), verificaram que, embora os efluentes apresentassem baixa atividade estrogênica, o LE resultante continha nonilfenol, nonilfenol monoetoxilato e nonilfenol dietoxilato, os quais foram responsáveis pela atividade estrogênica do afluente para ER-RYA (média de 52,6 pmol/L), indicando a necessidade de uma avaliação prévia da presença dessas substâncias no LE, antes do mesmo ser utilizado na agricultura. Murk et al. (2002), utilizando o ensaio com leveduras recombinantes, também relataram a presença de atividade estrogênica em LE, com valores entre 1,6 e 41 pmol de atividade equivalente de estradiol/g de peso seco.

Estudos realizados com leveduras recombinantes para avaliar a presença de compostos hormonais ativos em biossólidos de ETEs municipais no Canadá indicaram que amostras provenientes de digestão aeróbia possuíam nenhuma ou pouca atividade estrogênica (11,3 ng/g de peso seco), enquanto que amostras provenientes de digestão anaeróbia apresentaram atividade estrogênica bastante alta (1233 ng/g de peso seco) (LORENZEN et al., 2004). Apesar do LE aqui estudado ser de origem anaeróbia, os valores observados em nossos estudos são ainda menores que aqueles observados pelos autores acima citados, o que indica que o LE aqui estudado não apresenta atividade estrogênica significativa.

Dessa forma, embora exista uma atividade estrogênica para os tempos iniciais do LE estudado, esta apresenta valores muito baixos, que não foram detectados nas amostras de 6 e 12 meses de atenuação natural. Resultados semelhantes foram obtidos por Badia-Fabregat et al. (2012) para LE anaeróbio obtido na ETE “El Prat de Llobregat”, próximo a Barcelona, Espanha. Os autores observaram uma atividade equivalente de 0,67 μg/g de E2 para o LE

recém-coletado e uma ausência de estrogenicidade para esse mesmo LE, após ser biodegradado pelo fungo *Trametes versicolor*.

Compostos capazes de se ligarem ao AhR representam outro importante grupo de contaminantes tóxicos que podem estar presentes também no LE (ENGWALL; HJELM, 2000). Esses contaminantes são denominados como compostos com atividade *dioxin-like* e compõem 3 grupos principais: os compostos aromáticos hidrofóbicos, cuja estrutura planar *a* e o tamanho da molécula ou de uma parte dessa molécula favorece uma perfeita ligação ao AhR (p.e. bifenilos policlorados, dibenzodioxinas policloradas, dibenzofuranos policlorados); compostos com configuração estereoquímica específica e análogos alquilados (p.e. polihalogenados, halogenados mistos, antracenos, fluorenos, xantonas); ligantes fracos que não apresentam as características de planaridade, aromaticidade e hidrofobicidade, mas que são facilmente degradados pelas enzimas de detoxificação (p.e. indol, aminas heterocíclicas, alguns pesticidas) (HILSCHEROVA, 2000). A presença desses compostos em LE vem sendo constantemente relatada em vários estudos (SÁNCHEZ-BRUNETE; MIGUEL; TADEU, 2007; ZHANG et al., 2009; CLARKE; SMITH, 2011; CINCINELLI et al., 2012; KAPANEN et al., 2013).

Compostos com atividade do tipo *dioxin-like* também foram detectados em todos os LEs provenientes de 9 diferentes ETEs da cidade de Beijing (China) (ZHANG et al., 2009). Esta avaliação foi feita por meio do ensaio de ativação química da expressão gênica da luciferase (CALUX) mediante a presença de um AhR. Engwall et al. (1999) também relataram, por meio do ensaio de EROD em cultura de fígado de embrião de galinha, a presença desse tipo de atividade em todas as frações diaromática e poliaromática dos extratos de LE provenientes de 8 ETEs da Suécia. A detecção de atividade do tipo *dioxin-like* em LE, avaliada por meio do ensaio com leveduras recombinantes, também foi relatada por outros autores (BADIA-FABREGAT et al., 2012; KAPANEN et al., 2013), indicando a sensibilidade do teste para esse tipo de amostra.

Nossos estudos com leveduras (RYA-YCM) mostraram que a amostra do tempo 0 apresentou uma menor resposta em relação ao tempo 2, tanto para o extrato orgânico como para o aquoso. Acreditamos que esta resposta possa ser explicada pela possível indisponibilidade de parte dos compostos com atividade *dixon-like* na primeira etapa de biorremediação (tempo 0). Para o tempo de 2 meses, já houve uma bioatividade, mostrando que estes compostos apresentaram-se biodisponíveis. Pelos nossos resultados podemos inferir que a degradação só ocorreu a partir do sexto mês de atenuação natural. Badia-Fabregat et al. (2012) também observaram um aumento da resposta da atividade *dioxin-like* em LE, superior

a duas vezes o valor inicialmente encontrado, após biodegradação fúngica, possivelmente em decorrência da bio-ativação dos compostos presentes neste LE pelo fungo empregado no processo.

No entanto, pelos resultados obtidos a partir do ensaio com leveduras recombinantes, é possível observar que o processo de biorremediação utilizado neste estudo colaborou para eliminação da atividade estrogênica do LE, bem como para a diminuição da sua resposta para *dioxin-like*. Nossos dados são concordantes com os de Kapanen et al. (2013), que também observaram que processos de biorremediação do LE, como a compostagem, podem eliminar seu potencial estrogênico e contribuir para a degradação da maioria dos compostos capazes de se ligarem ao AhR.

Embriões de *D. rerio* são comumente utilizados para ensaios de embriotoxicidade, pois os ovos dessa espécie permanecem transparentes desde a fecundação até a fase de faríngula (quando os tecidos se tornam densos e é iniciada a pigmentação), o que facilita a observação das principais alterações morfológicas, durante as etapas iniciais de desenvolvimento (SELDERSLAGHS et al., 2009).

O efeito do LE também foi avaliado em embriões de peixes marinhos por Costello e Gamble (1992). Os autores observaram que concentrações de 0,1 a 1,0% de LE na água do mar causaram um efeito tóxico (mortalidade e alteração no período de eclosão dos ovos) significativo para embriões de arenque (*Clupea harengus*) e de bacalhau (*Gadus morhua*).

Assim como em nosso ensaio, os estudos realizados por Gustavsson et al. (2007) com amostras de LE industrial contaminado com compostos nitroaromático mostraram efeitos embriotóxicos para *D. rerio*. Os autores também observaram um maior índice de toxicidade para o extrato orgânico cetônico obtido por soxhlet. Segundo Burton (1991), os extratos cetônicos extraem uma maior parte dos componentes tóxicos presente nas amostras sólidas, superestimando a biodisponibilidade real dos poluentes presentes. Nossos dados também mostraram uma maior biotoxicidade para os ensaios realizados com os extratos orgânicos, quando comparados com os aquosos, confirmando assim, as conclusões de Burton (1991). Gustavsson et al. (2007) também avaliaram o potencial embriotóxico de LE provenientes de wetlands construídos em pequena escala, na presença e ausência de cobertura vegetal. Os autores observaram que para os ensaios com o resíduo sólido bruto (ensaio de contato), não houve toxicidade registrada quando estes foram desenvolvidos com presença de cobertura vegetal. Porém, foi obervado um índice de citotoxicidade de 25% para a concentração mais alta testada (200 mg/mL), quando o experimento foi realizado com ausência de cobertura vegetal. Em relação à água percolada, não foi observada nenhuma mortalidade, mas sim um

atraso na eclosão das larvas (após 72 h para a água decorrente dos wetlands com cobertura vegetal e 96 horas para a água decorrente dos wetlands sem cobertura vegetal). Os autores sugeriram que essa diminuição na toxicidade do LE possa ser decorrente de vários fatores associados como biodegradação, lixiviação e/ou absorção dos contaminantes pelas plantas.

Um efeito embriotóxico de LE de origem urbana também foi observado por Chenon et al. (2003) em embriões do anfíbio *Xenopus laevis*, evidenciando que esse resíduo pode ser prejudicial para estes organismos.

Os resultados obtidos em nossos estudos sugerem que o LE avaliado é potencialmente tóxico para embriões de *D. rerio*, mas que esse efeito é inversamente proporcional ao aumento do período da atenuação natural.

Neste estudo, o LE induziu níveis elevados de CYP1A em embriões de *D. rerio* expostos aos diferentes extratos testados (Tabela 7). A exposição de peixes da espécie *Pimephales promelas* a biossólido, nas concentrações de 0,5 e 2,5 g/L, também induziu um aumento nos níveis de CYP1A, evidenciando que a introdução de LE contaminado com substâncias tóxicas no ambiente pode afetar diretamente os organismos aquáticos, acarretando, inclusive, em alterações nos níveis de expressão gênica dos organismos expostos (SULLIVAN et al., 2007).

Sabe-se que aumentos na expressão do gene CYP1A em embriões de *D. rerio* estão relacionados com a exposição a compostos com capacidade de se ligarem ao AhR (VOELKER et al., 2007). Além disso, este receptor representa uma sequência altamente conservada entre várias espécies de vertebrados (BANK et al., 1992). Os resultados observados neste estudo para os ensaios de YCM-RYA e de expressão gênica indicaram que as amostras iniciais de LE (0 e 2 meses) apresentaram compostos capazes de interagir com o AhR e induzir altos níveis de respostas biológicas. Contudo, os ensaios realizados com as amostras de LE de 6 e 12 meses de atenuação natural indicaram que houve um considerável decaimento da presença de substâncias com capacidade de se ligarem ao AhR.

A detecção deste tipo de atividade não pode ser somente justificada pela presença dos compostos identificados em altas concentrações nas análises químicas (como o *m*-, *p*-cresol; dioxinas e furanos). Por sua própria estrutura química, o cresol não se enquadra nos grupos de ligantes do AhR.

O cresol foi avaliado quanto à sua habilidade de se ligar ao AhR por meio da indução da atividade enzimática do CYP1A, mas nenhum efeito foi observado (LETCHER et al., 2005). Adicionalmente, Engwall et al. (1999) relataram uma ausência de resposta para CYP1A para a fração de compostos monoaromáticos e alifáticos presentes em extratos de LE.

Os efeitos embriotóxicos ocasionados pelas amostras de LE e a falta de correspondência entre os efeitos ocasionados pelo cresol também indica que o cresol não é a única substância a ser considerada para o desencadeamento do efeito tóxico observado.

Como os efluentes domésticos constituem uma importante fonte de dioxinas e furanos (HORSTMANN; MCLACHLAN, 1995), esses compostos podem ficar retidos no LE após o tratamento de esgoto. As dioxinas e furanos também foram encontradas no LE aqui estudado, porém em baixas concentrações, não induzindo assim respostas biológicas. Além disso, embora as análises químicas confirmassem um aumento na quantidade de dioxinas e furanos, em relação ao aumento do tempo de atenuação, houve uma resposta biológica decrescente do menor para o maior tempo de atenuação natural do LE.

Esses resultados sugerem que, possivelmente, sejam outros compostos não identificados pela análise química que estejam relacionadas com a indução do efeito observado. Adicionalmente, pelo LE ser uma matriz complexa, podem estar ocorrendo diferentes efeitos (antagônicos, aditivos ou sinérgicos), decorrentes de interações químicas entre as diferentes substâncias presentes neste resíduo (OLESZCZUK, 2008).

De maneira geral, ambos os extratos testados apresentaram respostas semelhantes para os diferentes parâmetros avaliados, isto é, com respostas elevadas para os primeiros tempos de disposição do LE e posterior redução desses valores, a medida que se aumenta o tempo de atenuação natural. A presença, nos extratos aquosos, de compostos capazes de se ligarem ao AhR, ou ocasionarem um efeito tóxico nos organismos expostos, indica que a disposição do LE no solo pode ocasionar a dispersão desses poluentes também para as águas subterrâneas, já que esses compostos são solúveis em água e podem percolar para as camadas mais profundas, por carreamento pelas águas pluviais. De acordo com Tewari et al. (2005), o lixiviado de LE urbanos constitui uma mistura heterogênea, podendo conter tanto metais como uma ampla variedade de substâncias orgânicas que, mesmo quando presentes em concentrações muito pequenas, pode ocasionar, por ação conjunta, um efeito prejudicial aos organismos expostos. Dessa forma, o decaimento na toxicidade do LE poderia ser devido à possível percolação das substâncias presentes no LE, durante o período de disposição das amostras em ambiente aberto. No entanto, o decréscimo de substâncias potencialmente ativas no extrato orgânico, ao longo do tempo, indica uma possível degradação desses contaminantes, já na própria amostra bruta do LE.

Alertamos para a necessidade de se identificar compostos emergentes no LE, antes de sua disposição no ambiente, pois, mesmo após uma análise química rigorosa de uma ampla variedade de substâncias como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, agrotóxicos

organocorados, benzenos clorados, ésteres de ftalatos, indicando a ausência dessas substâncias, ainda foi observado um efeito significativo para o LE estudado. Assim, como o LE pode conter muitos compostos diferentes e uma identificação química de todos esses compostos se torna inviável (CHENON et al., 2003), o uso de ensaios biológicos que permitam a identificação de determinados grupos químicos contribui para uma melhor caracterização da atividade biológica do LE.

5. CONCLUSÃO

Devido às diferentes respostas observadas do LE nos diferentes bioensaios realizados, pode-se concluir que o LE estudado apresenta uma composição bastante variada e complexa, que pode causar efeitos prejudiciais aos organismos expostos. A disposição deste LE, sem a realização de um tratamento de remoção de seus contaminantes tóxicos, pode contribuir para uma contaminação direta do solo, bem como para a dispersão desses poluentes para as águas superficiais e subterrâneas, uma vez que o extrato aquoso obtido das amostras de LE, indicaram a presença de substâncias capazes de induzir respostas relacionadas ao receptor Ah, além de serem também embriotóxicas. Respostas similares às encontradas para o extrato aquoso também foram observadas para o extrato orgânico, porém os efeitos foram um pouco mais pronunciados. Embora uma atividade estrogênica tenha sido detectada no extrato aquoso, seu baixo valor não parece ser motivo de preocupação.

No entanto, a metodologia empregada para a detoxificação deste LE parece ser eficiente na diminuição da presença de possíveis contaminantes com efeitos biotóxicos. Uma melhora em sua toxicidade já pode ser observada a partir de 6 meses de biorremediação, comprovando ser uma ferramenta eficiente para o processo de detoxificação do LE, além de ser um método de baixo custo.

A realização de um conjunto de bioensaios para a detecção do potencial tóxico do LE fornece resposta valiosas, complementando as informações obtidas pelas análises químicas.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Processo No. 2009/09665-0 pelo suporte financeiro e à empresa Foz de Rio Claro pelo fornecimento do lodo de esgoto utilizado neste estudo.

7. REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 10006*: **Procedimento para**

obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro, 2004.

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

BANK, P.A.; YAO, E.F.; PHELPS, C.L.; HARPER, P.A.; DENISON, M.S. Species-specific binding of transformed Ah receptor to a dioxin responsive transcriptional enhancer. **European Journal of Pharmacology** - Environmental Toxicology and Pharmacology Section, v.228, p.85-94, 1992.

BHUPATHIRAJU, V. K., KRAUTER, P., HOLMAN, H.-Y. N., CONRAD, M. E., DALEY, P. F., TEMPLETON, A. S., HUNT, J. R., HERNANDEZ, M. AND ALVAREZ-COHEN, L.: Assessment of *in situ* bioremediation at a refinery waste-contaminated site and an aviation gasoline contaminated site. **Biodegradation**, v.13, p.79-90, 2002.

BURTON, G.A. Assessing the toxicity of freshwater sediments. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.10, p.1585-1627, 1991.

CHENON, P.; GAUTHIER, L.; LOUBIÈRES, P.; SÉVERAC, A.; DELPOUX, M. Evaluation of the genotoxic and teratogenic potential of a municipal sludge and sludge-amended soil using the amphibian *Xenopus laevis* and the tobacco: *Nicotiana tabacum* L. var. *xanthi* Dulieu. **The Science of the Total Environment**, v.301, p.139-150, 2003.

CINCINELLI, A.; MARTELLINI, T.; MISURI, L.; LANCIOTTI, E.; SWEETMEN, A.; LASCHI, S.; PALCHETTI, I. PBDEs in Italian sewage sludge and environmental risk of using sewage sludge for land applications. **Environ. Poll.** v.161, p.229-243, 2012.

CLARKE, B.O; SMITH, S.R. Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. **Environmental International**, v.37, p.226-247, 2011.

COSTELLO, M.J.; GAMBLE, J.C. Effects of sewage sludge on marine fish embryos and larvae. **Marine Environmental Research**, v.33, p.49-74, 1992.

DOMENE X.; RAMÍREZ W.; MATTANA S.; ALCAÑIZ J.M.; ANDRÉS P. Ecological risk assessment of organic waste amendments using the species sensitivity distribution from a soil organisms test battery. **Environ Pollut.**, v.155, p.227-236, 2008.

ENGWALL, M.; BRUNSTRÖM, B.; NÄF, C.; HJELM, K. Levels of dioxin-like compounds in sewage sludge determined with a bioassay based on EROD induction in chicken embryo liver cultures. **Chemosphere**, v.38, p.2327-2343, 1999.

ENGWALL, M.; HJELM, K. Uptake of dioxin-like compounds from sewage sludge into various plant species - assessment of levels using a sensitive bioassay. **Chemosphere**, v.40, p.1189-1195, 2000.

ERIKSEN, G.; AMUNDSEN, C.; BERNDORF, A.; EGGEN, T.; GRAVE, K.; HALLING-SØRENSEN, B.; KAĽLQVIST, T.; SOGN, T.; SVERDRUP, L. Risk assessment of contaminants in sewage sludge applied on Norwegian soils. **Norwegian Scientific Committee for Food Safety**, p.1−244, 2009.

FERNANDEZ, M.P.; NOGUEROL, T.N.; LACORTE, S.; BUCHANAN, I.; PIÑA, B. Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.393, p.957-968, 2009.

GIBSON, R.; WANG, M.J.; PADGETT, E.; BECK, A.J. Analysis of 4-nonylphenols, phthalates, and polychlorinated biphenyls in soils and biosolids. **Chemosphere**, v.61, p.1336-1344, 2005.

GIUDICE, B.D.; YOUNG, T.M. Mobilization of endocrine-disrupting chemicals and estrogenic activity in simulated rainfall runoff from land-applied biosolids. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.30, p.2220-2228, 2011.

GUSTAVSSON, L.; HOLLERT, H.; JÖNSSON, S.; VAN BAVEL, B.; ENGWALL, M. Reed beds receiving industrial sludge containing nitroaromatic compounds. Effects of outgoing water and bed material extracts in the umu-C genotoxicity assay, DR-CALUX assay and on early life stage development in Zebrafish *(Danio rerio)*. **Env. Sci. Pollut. Res.**, v.14, p.202-211, 2007.

HALLARE, A.; KOSMEHL, T.; SCHULZE, T.; HOLLERT, H.; KOEHLER, H.R., TRIEBSKORN, R. Assessing the severity of sediment contamination in Laguna Lake, Philippines using a sediment contact assay with Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Sci. Total Environ.**, 347, 254–271, 2005.

HARRISON, E.Z.; OAKES, S.R.; HYSELL, M.; HAY, A. Organic chemicals in sewage sludges. **Science of Total Environment**, v.367, p.481-497, 2006.

HILSCHEROVA, K.; MACHALA, M.; KANNAN, K.; BLANKENSHIP, A.L.; GIESY. J.P. Cell bioassays for detetcion of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity inenvironmental samples. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v.7, p. 159-171, 2000.

HORSTMANN, M., MCLACHLAN, M.C. Concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD) and dibenzofurans (PCDF) in urban runoff and household wastewaters. **Chemosphere**, 31, 2887-2896, 1995.

ISO, 15088:2007. **Water quality – determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)**. 2007.

KAPANEN, A.; VIKMAN, M.; RAJASÄRKKÄ, J.; VIRTA, M.; ITÄVAARA, M. Biotests for environmental quality assessment of composted sewage sludge. **Waste Management**, v.33, p.1451–1460, 2013.

LETCHER, R.J.; SANDERSON, J.T.; BOKKERS, A.; GIESY, J.P.; VAN DER BERG, M. Effects of bisphenol A-related diphenylalkanes on vitellogenin production in male carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes and aromatase (CYP19) activity in human H295R adrenocortical carcinoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.209, p.95-104, 2005.

LORENZEN, A.; HENDEL, J.G.; CONN, K.L.; BITTMAN, S.; KWABIAH, A.B.; LAZAROVITZ, G.; MASSÉ, D.; MCALLISTER, T.A.; TOPP, E. Survey of hormone activities in municipal biosolids and animal manures. **Environmental Toxicology**, v.19, p.216-225, 2004.

MILLER, C.A. Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.32824–32829, 1997.

MILLS, M.A.; BONNER, J.S.; MCDONALD, T.J.; PAGE, C.A.; AUTENRIETH, R.L. Intrinsic bioremediation of a petroleum-impacted wetland. **Marine Pollution Bulletin**, v.46, p.887-899, 2003.

MURK, A.J.; LEGLER J, VAN LIPZIG MMH, MEERMAN JHN, BELFROID AC, SPENKELINK A, VAN DER BURG B, RIJS GBJ, VETHAAK D. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.21, p.16-23, 2002.

NOGUEROL, T.N.; BORONAT, S.; CASADO, M.; RALDÚA, D.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.385, p.1012-1019, 2006a.

NOGUEROL, T.N.; BORONAT, S.; JAQUE, S.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. **Talanta**, v.69, p.351-358, 2006b.

OLESZCZUK, P. Forms of polycyclic aromatic hydrocarbon in the formation of sewage sludge toxicity to *Heterocypris incongruens*. **Science of Total Environment**, v.404, p.94-102, 2008.

OLIVARES, A.; VAN DROOGE, B.L.; CASADO, M.; PRATS, E.; SERRA, M.; VAN DER VEN, L.T.; KAMSTRA, J.H.; HAMERS, T.; HERMSEN, S.; GRIMALT, J.O.; PIÑA, B. Developmental effects of aerosols and coal burning particles in zebrafish embryos. **Environmental Pollution**, v.178, p. 72-79, 2013.

PATHAK, A.; DASTIDAR, M.G.; SREEKRISHNAN, T.R. Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: A review. **Journal of Environmental Management**, v.90, p.2343-2353, 2009.

PIÑA, B.; BORONAT, S.; CASADO, M.; OLIVARES, A. Recombinant teast assys and gene expression assays for the analysis of endocrine disruption. **Hdb. Env. Chem.**, v.5J, p.69-113, 2009.

RAMÍREZ W.A.; DOMENE X.; ORTIZ O.; ALCAÑIZ J.M. Toxic effects of digested, composted and thermally-dried sewage sludge on three plants. **Bioresour. Technol**., v.99, p.7168-7175, 2008.

RATHOD, P.H.; PATEL, J.C.; SHAH, M.R.; JHALA, A.J. Recycling gamma irradiated sewage sludge as fertilizer: A case study using onion (*Alium cepa*). **Applied Soil Ecology**, v.41, p.223-233, 2009.

ROIG, N.; SIERRA, J.; NADAL, M.; NAVALÓN-MADRIGAL, P.; SCHUHMACHER, M.; DOMINGO, J.L. Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants. **Science of Total Environment**, v.425, p.99-109, 2012.

SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; MIGUEL, E.; TADEO, J.L. Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid. **Journal of Chromatography A**, v.1148, p.219-227, 2007.

SELDERSLAGHS, I.W.T.; VAN ROMPAY, A.R.; COEN, W.D.; WITTERS, H.E. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. **Reproductive Toxicology**, v.28, p.308-320, 2009.

SULLIVAN, C.; MITCHELMORE, C.L.; HALE, R.C.; VAN VELD, P.A. Induction of CYP1A and DNA damage in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to biosolids. **Science**

of the Total Environment, v.384, p.221-228, 2007.

TAS, D.O. Respirometric assessment of aerobic sludge stabilization. **Bioresource Technology**, v.101, p.2592-2599, 2010.

TEWARI, A.; CHAUHAN, L.K.S.; KUMAR, D.; GUPTA, S.K. Municipal sludge leachate-induced genotoxicity in mice – a subacute study. **Mutation Research**, v.587, p.9-15, 2005.

URASE, T.; KIKUTA, T. Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. **Water Research**, v.39, p.1289-1300, 2005.

USEPA. - U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTIONAGENCY. **Standard Method 3540C,** Soxhlet Extraction. 2008. Disponível em: <http://www.epa.gov/epawaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf> Acesso em junho de 2011.

VOELKER D.; STETEFELD, N.; SCHIRMER, K.; SCHOLZ, S. The role of *cyp1a* and heme oxygenase 1 gene expression for the toxicity of 3,4-dichloroaniline in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aquatic Toxicology**, v.86, p.112-120, 2008.

VOELKER, D., VESS, C., TILLMANN, M., NAGEL, R., OTTO, G., GEISLER, R., SCHIRMER, K., SCHOLZ, S. Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae. **Aquatic Toxicology**, v.81, p.355-364, 2007.

ZHANG, T.; YU, G.; WANG, B.; FIELDER, H.; HUANG, J.; DENG, S. Bioanalytical characterization of dioxin-like activity in sewage sludge from Beijing, China. **Chemosphere**, v.75, p.649-653, 2009.

ZOTOS, G.; KARAGIANNIDIS, A.; ZAMPETOGLOU, S.; MALAMAKIS, A.; ANTONOPOULOS, I.S.; KONTOGIANNI, S.; TCHOBANOGLOUS, G. Developing a holistic strategy for integrated waste management within municipal planning: Challenges, policies, solutions and perspectives for Hellenic municipalities in the zero-waste, low-cost direction. **Waste Manag**., v.29, p.1686-1692, 2009.

ZULOAGA, O.; PRIETO, A; AHMED, K.; SARKAR, S.K.; BHATTACHARYA, A.; CHATTERJEE, M.; BHATTACHARYA, B.D.; SATTPATHY, K.K. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments of Sundarban mangrove wetland of India and Bangladesh: a comparative approach. **Environ. Earth. Sci.**, v.68, p.355-367, 2013.

Tabela 1. Caracterização química do LE, após diferentes períodos de biorremediação.

Parâmetro	Unidade	Amostra Inicial	Amostra 2 meses	Amostra 6 meses	Amostra 12 meses
1,2,3-Triclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,3,5-Triclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,2,4-Triclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,2-Diclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,3-Diclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,4-Diclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,2,3,4-Tetraclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,2,4,5-Tetraclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,2,3,5-Tetraclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Di-N-Butilftalato	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Dimetilftalato	µg/kg	ND	ND	ND	ND
2,4-Diclorofenol	µg/kg	ND	ND	ND	ND
2,4,6-Triclorofenol	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Pentaclorofenol	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Benzo(a)antraceno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Benzo(a)pireno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Benzo(k)fluoranteno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Indeno(1,2,3-cd)pireno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Naftaleno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Fenantreno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Hexaclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
m,p-Cresol	µg/kg	276.089,8	256.743,4	ND	ND
o-Cresol	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Bis[2-Etilexil]ftalato	µg/kg	ND	117.154,0	ND	ND
Heptacloro	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Aldrin	µg/kg	ND	ND	ND	ND
g-BHC	µg/kg	ND	ND	ND	ND
a-Clordano	µg/kg	ND	ND	ND	ND
g-Clordano	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Dieldrin	µg/kg	ND	ND	ND	ND
DDT	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Endrin	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Toxafeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Mirex	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Fósforo Total	mg/kg	3.756,1	13.645,8	11.235,8	8997,8
Potássio Total	mg/kg	678,8	1.787,2	1.519,5	1.140,0
Sódio Total	mg/kg	296,7	1.532,7	1.179,1	384,8
Enxofre Total	mg/kg	6.089,0	17.961,3	17.561,0	13.589,3
Cálcio Total	mg/kg	4.302,7	15.937,5	16.284,6	11473,2
Magnésio Total	mg/kg	989,8	3.671,1	3.094,9	2354,9
Arsênio Total	mg/kg	ND	ND	ND	ND
Bário Total	mg/kg	100,8	356,1	388,9	370,8
Cádmio Total	mg/kg	ND	ND	ND	ND
Chumbo Total	mg/kg	13,9	45,0	45,1	45,4
Cobre Total	mg/kg	66,7	202,1	234,6	223,0
Cromio Total	mg/kg	36,7	66,8	35,7	39,8
Mercúrio Total	mg/kg	0,202	ND	ND	0,675

Tabela 1 (continuação)					
Molibdênio Total	mg/kg	2,27	11,4	7,34	5,54
Níquel Total	mg/kg	7,45	20,7	23,7	17,6
Zinco Total	mg/kg	233,0	818,7	922,5	785,0
Total de Dioxinas	ng/kg	269,237	622,8792	884,16	975,5
Total de Furanos	ng/kg	74,575	135,0086	101,66	139,96

ND: não detectado; NE: parâmetro com valores não estabelecidos.

Tabela 2. Análise da presença de cresol em extratos aquosos de LE proveniente de diferentes períodos de biorremediação.

Parâmetro	Unidade	Amostra Inicial	Amostra 2 meses	Amostra 6 meses	Amostra 12 meses
m-, p-Cresol	mg/L	3,70	4,21	0,78	0,06

Tabela 3. Valores da atividade estrogênica (17β-estradiol equivalente) de extratos de lodo esgoto avaliados por ER-RYA.

Extrato	Amostra	AEE2 (ug/L)	AEE2/LE (ng/g)
Orgânico	L0	Tóxico	Tóxico
	L2	Tóxico	Tóxico
	L6	Tóxico	Tóxico
	L12	Tóxico	Tóxico
Solubilizado	L0	0,66 (0,42 - 1,04)	5,30
	L2	0,39 (0,31 - 0,51)	3,15
	L6	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00
	L12	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00

AEE2: atividade equivalente da amostra em relação ao 17 β -estradiol; **AEE2/LE:** atividade equivalente de 17 β -estradiol presente em 1 g de LE testado.

Tabela 4. Valores da atividade *dioxin-like* (β-naftoflavona equivalente) de extratos de lodo esgoto avaliados por YCM-RYA.

Extrato	Amostra	CE (g/L)	AE BNF (ug/L)	µgBNF/gLodo	Decaimento (%)[a]
Orgânico	L0	500	3903,56 (2937,85 - 5186,72)	7,81	-
	L2	500	10847,23 (9052,69 - 12997,52)	21,69	-
	L6	910	14505,77 (12574,41 - 16733,76)	15,94	26,51
	L12	1000	4483,33 (3434,51 - 5852,44)	4,48	79,35
Aquoso	L0	125	535,56 (427,53 - 670,88)	4,28	-
	L2	125	2199,83 (1506,335 - 3212,57)	17,60	-
	L6	125	118,95 (88,68 - 159,54)	0,95	94,60
	L12	125	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00	100

AEBNF: atividade equivalente da amostra em relação à β-naftoflavona; **AEE2/LE:** atividade equivalente da β-naftoflavona presente em 1 g de LE testado.
[a]porcentagem de decaimento em relação a amostra com maior atividade *dioxin-like*.

Figura 1. Sequência do desenvolvimento de *D. rerio*, nas primeiras 72 horas.

Figura 2. Alterações observadas nas fases embrio-larvais de *D. rerio* após exposição a extratos aquosos de LE, a m-cresol e a p-cresol. A. Embriões de 48h com diferença no padrão de pigmentação induzida pela exposição ao cresol (embrião despigmentado); **B.** e **C.** Indivíduos mortos em decorrência da exposição ao LE e ao cresol; **D.** Eleuteroembrião apresentando edema no saco vitelínico induzido pela ação do LE e do cresol (seta); **E.** Eleuteroembrião com malformação da cauda induzida pela ação do LE e do cresol (seta); **F.** Eleuteroembriões de mesma idade com diferentes padrões de pigmentação. CN: Controle negativo – padrão normal de pigmentação; C: cresol – alteração no padrão de pigmentação (despigmentação); m-C: despigmentação induzida pelo m-cresol; p-C: despigmentação induzida pelo p-cresol.

Tabela 5. Efeito embriotóxico observado para o organismo teste *D. rerio* exposto a diferentes extratos de LE.

Extrato	Amostra	LE (g/mL)	C (mg/L)	M (%)	D (%)	NE (%)	T (%)
Orgânico	CN			1,72	0,00	3,45	5,17
	L0	1,00	0,276	100,00	0,00	0,00	100,00
		0,30	0,083	8,33	0,00	25,00	33,33
		0,10	0,028	0,00	0,00	0,00	0,00
	L2	1,00	0,276	100,00	0,00	0,00	100,00
		0,30	0,083	33,33	0,00	8,33	41,67
		0,10	0,028	0,00	0,00	8,33	8,33
	L6	1,00	0,276	0,00	0,00	0,00	0,00
		0,30	0,083	0,00	0,00	8,33	8,33
		0,10	0,028	8,33	8,33	0,00	16,67
	L12	1,00	0,276	0,00	0,00	0,00	0,00
		0,30	0,083	0,00	0,00	0,00	0,00
		0,10	0,028	8,33	0,00	0,00	8,33
Aquoso	CN			0,00	1,00	3,50	4,50
	L0	31,25	0,925	100,00	0,00	0,00	100,00
		6,25	0,185	100,00	0,00	0,00	100,00
		2,5	0,074	40,00	0,00	14,00	54,00
	L2	31,25	1,0525	100,00	0,00	0,00	100,00
		6,25	0,2105	30,00	2,00	12,00	44,00
		2,5	0,0842	0,00	0,00	2,00	2,00
	L6	31,25	0,195	100,00	0,00	0,00	100,00
		6,25	0,039	0,00	0,00	0,00	0,00
		2,5	0,0156	0,00	0,00	0,00	0,00
	L12	31,25	0,015	2,00	6,00	4,00	12,00
		6,25	0,003	0,00	0,00	2,00	2,00
		2,5	0,0012	0,00	0,00	24,00	24,00

LE: concentração testada de lodo de esgoto; **C**: concentração de cresol máxima estimada presente em cada amostra; **M**: mortalidade; **D**: deformidade; **NE**: não eclosão; **T**: soma total de todas as alterações tóxicas encontradas.

Tabela 6. Efeito embriotóxico observado para o organismo teste *D. rerio* exposto a diferentes concentrações de m-cresol e p-cresol.

Substância	C (mg/L)	M (%)	D (%)	NE (%)	T (%)
M-Cresol	250	100,00	0,00	0,00	100,00
	125	16,67	8,33	75,00	100,00
	62,5	0,00	83,33	16,67	100,00
	31,5	0,00	0,00	33,33	33,33
	20,0	0,00	25,00	0,00	25,00
	15,615	0,00	0,00	16,67	16,67
	10,0	0,00	0,00	0,00	0,00
	3,0	0,00	0,00	0,00	0,00
	1,0	0,00	0,00	0,00	0,00
P-Cresol	250	100,00	0,00	0,00	100,00
	125	100,00	0,00	0,00	100,00
	62,5	8,33	58,33	33,33	100,00
	31,5	0,00	50,00	50,00	100,00
	20,0	0,00	91,67	0,00	91,67
	15,615	16,67	75,00	8,33	100,00
	10,0	0,00	50,00	0,00	50,00
	3,0	0,00	0,00	0,00	0,00
	1,0	0,00	0,00	8,33	8,33

C: concentração de cresol testada; **M**: mortalidade; **D**: deformidade; **NE**: não eclosão; **T**: soma total de todas as alterações tóxicas encontradas.

Tabela 7. Indução da expressão de CYP1A no organismo teste *D. rerio*, após exposição ao LE com diferentes períodos de biorremediação.

Extrato	Amostra	CE (g/L)	UA/gLodo	Decaimento (%)[a]
Orgânico	L0	500	127285,84	-
	L2	500	135479,25	-
	L6	910	40114,77	70,39
	L12	1000	32672,39	75,88
Aquoso	L0	125	2200,87	-
	L2	125	2185,97	0,677
	L6	125	696,65	68,347
	L12	125	463,49	78,941

[a]porcentagem de decaimento em relação ao maior valor observado por extrato.

Artigo 5. O uso de *Eisenia andrei* como bioindicadora dos efeitos do lodo de esgoto após diferentes períodos de atenuação natural monitorada

RESUMO

Devido ao crescente aumento na geração de lodo de esgoto (LE), intensos esforços vêm sendo feitos para se conseguir tecnologias adequadas que levem a uma detoxificação desse resíduo e, assim, seu aproveitamento como recondicionante de solos agrícolas. Minhocas da espécie *Eisenia andrei* são organismos testes importantes para serem usados em ensaios que envolvam análise de contaminação de solo, pois são muito sensíveis à ação de contaminantes. Organismos da espécie *E. andrei* foram empregados na avaliação do potencial do tóxico do LE de origem doméstica e de associações de solo/LE, após diferentes períodos de atenuação natural monitorada (0, 2, 6 e 12 meses). Foram avaliados neste estudo, após cada período de atenuação, os parâmetros de mortalidade, massa corpórea e alterações histopatológicas no intestino. Nos dois primeiros períodos de atenuação natural (0 e 2 meses), a amostra de LE 100% induziu um efeito letal severo. Possivelmente esse efeito seja decorrente da presença de altas concentrações de *m*- e *p*-cresol observada no LE. No entanto, após 6 meses de atenuação natural esse efeito não foi mais observado. Alterações na massa corpórea dessa espécie parecem ser decorrentes diretamente da presença de matéria orgânica disponível nas amostras. Assim, foi observado, nos tempos iniciais, que as amostras não tóxicas apresentavam uma maior quantidade de LE e favoreceram o aumento do peso corpóreo dos organismos. Todas as amostras testadas induziram alterações teciduais e celulares no revestimento intestinal, bem como as células cloragógenas, representadas por espessamento do epitélio, vacuolização citoplasmática e núcleo picnótico. Dessa forma, o LE caracteriza-se em um resíduo potencialmente tóxico para a espécie *E. andrei*, devendo passar por um processo de detoxificação antes de ser disposto no ambiente.

Palavras chave: minhoca, contaminação de solo, histopatologia, massa corpórea, epitélio intestinal, biorremediação.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de macroinvertebrados que habitam o solo, as minhocas estão entre os grupos mais abundantes, representando mais de 80% da macrofauna edáfica (BARTLETT et al., 2010; GUPTA; CHAKRAVORTY; KAVIRAJ, 2011; VELKI; HACKENBERGER, 2013). Esses invertebrados são encontrados em uma ampla diversidade de solos e em diferentes profundidades (LANNO et al., 2004).

As minhocas são consideradas organismos chaves para estudos ecotoxicológicos de ambientes terrestres contaminados, pois desempenham um importante papel na funcionalidade e estrutura do solo, favorecendo sua aeração e atuando na decomposição e ciclagem de nutrientes (KILIÇ, 2011; KINNEY et al., 2012). Além disso, como as minhocas ingerem grandes quantidades de solo (LEE, 1985), elas podem ser expostas aos contaminantes presentes neste ambiente tanto externamente por via dérmica, como, internamente, por via digestória (LAPIED et al., 2011). O acúmulo de substâncias tóxicas por esses organismos também acarreta em uma outra importante preocupação, pois, como os anelídeos são presas de uma grande variedade de espécies, eles podem contribuir para uma bioconcentração de contaminantes ao longo da cadeia trófica (GOBI; GUNASEKARAN, 2010).

A espécie *E. andrei* vem sendo constantemente empregada na avaliação de contaminações ambientais, por apresentar alta sensibilidade a químicos, por constituírem ensaios padronizados e de fácil manutenção (LACHANCE et al., 2004; MOREIRA; SOUSA; CANHOTO, 2008; CHELINHO et al., 2010; GRUMIAUX et al., 2010; BELMESKINE et al., 2012; VELKI; HACKENBERGER, 2013).

Alterações histopatológicas, realizadas com minhoca, trazem informações bastante relevantes dos efeitos sub-letais de compostos químicos sobre estes organismos, principalmente aqueles decorrentes da poluição de solos (KILIÇ, 2011). Os ensaios histopatológicos podem ainda ser realizados em diferentes tecidos alvos.

Aplicação de LE em solos agrícolas vem se tornando uma prática comum, em diversos países. No entanto, apesar do LE ser rico em matéria orgânica e nutrientes inorgânicos, ele pode ser fonte de substâncias tóxicas que, quando presentes no ambiente podem causar efeitos danosos aos organismos expostos (HARRISON et al., 2006; OLOFSSON; BIGNERT; HAGLUND, 2012), especialmente para os macroinvertebrados terrestres como as minhocas (KINNEY et al., 2012). Desse modo, vem sendo sugerida a realização de processos de descontaminação do LE, antes do mesmo ser disponibilizado em solos agrícolas (WALTER; MARTÍNEZ; CALA, 2006).

Dessa forma, foram utilizadas como bioindicadores nas nossas avaliações toxicológicas, minhocas da espécie *E. andrei* para a verificação do efeito biológico de LE de origem doméstica, antes e após diferentes períodos de atenuação natural monitorada. Para isso, foram avaliados os parâmetros de mortalidade, alterações na massa corpórea e alterações histopatológicas no intestino dessa espécie, nas diferentes etapas da biorremediação. Além disso, este estudo também permitiu compreender os efeitos do LE sobre as minhocas, quando este é aplicado como recondicionante de solos agrícolas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras de lodo

O material utilizado neste estudo consistiu de um LE anaeróbio centrifugado coletado em uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) localizada em Rio Claro/São Paulo (Brasil), a qual recebe esgotos de origem exclusivamente doméstica.

Dentre todos os parâmetros químicos exigidos pela Resolução CONAMA n° 375 de 2006 (BRASIL, 2006) para a disposição do LE em solos agrícolas, o LE utilizado apresentou valores acima dos estabelecidos pela legislação somente para o *m*- e *p*-cresol, além da presença de dioxinas e furanos (Tabela 1).

Após a coleta, uma parte das amostras foi associada com solo nas proporções de 10/90%; 25/75%; e 50/50% de LE /solo (v/v). Este solo possuía uma concentração de matéria orgânica de 26 g/kg, apresentava uma textura argilosa, com 79 g/kg de silte, 469 g/kg de areia total e 100 g/kg de argila com água e 451 g/kg de argila com dispersante, bem como uma condutividade elétrica de 146,7 dS/m.

As associações de LE/solo e as amostras de LE 100% foram dispostas em sacos plásticos perfurados (furos de 0,5 mm de diâmetro e espaçamento de 1 cm entre eles) em covas feitas em um ambiente livre de contaminação, onde permaneceram por períodos de 2, 6 e 12 meses, para estimular uma possível descontaminação do LE, pelo processo de atenuação natural monitorada.

2.2. Teste de toxicidade aguda *Eisenia andrei* (OECD 207, 1984)

O teste de toxicidade aguda foi desenvolvido com indivíduos adultos (clitelados) da espécie oligoqueta *E. andrei*, de idade e pesos semelhantes. Para promover a liberação dos conteúdos gastrointestinais, 24h antes da realização do experimento, as minhocas foram colocadas em um recipiente contendo sílica úmida com esferas de vidro.

Após ajuste da capacidade de campo para 80% de umidade, as diferentes amostras (10, 25, 50 e 100% de LE) foram disponibilizadas, individualmente, em caixas plásticas com dimensões de 13,0 cm de largura, 18,0 cm de comprimento e 12,0 cm de altura. Para garantir a mesma quantidade de água durante todo o experimento, os recipientes foram pesados em dias alternados e o peso corrigido com equivalente acréscimo de água.

Foram distribuídos 5 espécimes por caixa, sendo 4 caixas por amostra, totalizando assim 20 minhocas para cada amostra. As caixas foram mantidas em estufa por um período de 14 dias a 20°C e sob ausência total de luz.

O controle negativo foi realizado com o mesmo solo referência utilizado nas associações de solo/LE.

Foram considerados, como parâmetro de toxicidade, a taxa de mortalidade registrada e a perda de peso observada para os oligoquetas sobreviventes. A certificação da perda de peso dos indivíduos foi feita pela pesagem total dos cinco espécimes presentes em cada caixa, antes e após a realização do experimento.

2.3. Avaliação histopatológica do intestino de *Eisenia andrei*

O estudo histopatológico do intestino de *E. andrei* seguiu o protocolo descrito por Junqueira e Junqueira (1983).

Cinco espécimes sobreviventes de cada amostra, após os 14 dias de exposição, foram anestesiados a 4°C e dissecados em solução fisiológica para extração dos intestinos. Fragmentos da porção posterior dos intestinos foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% e NaCl a 9% em tampão fosfato 10% (0.1M – pH 7.5), sendo conservado em geladeira por no mínimo 24 h. O material foi colocado em tampão fosfato de sódio (pH 7,4), por 24 h e, posteriormente, desidratado em baterias de etanol (70, 80, 90 e 95%), com banhos de 15 minutos cada. Posteriormente, o material foi transferido para a solução de resina de embebição (Leica), por 24 horas, a 4 °C.

Em seguida, as amostras foram transferidas para moldes plásticos previamente preenchidos com resina contendo catalisador. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados em micrótomo. As secções de 3 μm de espessura foram hidratadas e recolhidas em lâminas de vidro. Depois de secas, as lâminas contendo as secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e submetidas às técnicas histoquímicas de von Kossa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), para detecção de cálcio; azul de bromofenol (PEARSE, 1985), para detecção de proteínas totais; e de PAS (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), para

detecção de polissacarídeos neutros. As secções foram examinadas e fotodocumentadas em fotomicroscópio de luz, para comparação dos resultados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da ação do LE sobre o organismo teste *E. andrei*

3.1.1. Taxa de mortalidade

Os resultados referentes à taxa de sobrevivência das minhocas são mostrados na Figura 1. Para o ensaio realizado com o LE 100%, no tempo 0, houve a mortalidade total das minhocas, após 1 dia de experimento, para três das quatro repetições. Como resposta ao efeito tóxico, as minhocas se deslocaram para a superfície do substrato e liberaram uma secreção amarelo intenso, sendo que algumas delas ainda apresentaram edemas pelo corpo e inchaço no clitelo, como pode ser visualizado na Figura 2. O inchaço no clitelo também foi relatado por Rao, Kavitha e Rao (2003), como resposta ao efeito tóxico do aditivo de gasolina chumbo tetraetila. No ensaio realizado com o LE 100%, atenuado por 2 meses, as minhocas também morreram logo no início dos experimentos. Todas as minhocas mortas migraram previamente para a superfície e ficaram envoltas por uma intensa quantidade de muco.

Essas alterações possivelmente foram causadas pela ação do cresol, já que, segundo a ATSDR (2008), esta é uma substância corrosiva e quando em contanto com a pele pode queimá-la. Segundo o mesmo autor, essa substância pode ainda prejudicar os rins, fígado, sangue, pulmões e cérebro de vertebrados, e aumentar a habilidade de alguns carcinógenos em induzir tumores. De acordo com Rao, Pavan e Madhavendra (2003) e Pan, Song e Zhang (2010), a produção excessiva de muco pelas células epidérmicas é decorrente de uma resposta rápida ao contato da pele das minhocas com contaminantes orgânicos.

As minhocas submetidas a concentração de LE 50%, tempo 0, também morreram após os 14 dias de ensaio, em todas as repetições, porém não apresentaram reação semelhante às expostas ao LE 100%. No entanto, a mortalidade dessas minhocas pode ser decorrente não de um efeito tóxico, mas de modificações das propriedades do solo, pois este sofreu uma compactação e perdeu sua porosidade natural, formando uma massa única, com aspecto homogêneo e denso. No ensaio realizado com o LE 50%, enterrado por 2 meses, esse aspecto não foi mais observado, provavelmente porque houve uma diminuição em sua capacidade de campo, com consequente redução da retenção de água, o que levou a uma maior porosidade da amostra.

De acordo com Natal-da-Luz et al. (2008), as propriedades do solo, como textura e quantidade de matéria orgânica, afetam significativamente o comportamento da *E. andrei*.

Segundo os autores, as minhocas evitam solos de texturas extremas e com quantidades de matéria orgânica muito baixa.

Suthar (2009) também observou uma alta taxa de mortalidade em minhocas da espécie *E. fetida*, após exposição a amostras contendo exclusivamente LE de origem urbana. No entanto, quando este LE foi misturado com outros materiais, como o bagaço de cana-de-açúcar, houve um aumento na taxa de sobrevivência das minhocas.

Nossos dados também sugerem que a associação do LE com outros materiais contribui para uma diminuição da sua letalidade, pois, nas amostras de 10% e 25% de LE testadas, tanto para as amostras iniciais, como para as submetidas a 2 meses de atenuação natural, não foi observado qualquer efeito tóxico agudo, em relação à mortalidade dos indivíduos.

A mortalidade em minhocas da espécie *E. fetida* também foi utilizada como parâmetro de toxicidade para a avaliação de amostras de LE associadas a solo (KINNEY et al., 2012). Neste estudo, os autores observaram uma taxa de sobrevivência de apenas 20% na concentração mais alta testada (4% de LE, massa seca), quando as amostras foram envelhecidas por 8 semanas antes da exposição, indicando que a biodisponibilidade de algumas substâncias tóxicas presentes podem aumentar com o tempo de envelhecimento do LE. A exposição a amostras de LE urbano puro também induziu uma mortalidade de 100% em minhocas da espécie *E. andrei* (CESAR et al., 2008), embora nenhum efeito significativo tenha sido observado para as misturas testadas de solo e LE.

Diferentemente dos nossos estudos, exposições de *E. fetida* ao LE, realizados por Wilke et al. (2008), não acarretaram em efeitos letais para a espécie, possivelmente porque o LE avaliado, proveniente de uma ETE municipal, apresentava substâncias tóxicas dentro dos limites exigidos pela legislação alemã, com exceção do cobre. No entanto, a presença desse metal no LE não contribuiu para um aumento dos efeitos tóxicos para minhoca.

Nos nossos ensaios, realizados com o LE biorremediado por 6 e 12 meses, não foi observado nenhum efeito tóxico agudo, em relação à mortalidade dos indivíduos. Todos os espécimes, das quatro repetições realizadas para cada uma das associações solo/LE (10%, 25% e 50%), bem como para o LE 100%, permaneceram vivos durante todo o período do ensaio.

Esses resultados corroboram os das análises químicas apresentados na Tabela 1, que indicam que os poluentes orgânicos, presentes no LE inicial e biodegradado por 2 meses, em concentrações acima das estabelecidas pela legislação brasileira, foram eliminados das amostras atenuadas por 6 e 12 meses. Por meio deste ensaio biológico, podemos confirmar que houve uma diminuição da toxicidade nos LE de 6 e 12 meses, indicando que o processo

de atenuação natural foi eficiente na biodegradação dos contaminantes presentes e na não formação de metabólitos tóxicos.

Uma diminuição nos efeitos tóxicos do LE submetido a compostagem sobre o organismo teste *E. andrei* também foi observada por Moreira, Sousa e Canhoto (2008). Enquanto a concentração mais alta de LE puro testada acarretou em prejuízos no ganho de peso e na reprodução desses organismos, nenhum efeito danoso foi observado para as amostras de LE compostados. De acordo com Garg e Kaushik (2005), processos de biorremediação como a compostagem eliminaram substâncias tóxicas presentes nas amostras de LE e evitaram as mortes da minhocas.

Também é possível afirmar que, as quantidades de dioxinas e furanos presentes no LE aqui estudado parecem não causar um efeito tóxico no organismo *E. andrei*. Sendo assim, caso esse LE seja destinado para fins agrícolas, a presença dessas substâncias não inviabiliza o seu uso. A baixa toxicidade encontrada pode ser explicada pela alta afinidade de ligação das dioxinas com o solo, o que reflete, consequentemente, em uma baixa biodisponibilidade destes compostos (VAN STRAALEN, 2004). Segundo esse mesmo autor, esses compostos apresentam baixa toxicidade para invertebrados terrestres, mas podem ser preocupantes se estes forem transferidos ao longo da cadeia alimentar. Contudo, Sforzini et al. (2011), ao avaliarem os efeitos da TCDD em *E. andrei*, para três diferentes concentrações (1.5×10^{-3}, 1.5×10^{-2}, 1.5×10^{-1} $ng.mL^{-1}$), observaram alterações na atividade da Ca^{2+}-ATPase de células do epitélio intestinal e na atividade de enzimas lisossomais, além de danos no DNA e na membrana de celomócitos, apesar de não observarem mortalidade, nem diferença no peso dos organismos expostos.

3.1.2. Variação na massa corpórea

Outro parâmetro avaliado em nossos ensaios foi a variação de peso dos indivíduos, antes e após serem expostos às diferentes concentrações do LE testado. Os resultados referentes aos valores da pesagem das minhocas com as amostras de LE, após 0, 2, 6 e 12 meses de atenuação natural monitorada estão apresentados na Tabela 2. Os grupos tratados e o grupo controle apresentaram uma massa corpórea inicial bastante homogênea em cada período de atenuação natural testado.

Para o primeiro período de atenuação natural (tempo 0), as associações consideradas não tóxicas para a espécie *E. andrei* favoreceram um aumento significativo do peso corpóreo das minhocas, em relação ao solo controle, sendo que a associação contendo 25% de LE apresentou também uma aumento significativo, quando comparado com o seu peso inicial.

Segundo Liu, Hu e Zhang (2005), as minhocas ingerem uma considerável quantidade de solo, principalmente aqueles com alta quantidade de matéria orgânica. Dessa forma, esses resultados são justificados pela preferência da minhoca pelo LE, devido à alta quantidade de matéria orgânica, ao invés do solo, por ser, comparativamente, mais pobre em matéria orgânica. Assim, as concentrações mais altas de LE também apresentaram uma quantidade maior de matéria orgânica e promoveram um aumento do peso corpóreo das minhocas. Natal-da-Luz et al. (2009) também observaram um aumento da biomassa em minhocas da espécie *E. andrei*, quando estas foram expostas a misturas de LE proveniente da ETE municipal de Coimbra – Portugal e solo referência (25 t/ha e 45 t/ha). Embora esse lodo apresentasse níveis de cobre e zinco, nenhum efeito tóxico foi observado para as minhocas, quando expostas às misturas testadas. Cesar et al. (2008) também relataram que a adição de LE aos solos favorece a um aumento da biomassa dessa mesma espécie. Contrariamente a esses resultados, Moreira, Sousa e Canhoto (2008) relataram que a aplicação de LE anaeróbio a solos, na proporção de 12 t/ha, acarretou em uma diminuição significativa na massa corpórea de indivíduos da espécie *E. andrei*, enquanto que a proporção de 6 t/ha não foi prejudicial, em relação a este parâmetro, mas também não contribuiu para um ganho de peso da minhocas.

Para os ensaios realizados com o LE biorremediado por 2 meses, em relação as diferenças entre o peso inicial e final, foi observada uma diminuição significativa para o solo referência e para a associação de 10% em relação às demais associações, provavelmente pelo fato dessas concentrações conterem menores quantidades de matéria orgânica. Foi observado um aumento significativo da massa corpórea das minhocas expostas às associações de 25 % e 50% de LE, em relação ao solo controle, mas não houve uma variação significativa entre os pesos iniciais e finais dos indivíduos da mesma amostra. Nos tempos de 6 e 12 meses, nenhum resultado foi estatisticamente significativo, tanto em comparação com o solo controle, como entre os pesos iniciais e finais de cada amostra. Isso pode ser justificado pela diminuição do carbono orgânico das amostras do tempo 2, 6 e 12 meses, em relação ao LE inicial (tempo 0), como pode ser visualizado na Tabela 2. Como as minhocas se alimentam da matéria orgânica existente no solo (LIU; HU; ZHANG, 2005), uma diminuição desse parâmetro nas amostras, acarreta em uma menor disponibilidade de alimento e em uma consequente perda de massa corpórea.

Garg e Kaushik (2005) também observaram um aumento na massa corpórea de *E. fetida* quando os indivíduos foram expostos à mistura de esterco e LE proveniente de indústria têxtil, com exceção das amostras que continham valores de LE acima de 40%. No entanto,

após 10 semanas de experimento, já foi observada uma diminuição neste parâmetro para todas as amostras, indicando uma exaustão da matéria orgânica.

Assim, em nosso estudo, o aumento ou a diminuição do peso corpóreo da espécie *E. andrei*, após serem submetidas a diferentes concentrações de LE, parecem estar mais relacionados com a quantidade de matéria orgânica presente nas amostras do que ao efeito tóxico do LE, com exceção do LE 100% que, apesar de conter uma grande quantidade de matéria orgânica, se mostrou muito tóxico para essa espécie, nos 2 primeiros períodos de atenuação natural testados.

Embora Dittbrenner et al. (2011) considerem que alterações na massa corpórea de minhocas seja um parâmetro bastante relevante em ensaios ecotoxicológicos, por indicar uma relação entre a atividade da minhoca e a qualidade do solo, em nossos estudos esse parâmetro não se mostrou tão adequado para avaliar os efeitos do LE.

3.1.3. Alterações histopatológicas do intestino

A avaliação de alterações histopatológicas em intestino de minhocas tem sido muito utilizada no biomonitoramento da contaminação ambiental, trazendo informações bastante relevantes sobre os efeitos sub-letais a esses organismos (GOBI; GUNASEKARAN, 2010; LAPIED et al., 2011; LOURENÇO et al., 2011)

Quando as minhocas entram em contato com o LE, elas tendem a bioacumular uma ampla gama de substâncias presentes nesse resíduo, incluindo agrotóxicos, produtos farmacêuticos, desinfetantes, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, esteróis, entre outros (KINNEY et al. 2008). Mesmo que não haja um efeito letal imediato do LE sobre as minhocas, os compostos presentes neste resíduo podem levar a complicações nas funções fisiológicas dos organismos expostos. Assim, é de grande relevância a realização de avaliações que envolvam parâmetros celulares, pois estes podem trazer informações importantes quanto à ação dos contaminantes presentes no LE sobre biota associada ao solo receptor. De acordo com Gobi e Gunasekaran (2010), danos no tecido epitelial induzidos por químicos, principalmente relacionados com alterações nas vilosidades intestinais, levam a diminuição na absorção de nutrientes e ao consumo das reservas energéticas do tecido cloragógeno, prejudicando a reprodução e o aumento de biomassa da espécie *E. fetida*.

As análises referentes às alterações histopatológicas de *E. andrei* foram realizadas apenas com os espécimes sobreviventes das diferentes concentrações testadas para os períodos de 0, 2 e 6 meses de atenuação natural. O intestino dos indivíduos expostos ao solo controle apresentaram um padrão morfológico normal para a espécie, ou seja, revestido por

epitélio simples colunar, com células apresentando núcleos ovalados íntegros, seguido de uma camada muscular intermediária e uma camada mais externa formada pelas células cloragógenas (LOURENÇO et al., 2011), como pode ser visualizado na Figura 3A. Em relação aos organismos expostos às diferentes amostras de LE, a menor associação testada (10%) provocou uma intensa vacuolização do citoplasma tanto das células epiteliais quanto das cloragógenas, além de um aumento na presença de núcleos picnóticos. Também para esta concentração (10%), houve um espessamento do epitélio (Figura 3B), em relação aquele dos indivíduos controle. Para a amostra de 25% de LE, além da presença de vacúolos citoplasmáticos principalmente nas células epiteliais, verificou-se uma desorganização desse tecido (Figura 3J). Em relação as alterações induzidas pela amostra de 50% de LE, foi observada a presença de alguns vacúolos na células epiteliais, uma intensificação desses vacúolos na células cloragógenas, acompanhado da perda dos limites dessas células, além da presença de núcleos picnóticos (Figura 3H). A amostra referente ao LE 100% só foi avaliada para o período de 0 e 6 meses de atenuação natural, em decorrência da mortalidade de todos os indivíduos no segundo período estudado (2 meses). Nos indivíduos expostos a esta amostra, também foi observada a presença de vacúolos citoplasmáticos nas células epiteliais e cloragógenas. Além disso, também foi observada a presença de núcleos picnóticos e um intenso aumento na espessura do epitélio (Figura 3B). Dessa forma, pela análise qualitativa realizada neste estudo, todos as associações testadas, bem como o LE 100%, induziram alterações sobre as células do intestino de *E. andrei*. Os efeitos observados parecem não diferirem entre as amostras, ao longo do período de atenuação natural, pelo menos até o período de 6 meses de atenuação natural.

A presença de vacúolos citoplasmáticos em células epiteliais, segundo Perez e Fontanetti (2010), está relacionada com o início de processos autofágicos, desencadeados por uma resposta ao estresse induzido pelo LE, bem como pelo início de um processo de morte celular por necrose. Uma desorganização do epitélio intestinal, induzido pela exposição a LE, também foi observada por Christofoletti, Francisco e Fontanetti (2012) em diplópodos da espécie *Rhinocricus padbergi*. No entanto, segundo esses mesmos autores, tal alteração pode ser reversível, se houver um aumento da taxa de renovação epitelial que compense os danos induzidos pelo LE neste tecido. Gobi e Gunasekaran (2010) relataram a presença de núcleos picnóticos em células intestinais de *E. fetida* expostas a 3 diferentes concentrações do herbicida butaclor, sendo que estes foram observados em maior quantidade na concentração mais baixa testada. Esses mesmos autores concluíram que as minhocas são organismos bastante sensíveis a químicos ambientais e que, a avaliação de alterações histopatológicas em

seus tecidos pode constituir uma importante ferramenta para a análise de efeitos de contaminantes presentes no solo.

Assim como o observado em nosso estudo com minhocas, Perez e Fontanetti (2010) também notaram que a exposição do diplópoda *R. padbergi* a LE acarretou em alterações nas células do intestino do diplópoda, incluindo um aumento na liberação de vesículas secretoras e uma intensa vacuolização das células do epitélio. Nogarol e Fontanetti (2010) também observaram que a exposição ao LE foi capaz de promover alterações morfológicas no intestino dessa mesma espécie, onde concentrações mais altas induziram respostas mais precoces em relação ao tempo de exposição, embora a menor concentração testada (1%) também tenha ocasionado respostas semelhantes, após um tempo maior de exposição. Godoy e Fontanetti (2010) relataram que após 7 dias de exposição ao LE bruto, nenhuma alteração foi observada no intestino de *R. padbergi*, porém, após 14 dias, o epitélio intestinal sofreu uma intensa renovação celular, em decorrência dos danos sofridos pelas células.

Os ensaios realizados com as técnicas histoquímicas, mostraram uma diferença sutil entre os tratamentos realizados. A detecção de cálcio pela técnica de von Kossa revelou um aumento discreto nas marcações nas células cloragógenas dos indivíduos submetidos a amostra de 100%, no tempo de 6 meses de atenuação natural (Figura 3D). Marcações positivas para proteínas também foram observadas no intestino dos espécimes submetidos a amostra de 100%, para os períodos de 0 e 6 meses, tanto nas células epiteliais como nas cloragógenas (Figura 3K). Em relação a presença de polissacarídeos totais, foram observadas marcações positivas nas células cloragógenas para todos os tratamentos, já que estas células desempenham o papel de armazenamento de energia (Figuras 3E e F).

Os dados observados em nosso estudo indicam claramente que o LE é capaz de induzir danos expressivos no intestino da espécie *E. andrei*, tanto nas células epiteliais como no tecido cloragógeno, mesmo quando este resíduo é usado em baixas concentrações (10%) e após 6 meses de atenuação natural. No entanto, sugerimos que seja feita uma avaliação quantitativa desses resultados, pois tal análise trará informações mais relevantes e pontuais sobre a significância desses dados, além de permitir uma melhor comparação entre os efeitos induzidos pelas diferentes associações testadas (10, 25, 50 e 100%), bem como trazer informações sobre a eficiência da atenuação natural em relação a este parâmetro.

Em nossas análises, o solo artificial, constantemente utilizado nos ensaios com minhocas, foi substituído por um solo natural coletado em um ambiente livre de contaminação. Este solo mostrou respostas adequadas em relação aos 3 diferentes parâmetros avaliados (mortalidade, alterações da massa corpórea e histopatológicas). Segundo Casadesús

(2007) o uso de solos naturais favorece a extrapolação dos dados obtidos em condições de laboratório para situações de campo. Dessa forma, a utilização de solos naturais, tanto para controle do teste como para a diluição das amostras, contribui para uma melhor compreensão dos reais efeitos do LE sobre oligoquetas, quando este é disponibilizado em solos agrícolas.

Adicionalmente, salientamos a importância da realização de ensaios químicos e biológicos concomitantes, para comprovar, não somente a eliminação da substância na amostra de LE, mas também a possível diminuição de seu efeito tóxico. De acordo com Plaza et al. (2005), o uso de bioensaios combinados com análises químicas proporcionam resultados mais confiáveis para análise de risco ambiental. Esta combinação de ensaios, segundo os autores, é indicada para a avaliação da efetividade de processos de biorremediação.

5. CONCLUSÃO

A espécie *E. andrei* provou ser um organismo teste indicado para avaliações de contaminação por LE, sendo bastante sensível quanto à presença de substâncias tóxicas neste resíduo, principalmente em relação aos parâmetros de mortalidade e alterações histopatológicas no intestino.

O LE estudado induziu um efeito letal nas concentrações mais altas dos primeiros tempos analisados, porém esse efeito não foi mais percebido para as amostras com 6 e 12 meses de atenuação natural. Embora as concentrações mais baixas não acarretaram em um efeito letal, elas também se mostraram capazes de danificar as células do intestino de *E. andrei*.

O processo de atenuação natural contribui para uma melhora nos efeitos tóxicos do LE, principalmente em relação à taxa de sobrevivência dos organismos testados. No entanto, mesmo quando associados a solos, esse resíduo ainda mostrou-se potencialmente prejudicial para as células do intestino de *E. andrei*, mesmo após 6 meses de atenuação natural.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Processo No. 2009/09665-0 pelo suporte financeiro, à empresa Foz de Rio Claro pelo fornecimento do lodo de esgoto utilizado neste estudo e ao Prof. Dr. Marcos Ap. Pizzano pela doação do primeiro plantel de minhocas necessário para a realização deste trabalho.

7. REFERÊNCIAS

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for cresols**. Atlanta, 283p., 2008.

BARTLETT, M.D.; BRIONES, M.J.I.; NEILSON, R.; SCHMIDT, O.; SPURGEON, D.; CREAMER, R.E. A critical review of current methods in earthworm ecology: From individuals to populations. **European Journal of Soil Biology**, v.46, p.67-73, 2010.

BELMESKINE, H.; HADDAD, S.; VANDELAC, L.; SAUVÉ, S.; FOURNIER, M. Toxic effects of PCDD/Fs mixtures on *Eisenia andrei* earthworms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.80, p.54-59, 2012.

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

CASADESÚS, X.D. **Methodologies using soil organisms for the ecotoxicological assessment of organic wastes**. 2007. Tese (Doutorado) Departament de Biologia Animal, Vegetal I Ecologia Universitat Autònoma de Barcelona – Centre de Recerca Ecològica I Aplicacions Forestals, Barcelona, Espanha. 2007. 242p.

CESAR, R.G.; EGLER, S.G.; POLIVANOV, H.; CASTILHOS, Z.C.; RODRIGUES, A.P.C.; ARAÚJO, P.A. Biodisponibilidade de mercúrio, zinco e cobre em distintas frações granulométricas de solo contaminado utilizando oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 31, n. 2, p. 33-41, 2008.

CHELINHO, S.; MOREIRA-SANTOS, M.; LIMA, D.; SILVA, C.; VIANA, P.; ANDRÉ, S.; LOPES, I.; RIBEIRO, R.; FIALHO, A.M.; VIEGAS, C.A.; SOUSA, J.P. Cleanup of atrazine-contaminated soils: ecotoxicological study on the efficacy of a bioremediation tool with *Pseudomonas* sp. ADP. **J. Soils Sediments,** v.10, p.568-578, 2010.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; FRANCISCO, A.; FONTANETTI, A.S. Biosolid soil application: toxicity tests under laboratory conditions. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2012, p.1-9, 2012.

DITTBRENNER, N.; SCHMITT, H.; CAPOWIEZ, Y.; TRIEBSKORN, R. Sensitivity of Eisenia fetida in comparison to Aporrectodea caliginosa and Lumbricus terrestris after imidacloprid exposure. Body mass change and histopathology. **J. Soil Sediments**, v.11, p.1000-1010, 2011.

GARG, V.K.; P. KAUSHIK, P. Vermistabilization of textile mill sludge spiked with poultry droppings by an epigeic earthworm *Eisenia fetida*. **Bioresour. Technol**., v.96, p.1063‑1071, 2005.

GOBI, M.; GUNASEKARAN, P. Effect of butachlor herbicide on earthworm *Eisenia fetida* —Its histological perspicuity. **Applied and Environmental Soil Science**, v.2010, p. 1-4, 2010.

GODOY, J.A.P.; FONTANETTI, C.S. Diplopods as bioindicators of soils: analysis of midgut of individuals maintained in substract containing sewage sludge. **Water, Air and Soil Pollution**, v.210, p.389-398, 2010.

GRUMIAUX, F.; DEMUYNCK, S.; SCHIKORSKI, D.; LEMIÈRE, S.; LEPRÊTE, A. Assessing the effects of FBC ash treatments of metal-contaminated soils using life history traits and metal bioaccumulation analysis of the earthworm *Eisenia Andrei*. **Chemosphere**, v.79, p.156-161, 2010.

GUPTA, R.D.; CHAKRAVORTY, P.P.; KAVIRAJ, A. Susceptibility of epigeic earthworm *Eisenia fetida* to agricultural application of six insecticides. **Chemosphere**, v.84, p.724-726, 2011.

HARRISON, E.Z.; OAKES, S.R.; HYSELL, M.; HAY, A. Organic chemicals in sewage sludges. **Sci Total Environ**, v. 367, p. 481-497, 2006.

JUNQUEIRA, L.C., JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. Livraria Editora Santos, São Paulo, 1983.

KILIÇ, G.A. Histopatological and biochemical alterations of the earthworm (*Lumbricus terrestris*) as biomarker of soil pollution along Porsuk River Basin (Turkey). **Chemosphere**, v.83, p.1175-1180, 2011.

KINNEY, C.A.; CAMPBELL B.R.; THOMPSON, R.; FURLONG, E.T.; KOLPIN, D.W.; BURKHARDT, M.R.; ZAUGG, S.D.; WERNER, S.L.; HAY, A.G. Earthworm bioassays and seedling emergence for monitoring toxicity, aging and bioaccumulation of anthropogenic waste indicator compounds in biosolids–amended soil. **Science of the Total Environment**, v,433, p.507-515, 2012.

KINNEY, C.A.; FURLONG, E.T.; KOLPIN, D.W.; BURKHARDT, M.R.; ZAUGG, S.D.; WERNER, S.L.; BOSSIO, J.P.; BENOTTI, M.J. Bioaccumulation of pharmaceuticals and other anthropogenic waste indicators in earthworms from agricultural soil amended with biosolid or swine manure. **Environ. Sci. Technol.**, v.42, p.1863-1870, 2008.

LACHANCE, B.; RENOUX, A.Y.; SARRAZIN, M.; HAWARI, J.; SUNAHARA, G.I. Toxicity and bioaccumulation of reduced TNT metabolites in the earthworm *Eisenia andrei* exposed to amended forest soil. **Chemosphere**, v.55, p.1339-1348, 2004.

LANNO, R.; WELLS, J.; CONDER, J.; BRADHAM, K.; BASTA, N. Bioavailability of chemicals in soil for earthworms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 39-47, 2004.

LAPIED, E.; NAHMANI, J.Y.; MOUDILOU, E.; CHAURAND, P.; LABILLE, J.; ROSE, J.; EXBRAYAT, J.M.; OUGHTON, D.H.; JONER, E.J. Ecotoxicological effects of an aged TiO_2 nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm *Lumbricus terrestris* after exposure through water, food and soil. **Environment International**, v.37, p. 1105-1110, 2011.

LEE, K.E. Earthworms: **Their Ecology and Relationship with Soils and Land Use**. Academic Press, Sydney, 1985.

LIU, X.; HU, C.; ZHANG, S. Effects on Earthworm Activity on Fertility and Heavy Metals Bioavailability in Sewage Sludge. **Environment International**, v.31, p. 874-879, 2005.

LOURENÇO, J.I.; PEREIRA, R.O.; SILVA, A.C.; MORGADO, J.M.; CARVALHO, F.P.; OLIVEIRA, J.M.; MALTA, M.P.; PAIVA, A.A.; MENDO, S.A.; GONÇALVES, F.J. Genotoxic endpoints in the earthworms sub-lethal assay to evaluate natural soils contaminated by metals and radionuclides. **Journal of Hazardous Materials**, v.186, p.788-795, 2011.

MOREIRA, R.; SOUSA, J.P.; CANHOTO, C. Biological testing of a digested sewage sludge and derived composts. **Bioresource Technology**, v.99, n.17, p.8382-8389, 2008.

NATAL-DA-LUZ, T.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J.P. Avoidance tests in site-specific risk assessment - influence of soil properties on the avoidance response of Collembola and earthworms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.27, p.1112-1117, 2008.

NATAL-DA-LUZ, T.; TIDONA, S.; JESUS, B.; MORAIS, P.V.; SOUSA, J.P. The use of sewage sludge as soil amendment. The need for an ecotoxicological evaluation. **J. Soils Sediments**, v. 9, p. 246–260, 2009.

NOGAROL, L.R.; FONTANETTI, C.S. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: tissular responses of the midgut. **Micron**, v.41, p.239-246, 2010.

OECD 207. 1984. **Guideline for testing chemicals Earthworm, acute toxicity tests.** Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

OLOFSSON, U.; BIGNERT, A.; HAGLUND, P. Time-trends of metals and organic contaminants in sewage sludge. **Water Research**, v.46, p.4841-4851, 2012.

PAN, X.; SONG, W.; ZHANG, D. Earthworms (*Eisenia foetida*, Savigny) mucus as complexing ligand for imidacloprid. **Biol. Fertil. Soils**, v.46, p.845-850, 2010.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry**: Theoretical and applied. J&A. London, 1985.

PEREZ, D.G.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the toxic Potential of sewage sludge in the Midgut of the Diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Water, Air and Soil Pollution**, v.218, p.1-8, 2010.

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

RAO, J.V.; KAVITHA, P; RAO, A.P. Comparative toxicity of tetra ethyl lead and lead oxide to earthworms, *Eisenia fetida* (Savigny). **Environmental Research**, v.92, p.271-276, 2003.

RAO, J.V.; PAVAN, Y.S.; MADHAVENDRA, S.S. Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.54, p.296–301, 2003.

SFORZINI, S.; DAGNINO, A.; OLIVERI, L.; CANESI, L.; VIARENGO, A. Effects of dioxin exposure in *Eisenia andrei*: integration of biomarker data by an Expert System to rank the development of pollutant-induced stress syndrome in earthworms. **Chemosphere**, v.85, p.934-942, 2011.

SUTHAR, S. Vermistabilization of municipal sewage sludge amended with sugarcane trash using epigeic *Eisenia fetida* (Oligochaeta). **Journal of Hazardous Materials**, v.163, p. 199-206, 2009.

VAN STRAALEN, N. M. The use of soil invertebrates in ecological surveys of contaminated soils. In: DOELMAN, P.; EIJSACKERS, H.J.P. (Eds.). **Vital Soil: Function, Value and Properties**. Elsevier, Amsterdam, p.159-195, 2004.

VELKI, M.; HACKENBERGER, B.K. Inhibition and recovery of molecular biomarkers of earthworm *Eisenia andrei* after exposure to organophosphate dimethoate. **Soil Biology & Biotechmology**, v.57, p.100-108, 2013.

WALTER, I.; MARTÍNEZ, F.; CALA, V. Heavy metal speciation and phytotoxic effects of three representative sewage sludges for agricultural uses. **Environmental Pollution**, v.139, p.507-514, 2006.

WILKE, B.M.; RIEPERT, F.; KOCH, C.; KÜHNE, T. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.70, p.283-293, 2008.

Tabela 1. Caracterização química do LE, após diferentes períodos de biorremediação.

Parâmetro	Unidade	Amostra Inicial	Amostra 2 meses	Amostra 6 meses	Amostra 12 meses
1,2,3-Triclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,3,5-Triclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,2,4-Triclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,2-Diclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,3-Diclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,4-Diclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,2,3,4-Tetraclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,2,4,5-Tetraclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
1,2,3,5-Tetraclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Di-N-Butilftalato	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Dimetilftalato	µg/kg	ND	ND	ND	ND
2,4-Diclorofenol	µg/kg	ND	ND	ND	ND
2,4,6-Triclorofenol	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Pentaclorofenol	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Benzo(a)antraceno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Benzo(a)pireno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Benzo(k)fluoranteno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Indeno(1,2,3-cd)pireno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Naftaleno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Fenantreno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Hexaclorobenzeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
m,p-Cresol	µg/kg	276.089,8	256.743,4	ND	ND
o-Cresol	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Bis[2-Etilexil]ftalato	µg/kg	ND	117.154,0	ND	ND
Heptacloro	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Aldrin	µg/kg	ND	ND	ND	ND
g-BHC	µg/kg	ND	ND	ND	ND
a-Clordano	µg/kg	ND	ND	ND	ND
g-Clordano	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Dieldrin	µg/kg	ND	ND	ND	ND
DDT	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Endrin	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Toxafeno	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Mirex	µg/kg	ND	ND	ND	ND
Fósforo Total	mg/kg	3.756,1	13.645,8	11.235,8	8997,8
Potássio Total	mg/kg	678,8	1.787,2	1.519,5	1.140,0
Sódio Total	mg/kg	296,7	1.532,7	1.179,1	384,8
Enxofre Total	mg/kg	6.089,0	17.961,3	17.561,0	13.589,3
Cálcio Total	mg/kg	4.302,7	15.937,5	16.284,6	11473,2
Magnésio Total	mg/kg	989,8	3.671,1	3.094,9	2354,9
Arsênio Total	mg/kg	ND	ND	ND	ND
Bário Total	mg/kg	100,8	356,1	388,9	370,8
Cádmio Total	mg/kg	ND	ND	ND	ND
Chumbo Total	mg/kg	13,9	45,0	45,1	45,4
Cobre Total	mg/kg	66,7	202,1	234,6	223,0
Cromio Total	mg/kg	36,7	66,8	35,7	39,8
Mercúrio Total	mg/kg	0,202	ND	ND	0,675

Tabela 1 (continuação)

Molibdênio Total	mg/kg	2,27	11,4	7,34	5,54
Níquel Total	mg/kg	7,45	20,7	23,7	17,6
Zinco Total	mg/kg	233,0	818,7	922,5	785,0
Total de Dioxinas	ng/kg	269,237	622,8792	884,16	975,5
Total de Furanos	ng/kg	74,575	135,0086	101,66	139,96

ND: não detectado; NE: parâmetro com valores não estabelecidos.

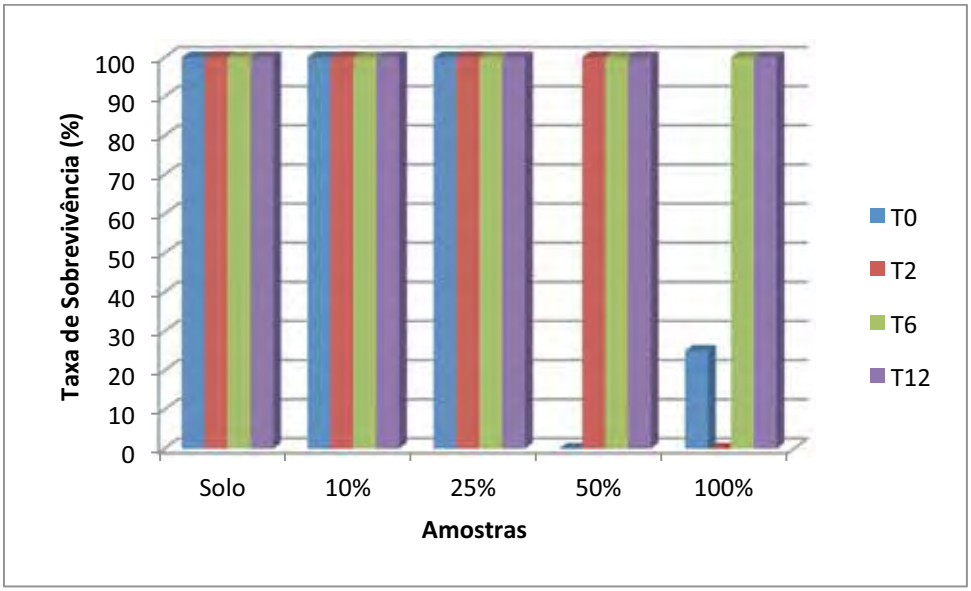


Figura 1. Taxa de sobrevivência da espécie *E. andrei*, após exposição à diferentes concentrações de LE, nos períodos de 0, 2, 6 e 12 meses de atenuação natural.

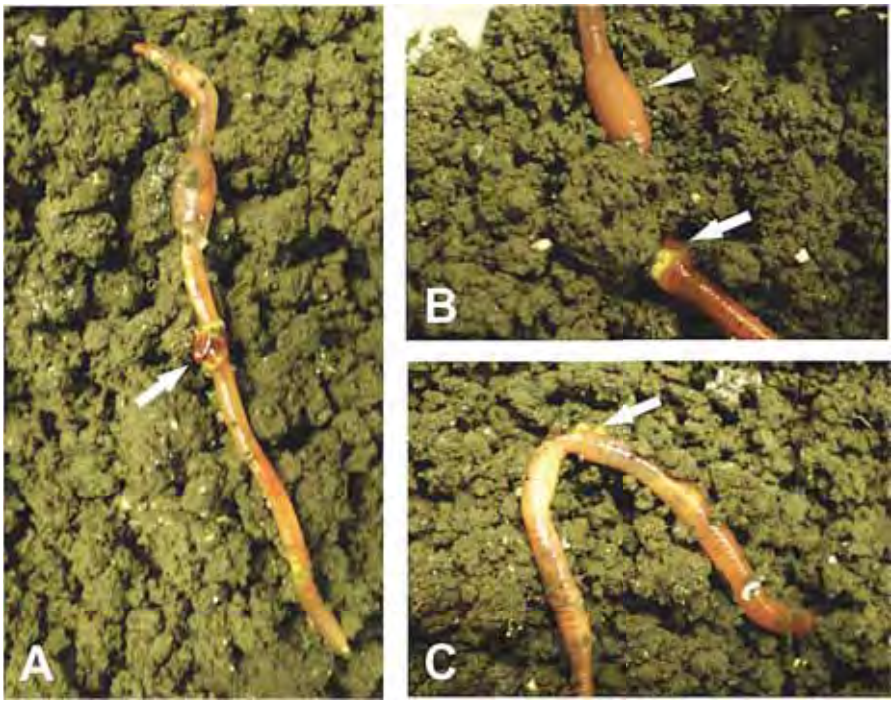


Figura 2. Espécimes de *E. andrei* expostos ao LE 100%, após 0 e 2 meses de atenuação natural. A. Presença de edema na superfície corporal externa (seta); B. Organismo apresentando inchaço na região do clitelo (cabeça de seta) e muco (seta); C. Presença de muco (seta).

Tabela 2. Resultado das pesagens de *E. andrei*, após 14 dias de exposição a diferentes concentrações do LE, nos períodos de 0, 2, 6 e 12 meses de atenuação natural.

	Peso	Amostra Inicial	Amostra 2 meses	Amostra 6 meses	Amostra 12 meses
Solo	Inicial	4,09 ± 0,16	3,786 ± 0,02	2,91 ± 0,07	2,71 ± 0,05
	Final	3,14 ± 0,13	2,63 ± 0,08[b]	2,11 ± 0,12	2,29 ± 0,13
LE 10%	Inicial	4,24 ± 0,24	3,71 ± 0,04	2,89 ± 0,06	2,66 ± 0,06
	Final	5,42 ± 0,53[a]	2,65 ± 0,12[b]	2,12 ± 0,05	2,23 ± 0,09
LE 25%	Inicial	4,11 ± 0,20	3,71 ± 0,06	2,90 ±0,06	2,62 ± 0,01
	Final	5,93 ± 0,26[a,b]	3,58 ± 0,07[a]	2,64 ± 0,10	2,51 ± 0,14
LE 50%	Inicial	3,98 ± 0,08	3,62 ± 0,07	2,81 ± 0,07	2,66 ± 0,03
	Final	-	4,07 ± 0,16[a]	2,52 ± 0,07	2,50 ± 0,10
LE 100%	Inicial	3,84 ± 0,27	3,67 ± 0,05	2,89 ± 0,12	2,57 ± 0,10
	Final	4,083[c]	-	2,02 ± 0,06	2,54 ± 0,11

[a]diferença significativa em relação ao controle negativo;
[b]diferença significativa em relação a seu peso inicial;
[c]sobrevivência de apenas uma réplica.

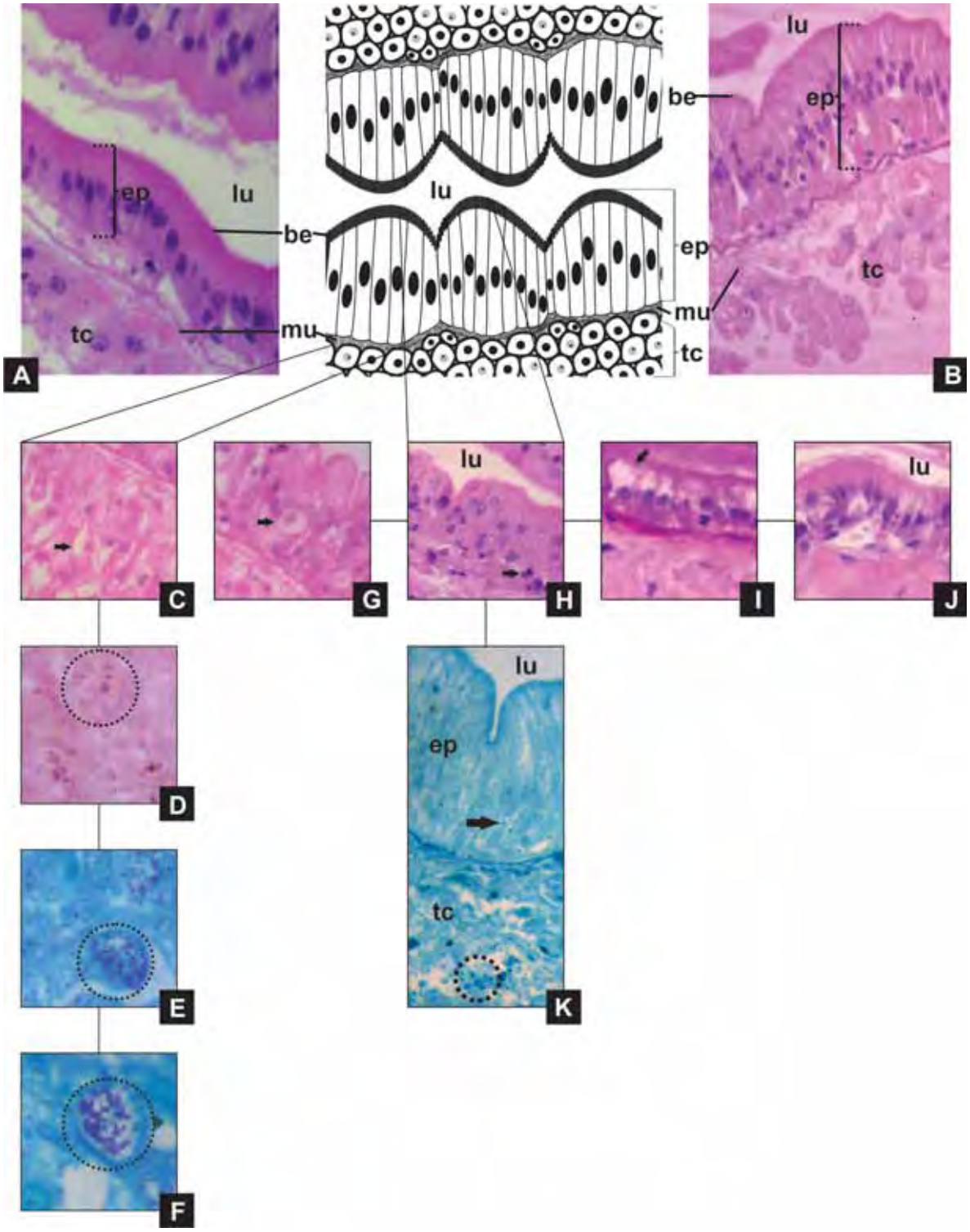


Figura 3. Representação esquemática de secções histológicas e histoquímicas do intestino de *E. andrei*. A. Secção longitudinal do intestino controle, com epitélio e tecido cloragógeno íntegros; **B.** Secção longitudinal do intestino, após exposição ao LE, apresentando um espessamento do epitélio absortivo, aumento dos espaços intercelulares e células vacuolizadas; **C-F**: Detalhes de alterações nas células cloragógenas evidenciando a presença de vacúolos (C), marcação positiva para cálcio (D), marcação positiva para polissacarídeos nas células (E) e nos vacúolos (F); **G-J:** Detalhes de alterações no epitélio evidenciando a presença de vacúolos (G), núcleos picnóticos (H), vacúolos concentrados na região basal das células (I), desorganização do epitélio (J); **K.** Secção longitudinal do intestino indicando a presença de marcações positivas para proteínas no tecido epitelial (seta) e cloragógeno. As letras menores correspondem ao epitélio absortivo (ep), camada muscular (mu), tecido cloragódeno (tc), bordo em escova (be) e lúmen (lu).

6. CONCLUSÕES GERAIS

Pelos resultados obtidos nos ensaios realizados com diferentes concentrações de LE, antes e após o processo de atenuação natural monitorada, pode-se concluir que:

- Quanto à caracterização química, segundo os parâmetros estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 375 de 29 de agosto de 2006, o LE estudado apresentou a maioria dos parâmetros químicos abaixo dos limites máximos exigidos pela legislação, com exceção de uma elevada quantidade de *m*- e *p*-cresol e da presença, em baixas concentrações de dioxinas e furanos;
- Em relação à caracterização microbiológica do LE, foram identificados 17 gêneros diferentes de micro-organismos, em sua maioria bactérias, os quais se alternaram ao longo do processo de atenuação natural monitorada. A bactéria *Bacillus* sp foi a única presente em todas as amostras analisadas, podendo ser considerada uma espécie importante na degradação do LE, pela resistência que apresentou às condições do lodo;
- O processo de atenuação natural monitorada mostrou ser um método bastante eficiente na eliminação de substâncias orgânicas tóxicas, como o *m*- e *p*-cresol, em LE, após um período de 6 meses, porém não foi eficiente na eliminação das dioxinas e furanos;
- O ensaio de *Salmonella*/microssoma revelou que o LE foi capaz de induzir atividade mutagênica na linhagem TA 100, com presença da fração metabolizadora S9 somente nos períodos de 0 e 6 meses de atenuação natural;
- Os testes com ER-RYA indicaram que as amostras iniciais de solubilizados de LE possuem uma atividade estrogênica, mas esta é considerada muito baixa e não foi mais observada para os períodos de 6 e 12 meses;

- Uma atividade biológica bastante elevada foi observada nos ensaios realizados com YCM-RYA realizados com o extrato orgânico, para os períodos de 0, 2 e 6 meses e para o extrato aquoso, para os períodos de 0 e 2 meses de atenuação natural;
- O extrato aquoso de LE 100% foi tóxico para a espécie *A. cepa*, inibindo a germinação das sementes nos tempos 0 e 2 meses. Essa mesma resposta foi observada para a amostra bruta de LE 100% no período de 2 meses. Todas as associações de solo e LE testadas, bem como seus respectivos extratos aquosos, foram potencialmente genotóxicos para as células meristemáticas dessa espécie, nos períodos de 0 e 2 meses, porém, os efeitos observados foram diminuindo com o aumento do tempo de atenuação natural. O LE estudado também foi mutagênico para as células meristemáticas e F_1 de *A. cepa*, com uma diminuição significativa ao longo do processo de biorremediação;
- As amostras de LE 100% referentes aos períodos de 0 e 2 meses de biorremediação foram tóxicas para a espécie *E. andrei*, acarretando na mortalidade dos organismos expostos. As associações de LE não foram tóxicas para essa espécie (com exceção da LE 50% no tempo 0 meses), no entanto, assim como para algumas minhocas do tempo 0 e as do tempo 6 do LE 100%, foram encontradas alterações histopatológicas no intestino, incluindo a presença de vacúolos citoplasmáticos, espessamento do epitélio e núcleos picnóticos;
- Os extratos orgânicos das amostras iniciais de LE 100% (tempos 0, 2 meses) foram tóxicos para embriões de *D. rerio*, porém, após os 6 meses de atenuação natural essa toxicidade foi reduzida, enquanto que os extratos aquosos das amostras de LE 100%, nos tempos 0, 2 e 6 meses, induziram um efeito embriotóxico em *D. rerio*, o qual não é mais observado na amostra de 12 meses;
- A observação de uma resposta biológica para os ensaios com YCM-RYA e de expressão gênica do CYP1A indicam a presença de substâncias no LE com capacidade de se ligarem ao receptor Ah;
- Os solubilizados do lodo 100%, assim como as associações solo/lodo, inicial e com 2 meses de atenuação natural, mostraram-se potencialmente mutagênicos para células HepG2 mantidas em cultura. Essa toxicidade foi, contudo, reduzida após 6 meses de atenuação natural;
- Os químicos *m*- e *p*-cresol parecem não serem as únicas substâncias responsáveis pelos diferentes efeitos tóxicos observados nos organismos estudados, sugerindo que possa estar havendo uma interação química entre as outras substâncias presentes no LE;

- A indução de um efeito tóxico pelos extratos aquosos indicou que o LE estudado continha substâncias solúveis em água e que, quando no ambiente, podem contaminar as águas superficiais e subterrâneas;
- A combinação entre análises químicas e biológicas favorece uma melhor compreensão sobre os reais efeitos dos contaminantes ambientais sobre a biota exposta;
- A utilização de diferentes organismos testes, avaliando diferentes parâmetros biológicos, contribui para uma análise mais completa e significativa dos riscos associados com a disposição do LE no ambiente;
- Pela variedade de efeitos ocasionados pelo LE aos diferentes organismos testados, acreditamos que a sua disposição em solos agrícolas não deva ser realizada sem a realização de um tratamento de detoxificação;
- O período de 12 meses de atenuação natural foi suficiente para diminuir a toxicidade de associações de LE/solo em todos os organismos testados. Porém para o LE 100%, observamos toxicidade para alguns organismos neste tempo de atenuação natural. Desta forma alertamos que para este tipo de material, possivelmente seja necessário um tempo maior de biorremediação para a total eliminação de seu efeito tóxico;
- Em decorrência da redução significativa dos danos observados para os organismos expostos ao LE, o processo de atenuação natural é um método bastante eficiente e de baixo custo a ser empregado na diminuição do efeito tóxico em LE.

Esse trabalho abre novas perspectivas para melhor estudar as possibilidades de utilização do LE como recondicionante de solo, tais como buscar um maior aprimoramento no processo de biorremediação, pelo acréscimo, por exemplo, de agentes descompactantes como resíduos agroindustriais, e de agentes biológicos, que magnifiquem a atividade de biodegradação, visando um melhor aproveitamento do LE, uma diminuição no tempo de atenuação e um menor impacto que a disposição do LE pode promover no ambiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10006: Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004.

AGENDA 21 BRASILEIRA: AÇÕES PRIORITÁRIAS. Comissão de Políticas de Desenvolvimento Sustentável e da Agenda 21 Nacional, 167 p.

AGENDA 21 BRASILEIRA: AÇÕES PRIORITÁRIAS. Comissão de Políticas de Desenvolvimento Sustentável e da Agenda 21 Nacional. 2. ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004. 158 p.

AGUAYO, S.; MUNOZ, M.J.; DE LA TORRE, A.; ROSET, J.; DE LA PENA, E.; CARBALLO, M. Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. **Science of the Total Environment**, v.328, p.69-81, 2004.

ALEM SOBRINHO, P. Tratamento de esgoto e produção de lodo. In: TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; ALEM SOBRINHO, P.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P.C.T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J.; MARQUES, M.O. (Eds). **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: SABESP, 2001. p. 7-40.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2.ed. New York: Academic, 1999. 453p.

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

ALVARENGA, P.; PALMA, P.; GONÇALVES, A.P.; FERNANDES, R.M.; CUNHA-QUEDA, A.C.; DUARTE, E.; VALLINI, G. Evaluation of chemical and ecotoxicological

characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. **Environment International**, v.33, p.505-513, 2007.

ALVAREZ, V.V.H.; NOVAES, R.F.; BARROS, N.F.; CANTARUTTI, R.B.; LOPES, A.S. Interpretação dos resultados das análises de solos. In: RIBEIRO, A.C.; GUIMARAES, P.T.G.; ALVAREZ V.V.H. (Ed.). **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. p. 25-32.

ANDRADE, C. A. **Nitratos e metais pesados no solo e em plantas de Eucalyptus grandis após aplicação de biossólido da ETE de Barueri**. 1999. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1999.

ANDRADE, J.C.; ABREU, M.F. A utilização de resíduos na agricultura. In: ANDRADE, J.C.; ABREU, M.F. **Análise química de resíduos sólidos para monitoramento e estudos agroambientais.** Campinas: Instituto Agronômico, p. 1-10, 2006.

ANDREOLI, C.V. **Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura e sua influência em características ambientais no agrossistema**. 1999. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999. 278p.

ANDREOLI, C.V., GARBOSSA, L.H.P., LUPATINI, G., PEGORINI, E.S. Wastewater sludge management: a Brazilian approach**.** In: LEBLANC, R.J.; MATTHEWS, P.; RICHARD, R. (Eds) **Global atlas of excreta, wastewater sludge, and biosolids management: moving forward the sustainable and welcome uses of a global resource**, p.131-146, 2008.

ANDREOLI, R.; MANINI, P.; BERGAMASCHI, E.; MUTTI, A.; FRANCHINI, I.; NIESSEN, W.M.A. Determination of naphthalene metabolites in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v.847, pp. 9‑17, 1999.

APARICIO, I.; SANTOS, J.L.; ALONSO, E. Limitation of the concentration of organic pollutants in sewage sludge for agricultural purposes: A case study in South Spain. **Waste Manegement** v.29, p.1747-1753, 2009.

ARAÚJO, F.F.; GIL, F.C.; TIRITAN, C.S. Lodo de esgotona fertilidade do solo, na nutrição de *Brachiaria decumbens* e na atividade da desidrogenase. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.39, p.1-6, 2009.

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

BAMFORTH, S.M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 80, 723–736, 2005.

BARLIE, F.B. **Introduction to *in vitro* cytotoxicology:** mechanism and methods. Boca Raton: CRC press, 1994.

BDOUR, A.N.; HAMDI, M.R.; TARAWNEH, Z. Perspectives on sustainable wastewater treatment technologies and reuse options in the urban areas of the Mediterranean region. **Desalination**, v.237, p.162–174, 2009.

BELANGER, S.E.; BALON, E.K.; RAWLINGS, J.M. Saltatory ontogeny of fishes and sensitive early life stages for ecotoxicology tests. **Aquat. Toxicol**., v.97, p. 88-95, 2010.

BELMESKINE, H.; HADDAD, S.; VANDELAC, L.; SAUVÉ, S.; FOURNIER, M. Toxic effects of PCDD/Fs mixtures on *Eisenia andrei* earthworms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.80, p.54-59, 2012.

BERTHEUSSEN, K., YOUSEF, M.I., FIGENSCHAU, Y. A new sensitive cell culture test for the assessment of pesticide toxicity. **Journal of Environment Science and Health Part B**, v.32, p.195-211, 1997.

BERTON, R. S.; CAMARGO, O. A.; VALADARES, J. M. A. S. Absorção de nutrientes pelo milho em resposta à adição de lodo de esgoto a cinco solos paulistas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.13, p.187-192, 1989.

BERTONCINI, E.I. & MATTIAZZO, M.E. Lixiviação de metais pesados em Latossolo tratado com lodo de esgoto e em plantas de cana-de-açúcar. **R. Bras. Ci. Solo**, V.23, P.737-744, 1999.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 2000. 312p.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. A disposição de lodo de esgoto em solo agrícola. In: **Lodo de esgoto: impactos ambientais na agricultura. Jaguariúna**: Embrapa Meio Ambiente, 2006. 349p.

BEZRUKOV, V. F.; LAZARENKO, L. M. Environmental impact on age-related dynamics of karyotypical instability in plants. **Mutation Research**, v.520, p.113-118, 2002.

BIANCHI-AMBRÓSIO, J. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de 2 classes de agrotóxicos utilizados em cultura de cana-de-açúcar no estado de São Paulo-Brasil.** 2012. 137p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, 2012.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.826-833, 2011.

BISPO, A.; CLUZEAU, D.; CREAMER, R.; DOMBOS, M.; GRAEFE, U.; KROUH, P.H.; SOUSA, J.P.; PERES, G.; RUTGERS, M.; WINDING, A.; RÖMBKE, J. Indicators for monitoring soil biodiversity. **Integr. Environ. Assess. Manag.**, v.5, n.4, p.717-719, 2009.

BORGES, M.R.; COUTINHO, E.L.M. Metais Pesados do Solo após Aplicação de Biossólido II - Disponibilidade. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p. 557-568, 2004.

BOTHNER, M.H.; TAKADA, H.; KNIGHT, I.T.; HILL, R.T.; BUTMAN, B.; FARRINGTON, J.W.; COLWELL, R.R.; GRASSLE, J.F. Sewage contamination in sediments beneath a deep-ocean dump site off New York. **Marine Environmental Research**, v.38, p.43-59, 1994.

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

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 375, de 29 de agosto de 2006**. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Brasília, 2006.

BRIX, R.; NOGUEROL, T.-N.; PIÑA, B.; BALAAM, J.; NILSEN, A.J.; TOLLEFSEN, K.-E.; LEVY, W.; SCHRAMMD, K.-W.; BARCELÓ, D. Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. **Environment International**, v.36, p.361–367, 2010.

BRUSICK, D.J. **Principles of Genetic Toxicology**, New York: Plenum Press, 1987. 284 p.

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

CARDOZO, T. R; ROSA D. P.; FEIDEN, I. R.; ROCHA, J. A. V.; OLIVEIRA, N. C. D.; PEREIRA, T. S.; PASTORIZA, T. F.; MARQUES, D. M.; LEMOS, C. T.; TERRA, N. R.; VARGAS, V. M. F. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutation Research**, v.603, p. 83-96, 2006.

CARITÁ, R; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v.72, p.722-725, 2008.

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

CARVALHO, A.R.; OLIVEIRA, M.V.C. **Princípios básicos do saneamento do meio.** 10. ed. São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2010**,** 400p.

CARVALHO, T.U. Cultura de Células Animais. In: BENCHIMOL, M. (Org.). **Métodos de Estudo da Célula**. Rio de Janeiro: FENORTE/UENF, cap.2, 1996, p. 45-58.

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

CAVALLET, L. E.; SELBACH, P. A. Populações microbianas em solo agrícola sob aplicação de lodos de curtume. **R. Bras. Ci. Solo**, v.32, p.2863-2869, 2008.

CESAR, R.; ALVARO, T.; SILVA, M.; COLONESE, J.; MOREIRA, 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**, v.24, p.41-49, 2010.

CESAR, R.G.; EGLER, S.G.; POLIVANOV, H.; CASTILHOS, Z.C.; RODRIGUES, A.P.C.; ARAÚJO, P.A. Biodisponibilidade de mercúrio, zinco e cobre em distintas frações granulométricas de solo contaminado utilizando oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 31, n. 2, p. 33-41, 2008.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Qualidade das águas superficiais do Estado de São Paulo 2012**. São Paulo: CETESB, 2013, 370p.

CHAUHAN, L.K.S.; SAXENA, P.N.; GUPTA, S.K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*, **Environ. Exp. Bot.**, v.42, p.181-189, 1999.

CHELINHO, S.; MOREIRA-SANTOS, M.; LIMA, D.; SILVA, C.; VIANA, P.; ANDRÉ, S.; LOPES, I.; RIBEIRO, R.; FIALHO, A.M.; VIEGAS, C.A.; SOUSA, J.P. Cleanup of atrazine-contaminated soils: ecotoxicological study on the efficacy of a bioremediation tool with *Pseudomonas* sp. ADP. **J. Soils Sediments**, v.10, p.568-578, 2010.

CHEN, C.; ZHOU, Q.; LIU, S.; XIU, Z. Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. **Chemosphere**, v.83, p.1147-1154, 2011.

CHEN, H.; YAN, S.H.; YE, Z.L.; MENG, H.J. ZHU, Y.G. Utilization of urban sewage sludge: Chinese perspectives. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v.19, p.1454–1463, 2012.

CHEN, Y.; YU, G.; CAO, Q.; ZHANG, H.; LIN, Q.; HONG, Y. Occurrence and environmental implications of pharmaceuticals in Chinese municipal sewage sludge. **Chemosphere**, *in press*, 2013.

CHENON, P.; GAUTHIER, L.; LOUBIÈRES, P.; SÉVERAC, A.; DELPOUX, M. Evaluation of the genotoxic and teratogenic potential of a municipal sludge and sludge-amended soil

using the amphibian *Xenopus laevis* and the tobacco: *Nicotiana tabacum* L. var. *xanthi* Dulieu. **The Science of the Total Environment**, v.301, p.139–150, 2003.

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. **R. Bras. Ci. Solo**, v.32, p.653-662, 2008.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. **Water Air Soil Pollut.**, v.224, p.1-14, 2013.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; FRANCISCO, A.; FONTANETTI, A.S. Biosolid soil application: toxicity tests under laboratory conditions. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2012, p.1-9, 2012.

CLARKE, B.O.; SMITH, S.R. Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. **Environment International**, v. 37, p. 226-247, 2011.

CORRÊA, R.S.; FONSECA, Y.M.F.; CORRÊA, A.S. Produção de biossólido agrícola por meio da compostagem e vermicompostagem de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental,** v.11, p.420–426, 2007.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J.F.; FÉRARD, J.F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium*/*Vicia*-micronucleus and *Tradescantia*-micronucleus assays, **Mutation Research**, V.426, p.167-171, 1999.

DAMASCENO, S; CAMPOS, J. R. Caracterização de lodo de estação de tratamento de esgotos sanitários para uso agrícola. **Asociación Peruana de Ingenierya Sanitaria y Ambiental**; AIDIS. Gestión ambiental em el siglo XXI. Lima, APIS, 1998.

DEZOTTI, M.; BASSIN, J.P.; BILA, D.M.; AZEVEDO, E.B.; VALEMTIM, A.C.S. **Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos**. E-Papers, Rio de Janeiro-RJ. 2008. 360p.

DOMÍNGUEZ, J. State of the art and new perspectives on vermicomposting research. In: Edwards, C.A. (Ed.), **Earthworm Ecology**, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 401-424, 2004.

DONNELLY, K.C.; THOMAS, J.C.; ANDERSON, C.S.; BROWN, K.W. The influence of application rate on the bacterial mutagenicity of soil amended with municipal sewage sludge. **Environmental Pollution**, v.68, p.147-159, 1990.

EGITO, L. C. M.; MEDEIROS, M. G.; MEDEIROS, S. R. B.; AGNEZ-LIMA, L. F. Cytotoxic and genotoxic potential os surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.435-441, 2007.

EGLER, S.G.; RODRIGUES-FILHO, S.; VILLAS-BÔAS, R.; BEINHOFF, C. Evaluation of mercury pollution in cultivated and wild plants from two small communities of the Tapajós Gold Mining Reserve, Pará State, Brazil. **Science of the Total Environment**, v.368, p. 424-433, 2006.

EL-DEMERDASH, F.M.; YOUSEF, M.I.; ELAGAMY, E.I. Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (*in vitro*). **Journal of Environment Science and Health Part B**, v.36, p.29-42, 2001.

ENGWALL, M.; HJELM, K. Uptake of dioxin-like compounds from sewage sludge into various plant species - assessment of levels using a sensitive bioassay. **Chemosphere**, v.40, p.1189-1195, 2000.

EPSTEIN, E. **The Science of Composting**. Technomic Pub. Co., Lancaster PA, 1997, 487 p.

ERIKSEN, G.; AMUNDSEN, C.; BERNDORF, A.; EGGEN, T.; GRAVE, K.; HALLING-SØRENSEN, B.; KAĽLQVIST, T.; SOGN, T.; SVERDRUP, L. Risk assessment of contaminants in sewage sludge applied on Norwegian soils. **Norwegian Scientific Committee for Food Safety**, p.1−244, 2009.

FARIA, L.C. **Uso do lodo de esgoto (biossólido) como fertilizante em eucaliptos: demanda, potencial e crescimento das árvores e viabilidade econômica**. 2007. 124f. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP, Piracicaba, 2007. 124f.

FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicol. Lett.**, v.140-141, p.353-365, 2003.

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

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

FERNANDEZ, M.P.; NOGUEROL, T.N.; LACORTE S.; BUCHANAN, I.; PIÑA, B. Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.393, p.957-968, 2009.

FERRARI, A.L. **Variabilidade e tendência da temperatura e pluviosidade nos municípios de Pirassununga, Rio Claro, São Carlos E São Simão (SP): estudo sobre mudança climática de curto prazo em escala local.** 2012. 156f. Universidade de São Paulo: Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – São Carlos, 2012.

FERRAZ, E.R.A.; UMBUZEIRO, G.A.; DE-ALMEIDA, G., CALOTO-OLIVEIRA, A.; CHEQUER, F.M.D.; ZANONI, M.V.B.; DORTA, D.J.; OLIVEIRA, D.P. Differential toxicity of disperse red 1 and disperse red 13 in the Ames test, HepG2 cytotoxicity assay, and *Daphnia* acute toxicity test. **Environmental Toxicology**, 2010.

FERREIRA, A. C.; ANDREOLI, C. V. Riscos associados ao uso do lodo de esgoto. In: LARA, A. I.; FERREIRA, A. C.; ANDREOLI, C. V.; PEGORINI, E. S.; IHLENFELD, R. G. K. (Org.). **Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura**. SANEPAR/PROSAB, 1999, 98p.

FIA, R.; MATOS, A.T.; AGUIRRE, C.I. Produtividade e concentração de nutrients e metais pesados em milho adubado com doses crescentes de lodo de esgoto caleado. **Engenharia na Agricultura**, v.14, p.39-50, 2006.

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

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v.160, p.171-177, 2006.

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

GIANICO, A.; BRAGUGLIA, C.M.; MASCOLO, G.; MININNI, G. Partitioning of nutrients and micropollutants along the sludge treatment line: a case study. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v.20, p.6256-6265, 2013.

GIUDICE, B.D.; YOUNG, T.M. Mobilization of endocrine-disrupting chemicals and estrogenic activity in simulated rainfall runoff from land-applied biosolids. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.30, p.2220-2228, 2011.

GODOY, J.A.P.; FONTANETTI, C.S. Diplopods as bioindicators of soils: analysis of midgut of individuals maintained in substract containing sewage sludge. **Water, Air and Soil Pollution**, v.210, p.389-398, 2010.

GOMES, D.R.; CALDEIRA, M.V.W.; DELAMELINA, W.M.; GONÇALVES, E.O.; TRAZZI, P.A. Lodo de esgoto como substrato para produção de mudas de *Tectona grandis* L. **Cerne**, v.19, p.123-131, 2013.

GRANT, W.F. Chromossome aberrations in plants as a monitoring system. **Environmental Health Perspectives**, v.27, p.37-43, 1978.

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

GRANT, W. F. The present status of higher plane bioassay for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v.310, p.175-185, 1994.

GRANT, W.F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations-a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals, **Mutation Research**, v.426, p.107-112, 1999.

GRAY, N.F. Sludge treatment and disposal. In: GRAY, N.F. **Water Technology.** An Introduction for Environmental Scientists and Engineers (Third Edition). Elsevier, 2010. p. 645-685.

GRISOLIA, C.K.; OLIVEIRA, A.B.B.; BONFIN, H.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, p.334-338, 2005.

GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 426, p. 183-188, 1999.

GROVER, I.S.; DHINGRA, A.K.; ADHIKARI, N.; LADHAR, S.S. Genotoxicity of pesticides, in: M.L. Mendelsohn, R.J. Albertini (Eds.), **Mutation and the Environment**: Part E, Wiley Liss, New York, 1990, p.91–106.

GRUMIAUX, F.; DEMUYNCK, S.; SCHIKORSKI, D.; LEMIÈRE, S.; LEPRÊTE, A. Assessing the effects of FBC ash treatments of metal-contaminated soils using life history traits and metal bioaccumulation analysis of the earthworm *Eisenia Andrei*. **Chemosphere**, v.79, p.156-161, 2010.

GUILLOUZO, A. Liver cells models *in vitro* toxicology. **Environmental Health Perspectives**, v.106, p.511-532, 1998.

GUIMARÃES, J.R.D.; MEILI, M.; HYLANDER, L.D.; SILVA, E.D.E.; ROULET, M.; MAURO, J.B. N.; DE LEMOS, R.A. Mercury net methylation in five tropical flood plain regions of Brazil: High in the root zone of floating macrophyte mats but low in surface sediments and flooded soils, **Sci. Total Environ**., v.261, p.99-108, 2000.

GUPTA, R.D.; CHAKRAVORTY, P.P.; KAVIRAJ, A. Susceptibility of epigeic earthworm *Eisenia fetida* to agricultural application of six insecticides. **Chemosphere**, v.84, p.724-726, 2011.

GUSTAVSSON, L.; HOLLERT, H.; JÖNSSON, S.; van BAVEL, B.; ENGWALL, M. Reed beds receiving industrial sludge containing nitroaromatic compounds effects of outgoing water and bed material extracts in the umu-C genotoxicity assay, DR-CALUX assay and on early life stage development in zebrafish (*Danio rerio*). **Env Sci Pollut Res**, v.14, n.3, p.202-211, 2007.

HALLARE, A.V.; KOSMEHL, T.; SCHULZE, T.; HOLLERT, H.; KOEHLER, H.-R.; TRIEBSKORN, R. Assessing the severity of sediment contamination in Laguna Lake,

Philippines, using a sediment contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Sci. Total. Environ.**, v. 347, p. 254–271, 2005.

HARGREAVES, J.C.; ADL, M.S.; WARMAN, P.R. A review of the use of composted municipal solid waste in agriculture. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.123, p.1–14, 2008.

HARRISON, E.Z.; OAKES, S.R.; HYSELL, M.; HAY, A. Organic chemicals in sewage sludges. **Sci. Total Environ**, v. 367, p. 481–497, 2006.

HELALEH, M.I.H.; AL-OMAIR, A.; NISAR, A.; GEVAO, B. Validation of various extraction techniques for the quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1083, p. 153-160, 2005.

HILL, A.J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R.E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicol Sci**, v. 86, n.1, p. 6-19, 2005.

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

HOSHINA, M.; MARIN-MORALES, M.A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.2090-2095, 2009.

HOSSAIN, M. K., STREZOV, V., NELSON, P. F. Thermal characterisation of the products of wastewater sludge pyrolysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v.85, p.442-446, 2009.

HUE, N.V. Sewage sludge. In: RECHCIGL, J.E., ed. **Soil amendments and environmental quality**. Boca Raton, CRC Press, 1995. p.199-168.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa nacional de saneamento básico 2008.** Rio de Janeiro: IBGE, 2010. 431 p. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb/default.shtm>. Acesso em: maio 2012.

ISO, 15088:2007. **Water quality - determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*)**. 2007.

JARVIS, A.S.; HONEYCUTT, M.E.; MCFARLAND, V.A.; BULICH, A.A.; BOUNDS, H.C. A comparison of the Ames assay and Mutatox in assessing the mutagenic potential of contaminated dredged sediment. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.33, p.193-200, 1996.

JERGENTZ, S.; MUGNI, H.; BONETTO, C.; SCHULZ, R. Runoff-related endosulfan contamination and aquatic macroinvertebrate response in rural basins near Buenos Aires, Argentina. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.46, p.345-352, 2004.

JUNQUEIRA, L.C., JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. Livraria Editora Santos, São Paulo, 1983.

KADO, N.Y.; LANGLEY, D.; EISENSTADT, E. A simple modification of *Salmonella* liquid incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. **Mutation Research**, v.121, p.25-32, 1983.

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, p.1186-1195, 2012.

KIMMEL, C.B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Dev. Dyn.**, v.203, n.3, p.253-310, 1995.

KINNEY, C.A.; CAMPBELL, B.R.; THOMPSON, R.; FURLONG, E.T.; KOLPIN, D.W.; BURKHARDT, M.R.; ZAUGG, S.D.; WERNER, S.L.; HAY, A.G. Earthworm bioassays and seedling emergence for monitoring toxicity, aging and bioaccumulation of anthropogenic waste indicator compounds in biosolids–amended soil. **Science of the Total Environment**, v.433, p.507-515, 2012.

KLEE, N.; GUSTAVSSON, L.; KOSMEHL, T.; ENGWALL, M.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T.; HOLLERT, H. Changes in toxicity and genotoxicity of industrial sewage sludge samples containing nitro- and amino-aromatic compounds following treatment in bioreactors with different oxygen regimes. **Environ Sci Pollut Res**, v.11, n.5, p. 313-320, 2004.

KNASMÜLLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W.W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B.J. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants: Current state of knowledge. **Toxicology**, v.198, p.315-328, 2004.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; ADAYAPALAM, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Res**., v.402, p.185–202, 1998.

KNOWLES, B.B.; HOWE, C.C.; ADEN, D.P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. **Science**, v. 209, p. 497-499, 1980.

KULLING, D., STADELMANN, F., HERTER, U. **Sewage sludge – fertilizer or waste?** UKWIR Conference, Brussels, 2001.

KUMMROW, F.; RECH, C.M.; COIMBRÃO, C.A.; ROUBICEK, D.A.; UMBUZEIRO, G.A. Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples. **Mutation Research**, v. 541, p. 103-113, 2003.

KURÁS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* Test induced by barck water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Chemosphere**, v.107, p.211-221, 2006.

LAALE, H.W. The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research: A literature review. **J. Fish. Biol.**, v.10, p.121-173, 1977.

LACHANCE, B.; RENOUX, A.Y.; SARRAZIN, M.; HAWARI, J.; SUNAHARA, G.I. Toxicity and bioaccumulation of reduced TNT metabolites in the earthworm *Eisenia andrei* exposed to amended forest soil. **Chemosphere**, v.55, p.1339-1348, 2004.

LAMMER, E., CARR, G., WENDLER, K., RAWLINGS, J., BELANGER, S., BRAUNBECK, T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comp. Biochem. Physiol.**, Part C, v.149, p.196-209, 2009.

LANDRUM, M.; CAÑAS, J.E.; COIMBATORE, G.; COBB, G.P.; JACKSON, W.A.; ZHANG, B.; ANDERSON, T.A. Effects of perchlorate on earthworm (*Eisenia fetida*) survival and reproductive success. **Science of the Total Environment**, v.363, p.237–244, 2006.

LANGDON, C.J.; PIEARCE, T.G.; MEHARG, A.A.; SEMPLE, K.T. Interactions between earthworms and arsenic in the soil environment: a review. **Environmental Pollution**, v.124, p.361-373, 2003.

LANNO, R.; WELLS, J.; CONDER, J.; BRADHAM, K.; BASTA, N. Bioavailability of chemicals in soil for earthworms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.57, p.39-47, 2004.

LEBLANC, R. J.; MATTHEWS, P.; RICHARD, R. P. Global atlas of excreta, wastewater sludge, and biosolids management: moving forward the sustainable and welcome uses of a global resource welcome uses of a global resource. Nairobi, Kenya: United Nations Human Settlements Programme (UN-HABITAT), 2008. 608p. Disponível em: <http://esa.un.org/iys/docs/san_lib_docs/habitat2008.pdf>. Acesso em: 19 out 2011.

LEMAINSKI, J.; SILVA, J.E. Avaliação agronômica e econômica da aplicação de biossólido na produção de soja. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.41, p.1477-1484, 2006.

LEME, D.M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R.; SEHR, A.; SKERSWETAT, M.; MARCHI, M.R.R.; MACHADO, M.C.; OLIVEIRA, D.P.; MARIN-MORALES, M.A. Cytotoxicity of

water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.2148-2155, 2011.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v.682, p.71–81, 2009.

LEMOS M, VAN GESTEL C, SOARES A. Endocrine disruption in a terrestrial isopod under exposure to bisphenol A and vinclozolin. **J. Soils Sed.**, v.9, p.492–500, 2009.

LEONARD, A. Management of wastewater sludge's: a hot topic at the European level **Journal Residues Science Technology**, v.8, p.38, 2011.

LEVAN, A. Cytological reactions induced by inorganic salt solutions. **Nature**, v.156, p. 751-752, 1945.

LEWINSKA, A.; WNUK, M.; SLOTA, E.; BARTOSZ, G. Total anti-oxidant capacity of cell culture media. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology,** v.34, p.781-786, 2007.

LIU, J.; SONG, E.; LIU, L.; MA, X.; TIAN, X.; DONG, H.; SONG, Y. Polychlorinated biphenyl quinone metabolites lead to oxidative stress in HepG2 cells and the protective role of dihydrolipoic acid. **Toxicology in Vitro**, v.26, p.841–8, 2012.

LIU, X.; HU, C.; ZHANG, S. Effects on earthworm activity on fertility and heavy metals bioavailability in sewage sludge. **Environment International**, v.31, p. 874-879, 2005.

LOFRANO, G.; BROWN, J. Wastewater management through the ages: A history of mankind. **Science of the Total Environment**, v.408, p.5254–5264, 2010.

LOPES, J.C.; RIBEIRO, L.G.; ARAÚJO, M.G.; BERALDO, M.R.B.S. Produção de alface com doses de lodo de esgoto. **Horticultura Brasileira**, v.23, p.143-147, 2005.

LOPES, M.A.J.B.M. **Incorporação de lodo de esgoto e seus efeitos sobre alguns atributos do solo cultivado com rabanete (*Raphanus sativus* L.)**. 2008. 99f. Universidade Católica de Pernambuco: Dissertação (Mestrado) – Recife, 2008.

LOURENÇO, J.I.; PEREIRA, R.O.; SILVA, A.C.; MORGADO, J.M.; CARVALHO, F.P.; OLIVEIRA, J.M.; MALTA, M.P.; PAIVA, A.A.; MENDO, S.A.; GONÇALVES, F.J. Genotoxic endpoints in the earthworms sub-lethal assay to evaluate natural soils contaminated by metals and radionuclides. **Journal of Hazardous Materials**, v.186, p.788-795, 2011.

LOURENÇO, R.S. **Utilização de lodo de esgoto aeróbio e calado em florestas**. Embrapa-PA, p.1-3, 1997 (Comunicado técnico, 18).

MA, T.H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium*/*Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v.334, p.185-195, 1995.

MAIA C.E.; MORAIS E.R.C.; MEDEIROS J.F. Capacidade de campo, ponto de murcha permanente e água disponível para as plantas em função de doses de vermicomposto. **Caatinga**, v.18, n.3, p.195-199, 2005.

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

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTII, 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, p.148-158, 2006.

MATSUMOTO, S.T.; RIGONATO, J.; MANTOVANI, M.S.; MARIN-MORALES, M.A. Evaluation of the genotoxic potential due to the action of an effluent contaminated with chromium, by the comet assay in CHO-K1 cultures. **Caryologia**, v.58, n.1, p.40-46, 2005.

MAZIVIERO, G.T. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de lodo de esgoto por meio dos sistemas-teste *Allium cepa* e *Tradescantia pallida***. 2011. 115f. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, 2011.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v.85, p.13-18, 2011.

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; DE ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 20, p. 4334-4340, 2010.

McCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsoma test: Assay of 300 chemicals. **Medical Science**, v.72, p.5135-5139, 1975.

MCGEEHAN, S.L. Impact of waste materials and organic amendments on soil properties and vegetative performance. **Applied and Environmental Soil Science**, p.1-11, 2012.

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

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

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

MIGID, A.H.M.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent, **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, V.66, p.57-64, 2007.

MILLER III, CA. Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. Activation of transcription by indole compounds. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 32824–32829, 1997.

MILLS, M.A.; BONNER, J.S.; MCDONALD, T.J.; PAGE, C.A.; AUTENRIETH, R.L. Intrinsic bioremediation of a petroleum-impacted wetland. **Marine Pollution Bulletin**, v.46, p.887-899, 2003.

MOHAMED, A.E.; RASHED, M.N.; MOFTY, A. Assessment of essential and toxic elements in some kinds of vegetables. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, p. 251-260, 2003.

MOLINOS-SENANTE, M.; HERNANDEZ-SANCHO, F.; SALA-GARRIDO, R. Benchmarking in wastewater treatment plants: a tool to save operational costs. **Clean Techn. Environ. Policy**, 2013. doi: 10.1007/s10098-013-0612-8.

MORAES, D.S.L. **Avaliação dos potenciais tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de águas ambientais de Corumbá-MS em raízes de *Allium cepa*.** 2000. 158 f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2000.

MORALES, M.M. Métodos alternativos a utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Experimentação Animal**, p.33-36, 2008.

MOREIRA, R.; SOUSA, J.P.; CANHOTO, C. Biological testing of a digested sewage sludge and derived composts. **Bioresource Technology**, v.99, n.17, p.8382–8389, 2008.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v.455, p.29–60, 2000.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods**., v.65, p.55-63, 1983.

MURTY, A.S. **Toxicity of pesticides to fish**. Boca Raton: CRC Press, 1986. v. 1, 177p.

NAGEL, R. DarT: the embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*—a general model in ecotoxicology and toxicology. **Altex**, v.19, p.38-48, 2002.

NAJI-ALI, F.; HASSPIELER, B.M.; HAFFNER, D.; ADELI, K. Human bioassays to assess environmental genotoxicity: development of a DNA repair assay in HepG2 cells. **Clinical Biochemistry**, v. 27, p. 44-448, 1994.

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

NATAL-DA-LUZ, T.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J.P. Avoidance tests with collembolan and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.23, p.2188–2193, 2004.

NATAL-DA-LUZ, T.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J.P. Avoidance tests in site-specific risk assessment - influence of soil properties on the avoidance response of Collembola and earthworms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.27, p.1112-1117, 2008.

NATAL-DA-LUZ, T.; TIDONA, S.; JESUS, B.; MORAIS, P.V.; SOUSA, J.P. The use of sewage sludge as soil amendment. The need for an ecotoxicological evaluation. **J Soils Sediments**, v. 9, p. 246-260, 2009.

NATAL-DA-LUZ, T.; AMORIM, M.J.B.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J.P. Avoidance tests with earthworms and springtails: defining the minimum exposure time to observe a significant response. **Ecotox Environ Safe**, v.71, p.545-551, 2008.

NATARAJAN, A.T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, v.6, p.399- 403, 1991.

NEUHAUSER, E.F.; LOEHR, R.C.; MILLIGAN, D.L.; MALECKI, M.R. Toxicity of metals to the earthworms *Eisenia fetida*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 1, p. 149-152, 1985.

NOGAROL, L.R.; FONTANETTI, C.S. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: tissular responses of the midgut. **Micron**, v.41, p.239-246, 2010.

NOGUEROL, T.N.; BORONAT, S.; JARQUE, S.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. **Talanta**, v.69, n.2, p. 351-358, 2006a.

NOGUEROL, T.N.; BORONAT, S.; CASADO, M.; RALDÚA, D.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 385, p. 1012–1019, 2006b.

OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT. Alternatives to animal use in research, testing and education. **Ota Publ.** No OTA-BA-273. Washington DC. US. Government Printing Office. 1986.

OLIVEIRA, D.P.; CARNEIRO, P.A.; SAKAGAMI, M.K.; ZANONI, M.V.B.; UMBUZEIRO, G.A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent – Identification of the mutagenic components. **Mutation Research**, v.626, p.135-142, 2007.

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

OLIVEIRA, F.C., MELO, W.J.; PEREIRA, G.T.; MELO, V.P.; MELO, G.M.P.H. Heavy metals in oxisoils omended with biosolids and cropped with maize in a long-term experiment. **Scientia Agricola**, v. 62, n.4, p.381-388, 2005.

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

OMASA T.; YAMANAKA, M.; TANIMURA, N.; KATAKURA, Y.; KISHIMOTO, M.; SUGA, K.; ENOSAWA, S. Expression and amplification of glutamine synthetase gene endows HepG2 cells with ammonia-metabolizing activity for bioartificial liver support system. Enzyme and Microbial Technology, v.35, p.519-52, 2004.

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

PATHAK, A.; DASTIDAR, M.G.; SREEKRISHNAN, T.R. Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: A review. **Journal of Environmental Management**, v.90, p.2343-2353, 2009.

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

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry**: Theoretical and applied. J&A. London, 1985.

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**, v. 17, p. 89-188, 2010.

PEREZ, D.G.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the toxic Potential of sewage sludge in the Midgut of the Diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 218, p.1–8, 2010.

PETERSON, R.E.; THEOBALD, H.M.; KIMMEL, G.L. Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 23, n.3, p.283-335, 1993.

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

PIÑA, B.; BORONAT, S.; CASADO, M.; OLIVARES, A. Recombinant yeast assays and gene expression assays for the analysis of endocrine disruption. **Hdb. Env. Chem.**, v.5J, p.69-113, 2009.

PIOLA, L.; FUCHS, J.; ONETO, M.L.; BASACK, S.; KESTEN, E.; CASABÉ, N. Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions. **Chemosphere**, v.91, p.545-551, 2013.

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

POHREN, R.S.; ROCHA, J.A.V.; LEAL, K.A.; VARGAS, V.M.F. Soil mutagenicity as a strategy to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. **Environment International**, v.44, p.40-52, 2012.

PRADO, H. Principais solos do Estado de São Paulo e caracterização dos experimentos de avaliação de cultivares de milho. In: DUARTE A.P.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z. **Fatores bióticos e abióticos em cultivares de milho e estratificação ambiental.** Campinas: IAC, 2000. p. 101-118 (Boletim Científico 05).

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemos. La formatión de intercâmbios entre cromátidas hermanas.** 1978. 276f. Tese (Doutorado), Universidade de Complutense, Madrid.

RABELLO-GAY, M. N. Testes com organismos superiores. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Eds.). **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e critérios de avaliação**, Ribeirão Preto – SP. Sociedade Brasileira de Genética, 1991, p. 59-75.

RANDERATH, K.; RANDERATH, E.; ZHOU, G.D.; SUPONPONG, N.; HE, L.Y.; MCDONALD, T.J.; DONNELLY, K.C. Genotoxicity of complex PAH mixtures recovered from contaminated lake sediments as assayed by three different methods. **Environ. Mol. Mutagen.** v.33, p.303–312, 1999.

RANGEL, O.J.P; SILVA, C.A.; BETTIOL, W.; DYNIA, J.F. Efeito de aplicações de lodo de esgoto sobre os teores de metais pesados em folhas e grãos de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p.583-594, 2006.

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

RANK, J.; NIELSEN, M.H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v.118, p.49-53, 1993.

RISER-ROBERTS, E. **Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological, Physical, and Chemical Processes**, CRC Press LLC, Boca Raton, FL. 1998. p.542.

RODGER, G.K.; DAVIES, I.M.; MCHENERY, J.G. Effects of sewage sludge disposal on the sediment at the Garroch Head dump site, Firth of Clyde, Scotland. **The Science of the Total Environment**, v.119, p.133-156, 1992.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROIG, N.; SIERRA, J.; NADAL, M.; MARTÍ, E.; NAVALÓN-MADRIGAL, P.; SCHUHMACHER, M.; DOMINGO, J. L. Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 425, p. 99-109, 2012.

ROOS, P. H.; TSCHIRBS, SEBASTIAN; PFEIFER, FRANK; WELGE, P.; HACKC, A.; WILHELM, M.; BOLT, H. M. Risk potentials for humans of original and remediated PAH-contaminated soils: application of biomarkers of effect. **Toxicology**, v. 205, p.181-194, 2004.

ROS, M., HERNANDEZ, M.T., GARCIA, C. Bioremediation of soil degraded by sewage sludge: effects on soil properties and erosion losses. **Environ. Manage.**, v.31, p.741–747, 2003.

RUBINSTEIN, A.L. Zebrafish assays for drug toxicity screening. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol**., v.2, p.231-240, 2006.

SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; MIGUEL, E.; TADEO, J.L. Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid. **Journal of Chromatography A**, v.1148, p.219-227, 2007.

SANCHEZ, M.A.; CAMPBELL, L.M.; BRINKER, F.A.; OWENS, D. Attenuation the natural way. A former wood-preserving site offers a case study for evaluating the potential of monitored natural attenuation. **Industrial Wastewater,** v.5, p.37‑42, 2000.

SÃO PAULO (São Paulo). Secretaria de Energia, Recursos Hídricos e Saneamento. SABESP. **Tratamento de Esgotos – Região Metropolitana de São Paulo – Disposições Finais**, 2006. Disponível em: <www.sabesp.com.br/o_que_fazemos/coleta_e_tratamento/metropolitano_disposições.htm>. Acesso em outubro de 2009.

SÃO PAULO (São Paulo). Secretaria de Energia, Recursos Hídricos e Saneamento. SABESP. **Sanegran**: **saneamento da Grande São Paulo**. São Paulo: Superintendência de Divulgação, 1979. 16p.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v.136, p.187-195, 2005.

SBMCTA. SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGÊNESE E TERATOGÊNESE AMBIENTAL. São Paulo, 2004. UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS, V.M.F.; FELZENSZWALB, I.; HENRIQUERS, J.A.P.; VARANDA, E. **Orientações básicas**

de execução de teste de mutagenicidade para proteção da saúde humana e do meio ambiente. Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames, Ensaio *Salmonella*/microssoma). (Série de Documentos, 1). Disponível em <http://www.sbmcta.org.br>. Acesso em: julho de 2010.

SELDERSLAGHS, I.W.; VAN ROMPAY, A.R.; DE COEN, W.; WITTERS, H.E. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. **Reprod. Toxicol**., v. 28, p. 308-320, 2009.

SETH, C.S.; MISRA, V.; CHAUHAN, L.K.S.; SINGH, R.R. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and comet assay approach. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.71, p.711-716, 2008.

SILVA, F.C. **Uso agronômico de lodo de esgoto: efeitos em fertilidade do solo e qualidade da cana-de-açúcar.** 1995. 149 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

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

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

SILVÉRIO, L. Uso agrícola do lodo de esgoto, da material orgânica do lixo urbano e de resíduos industriais. **O Agronômico**, v.56, p.5-8, 2004.

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

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

SINHA, S.; CHATTOPADHYAY, P.; PAN, I.; CHATTERJEE, S.; CHANDA, P.; BANDYOPADHYAY, D.; DAS, K.; SEN, S.K. Microbial transformation of xenobiotics for environmental bioremediation. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p.6016-6027, 2009.

SINZ, M.W. *In vitro* metabolism: hepatocytes. In: Woolf, T.F. (Ed.), **Handbook of Drug Metabolism**. New York:Marcel Dekker, 1999, p.401-424.

SNIS – Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. **Diagnóstico dos serviços de água e esgoto – 2010.** Ministério das Cidades – Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, Brasília, 2012. 616p.

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

SRIVASTAVA, K.; MISHRA, K.K. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*, **Pest. Biochem. Physiol.**, v.93, p.8-12, 2009.

STRAALEN, N.M.; DONKER, M.H.; VIJVER, M.G.; GESTEL, C.A.M. Bioavailability of Contaminants Estimated from Uptake Rates into Soil Invertebrates. **Environmental Pollution**, v.136, p.409-417, 2005.

STRMAC, M., OBEREMM, A., BRAUNBECK, T. Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae. **J. Fish Biol.**, v.61, p.24-38, 2002.

TANG, X.; ZHAO, L. The development of sludge disposal strategy. **Environ. Sci. Manage.**, v.30, p.68‑70, 2005.

TAS, D.O. Respirometric assessment of aerobic sludge stabilization. **Bioresour Technol**, v. 101, p. 2592–2599, 2010.

TSAKOU, A.; ROULIA, M.; CHRISTODOULAKIS, N.S. Growth of cotton plants (*Gossypium hirsutum*) as affected by water and sludge from a sewage treatment plant: II. Seed and fiber yield and heavy metal accumulation. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.66, p.743-747, 2001.

TSAMOU, M.; JENNEN, D.G.J.; CLAESSEN, S.M.H.; MAGKOUFOPOULOU, C.; KLEINJANS, J.C.S.; DELFT, J.H.M. Performance of *in vitro γH2AX* assay in HepG2 cells to predict *in vivo* genotoxicity. **Mutagenesis,** v. 27, p. 645-652, 2012.

UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS, V.M.F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p.81-112.

URANO, K.; TAKANASHI, H.; IGARASHI, I. Guidance manual of the Ames mutagenicity assay for water sample (I) (II) (III). **J. Water and Waste**, v.39, p.163-168, p.255-259, p.342-349, 1997.

USEPA. U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTIONAGENCY. Standard Method 3540C, Soxhlet Extraction. 2008. Disponível em: <http://www.epa.gov/epawaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf> Acesso em junho de 2010.

VAN DER WATER, F.M.; HAVINGA, J.; RAVESLOOT, W.T.; HORBACH, G.J.M.J.; SCOONEN, W.G.E.J. High content screening analysis of phospholipidosis: Validation of a

96-well assay with CHO-K1 and HepG2 cells for the prediction of in vivo based phospholipidosis. **Toxicology in Vitro**, v.25, p.1870-1882, 2011.

VEIHMEYER, F.J.; HENDRICKSON, A.H. The moisture equivalent as a measure of the field capacity of soils. **Soil Science**, v.32, p.181-193, 1931.

VESILIND, P.A.; RAMSEY, T.B. Effect of Drying Temperature On the Fuel Value of Wastewater Sludge. **Waste Manag. Res.**, v.14, p.189-196, 1996.

VON SPERLING, M.; ANDREOLI, C. V.; FERNANDES, F. **Lodo de Esgoto, Tratamento e Disposição Fina**l. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG; Cia de Saneamento do Paraná, Belo Horizonte, 2001, 484p.

WALTER, I.; MARTÍNEZ, F.; CALA, V. Heavy metal speciation and phytotoxic effects of three representative sewage sludges for agricultural uses. **Environmental Pollution**, v.139, p.507-514, 2006.

WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.12, p.237–241, 2001.

WEIGT, S.; HUEBLER, N.; STRECKER, R.; BRAUNBECK, T.; BROSCHARD, T.H. Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. **Toxicology**, v.281, p. 25-36, 2011.

WEIGT, S.; HUEBLER, N.; STRECKER, R.; BRAUNBECK, T.; BROSCHARD, T.H. Development effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Reproductive Toxicology**, v.33, p.133-141, 2012.

WERTHERA, J.; OGADA, T. Sewage sludge combustion. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.25, p.55–116, 1999.

WESTERINK, W.M.A.; STEVENSON, J.C.R.; HORBACH, G.J.; SCHOONEN, W.G.E.J. The development of RAD51C, cystatin A, p53 and Nrf2 luciferase-reporter assays in metabolically competent HepG2 cells for the assessment of mechanism-based genotoxicity and of oxidative stress in the early research phase of drug development. **Mutation Reseach**, v.696, p.21-40, 2010.

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

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S.; GIESE, M.; FRANK, H.; STEINBERG, C. Uptake, toxicity, and effects on detoxication enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.45, p.122-131, 2000.

YALLOUZ, A.V.; CESAR, R.G.; EGLER, S.G. Potential application of a semi-quantitative method for mercury determination in soils, sediments and gold mining residues. **Environmental Pollution**, v.151, p. 420-433, 2008.

YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutation Research**, v.537, p.109–114, 2003.

YI, H.; WU, L.; JIANG, L. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. **Science of the Total Environment**, v.383, p.232-236, 2007.

ZUCCO, F.; DE ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in Vitro**, v.18, p.153-163, 2004.