

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS  
EM SOLO CULTIVADO COM EUCALIPTO E FERTILIZADO COM LODO DE  
ESGOTO SANITÁRIO**

**MARIANNE FIDALGO DE FARIA**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP –  
Câmpus de Botucatu, para obtenção de  
título de Mestre em Ciência Florestal.

BOTUCATU-SP

Julho - 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS EM  
SOLO CULTIVADO COM EUCALIPTO E FERTILIZADO COM LODO DE  
ESGOTO SANITÁRIO**

**MARIANNE FIDALGO DE FARIA**

Orientador: Prof. Dr. Robert Boyd Harrison

Co-orientador: Prof. Dr. Iraê Amaral Guerrini

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, para obtenção de título de Mestre em Ciência Florestal.

BOTUCATU-SP

Julho – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

F224a Faria, Marianne Fidalgo de, 1989-  
Avaliação da persistência de microrganismos patogênicos em solo cultivado com eucalipto e fertilizado com lodo de esgoto sanitário / Marianne Fidalgo de Faria. - Botucatu : [s.n.], 2015  
xii, 60 f. : fots. color., grafs. color., ils. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2015  
Orientador: Robert Boyd Harrison  
Coorientador: Iraê Amaral Guerrini  
Inclui bibliografia

1. Eucalipto - Solos. 2. Resíduos orgânicos como fertilizantes. 3. Solo - Contaminação. 4. Microorganismos patogênicos. I. Harrison, Robert Boyd. II. Guerrini, Iraê Amaral. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
CAMPUS DE BOTUCATU  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS DE BOTUCATU

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: "AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DE MICRORGANISMOS PATOGENICOS EM SOLO CULTIVADO COM EUCALIPTO E FERTILIZADO COM LODO DE ESGOTO SANITÁRIO"**

**AUTORA: MARIANNE FIDALGO DE FARIA**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. ROBERT BOYD HARRISON**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. IRAE AMARAL GUERRINI**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIA FLORESTAL , pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. IRAE AMARAL GUERRINI

Dep de Solos e Recursos Ambientais / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu

Profa. Dra. MARIA INÊS ZANOLI SATO

Depto. Análises Ambientais - CETESB

Prof. Dr. FERNANDO CARVALHO OLIVEIRA

Saneamento Ambiental e Resíduos / Biossolo Agricultura e Ambiente Ltda

Data da realização: 28 de julho de 2015.

---

**“Nada na vida deve ser temido, mas sim compreendido.  
Devemos buscar compreender cada vez mais, para temer cada vez menos.”**

**Marie Curie**

**Dedico:**

Aos meus amados pais, Ronaldo Alves de Faria e Maria Luz Fidalgo de Faria.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir conviver com pessoas tão maravilhosas e pelas oportunidades que tenho tido nesta jornada da vida, sempre me amparando e me dando força e coragem para enfrentar os desafios.

Aos meus pais, Ronaldo e Maria Luz, que são o meu maior exemplo de força e determinação. Obrigada por terem me ensinado todos os valores éticos e morais que me acompanharam até aqui, me oferecendo sempre todo o amor, carinho e apoio incondicional que eu precisei em minha formação como ser humano e como profissional. Amo vocês.

À minha irmã Maíla, companheira de vida que tanto amo, por se fazer sempre presente, me incentivando, me ouvindo e torcendo por mim.

Aos meus orientadores, Prof. Robert Boyd Harrison e Prof. Iraê Amaral Guerrini, que além de mestres e mentores, considero amigos. Foi realmente uma honra ter tido a oportunidade de trabalhar com pessoas que tanto admiro. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado e por toda dedicação e apoio oferecidos.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal pela infraestrutura e suporte oferecidos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), representada pela Dra. Maria Inês Zanoli Sato, gerente do Departamento de Análises Ambientais, pela Dra. Elayse Maria Hachich, gerente da Divisão de Microbiologia e Parasitologia, e toda a equipe do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia pelo apoio, empenho e dedicação fundamentais para o sucesso deste estudo.

Ao Dr. Fernando Carvalho Oliveira, diretor da empresa Biossolo Agricultura & Ambiente Ltda., por todo o apoio técnico e intelectual dedicados a este projeto desde a sua criação.

À empresa Suzano Papel e Celulose S/A, por ter cedido gentilmente uma de suas áreas de plantio para instalação e condução do experimento, bem como o fornecimento de pessoal de apoio e mão-de-obra.

À Companhia Saneamento de Jundiaí (CSJ) e à Estação de Tratamento de Esgotos de Taubaté, pertencente à Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP), pela gentileza na doação dos lodos de esgoto sanitário utilizados nos tratamentos do experimento, objeto deste estudo.

Ao Prof. Dr. José Raimundo Souza Passos, do Departamento de Bioestatística, pela ajuda e conselhos com a análise de dados que foram de grande importância e aprendizado para mim.

Aos professores Roberto Lyra Villas Boas e Dirceu Maximino Fernandes pelos preciosos conselhos e colocações durante meu Exame Geral de Qualificação.

Ao Prof. Dr. André Luís Teixeira Fernandes, professor de minha graduação que me apresentou à pesquisa acadêmica e sempre me incentivou, me transformando em uma eterna admiradora da ciência.

À Livia e ao Thiago (Pará), amigos que, com seu apoio e dedicação, foram fundamentais para a realização de minha pesquisa, sempre dispostos a ajudar no que fosse preciso. Vocês foram demais. Obrigada.

A todos os colegas e professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal e aos funcionários do Departamento de Solos e Recursos Ambientais e da Seção Técnica de Pós-graduação, que, com certeza, tiveram grande contribuição para a conclusão deste mestrado.

À Raquel e ao Wesley, que me receberam de braços abertos e imediatamente se tornaram meus primeiros grandes amigos em Botucatu, cidade que me acolheu e pela qual hoje eu tenho imenso carinho. Obrigada por todos os momentos alegres, de cumplicidade e companheirismo que vivemos aqui. Vocês tornaram tudo mais especial.

À Daniela, amiga de convivência diária, por todos os conselhos, incentivos, broncas, risadas, dramas e pelas inúmeras horas dedicadas a ouvir desde as mais simples histórias do meu cotidiano até os meus maiores problemas e conflitos, sempre com uma palavra amiga e um conselho valioso.

À minha numerosa família de tios e primos, que são a minha fonte de alegria e energia. Obrigada por todo o apoio que sempre encontrei em vocês.

Às minhas queridas vovós, Maria Divina e Maria de Lourdes, por quem eu tenho profundo respeito e admiração, por todo o carinho que sempre dedicaram a mim.

À minha tia e madrinha Livia, que sempre incentivou todos os meus sonhos e por quem eu tenho imenso amor e carinho.

Às minhas eternas amigas Laura, Bruna, Ioli, Karina, Érika e Fernanda e aos demais amigos de Uberaba, que me acompanham e me apoiam desde sempre, sorrindo com meus momentos de felicidade e me levantando sempre que o desânimo me abateu.

A conclusão deste trabalho teria sido impossível sem a participação, a dedicação e o apoio de cada uma das pessoas e empresas citadas e, por isso, eu reforço a minha mais sincera gratidão a eles.

MUITO OBRIGADA!!

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	X
LISTA DE FIGURAS .....	XI
RESUMO .....	1
SUMMARY .....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	8
2.1 O lodo de esgoto sanitário.....	8
2.1.1 Os nutrientes presentes no lodo de esgoto .....	9
2.1.2 O lodo de esgoto como fertilizante no setor florestal .....	11
2.1.3 Aspectos sanitários do lodo de esgoto .....	12
2.2 A Resolução CONAMA nº 375 de 29 de agosto de 2006 .....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Delineamento experimental e tratamentos .....	17
3.2 Caracterização dos lodos utilizados .....	20
3.3 Caracterização do solo .....	21
3.4 Coleta de Dados .....	23
3.4.1 Índice pluviométrico e temperatura e umidade do solo e dos lodos .....	23
3.4.2 Amostragem do lodo de esgoto.....	23
3.4.3 Métodos para determinação de microrganismos patogênicos.....	23
3.4.3.1 Ovos viáveis de <i>Ascaris</i> spp.....	24
3.4.3.2 <i>Salmonella</i> spp .....	27
3.4.3.3 Enterovírus .....	31
3.4.3.4 Coliformes termotolerantes .....	32
3.5 Análise de Dados .....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
4.1 Índice pluviométrico e temperatura e umidade do solo e dos lodos .....	35
4.2 Persistência dos agentes patogênicos .....	39
4.2.1 Coliformes termotolerantes .....	40
4.2.2 Enterovírus .....	42
4.2.3 <i>Salmonella</i> spp .....	44
4.2.4 Ovos viáveis de <i>Ascaris</i> spp .....	46

5. CONCLUSÕES .....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Interferência de fatores ambientais na viabilidade de ovos de helmintos e na sobrevivência de microrganismos presentes no lodo de esgoto .....	13
<b>Tabela 2.</b> Influência de fatores ambientais no tempo de sobrevivência de microrganismos patogênicos .....	13
<b>Tabela 3.</b> Classificação do lodo de esgoto de acordo com a concentração de agentes patogênicos .....	15
<b>Tabela 4.</b> Indicadores patogênicos para caracterização dos lodos de esgoto sanitário utilizados no experimento .....	20
<b>Tabela 5.</b> Características químicas do solo na área experimental .....	21
<b>Tabela 6.</b> Características físicas do solo na área experimental .....	21
<b>Tabela 7.</b> Resultados analíticos iniciais de indicadores patogênicos presentes no solo da área experimental (por bloco) .....	22
<b>Tabela 8.</b> Resultados analíticos finais de indicadores patogênicos presentes no solo da área experimental (por bloco) .....	22
<b>Tabela 9.</b> Frequência de coleta de amostras em campo para análises .....	23

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de disposição dos blocos e suas parcelas com os tratamentos aplicados em campo .....	17
<b>Figura 2.</b> Acondicionamento do lodo de esgoto em sacos de tecido tipo tule de dimensões 0,2m x 1,0m. Disposição na superfície do solo na linha de plantio .....	19
<b>Figura 3.</b> Detalhe da parcela experimental com esquema de disposição do lodo nas linhas de plantio do eucalipto .....	19
<b>Figura 4.</b> <b>A</b> - Homogeneização de amostra em homogeneizador <i>blender</i> . <b>B</b> - Aspiração do sobrenadante por bomba vácuo/pressão. <b>C</b> - Processo de peneiramento da amostra com peneira de malha 50 <i>mesh</i> . <b>D</b> - Centrifugação de amostras em centrífuga de bancada com rotores <i>swinging-bucket</i> .....	25
<b>Figura 5.</b> <b>A</b> - Ovos de <i>Ascaris</i> spp fértil e infértil. <b>B e C</b> - Ovos viáveis (embrionados) de <i>Ascaris</i> spp.....	26
<b>Figura 6.</b> Placa MSR/V após incubação a $42 \pm 0,5^\circ$ C por 16 a 18 horas, com presença de halos esbranquiçados em torno da inoculação, representando sinais de motilidade. Resultado presuntivo positivo para presença de <i>Salmonella</i> spp .....	28
<b>Figura 7.</b> Placa XLD após incubação a $36 \pm 1,5^\circ$ C por 18 a 24 horas com resultado presuntivo positivo para presença de <i>Salmonella</i> spp, com colônias rosa-avermelhadas com centro negro, característica de bactérias gram-negativas .....	29
<b>Figura 8.</b> Tubos de IAL para observação de características bioquímicas determinadas para <i>Salmonella</i> spp.....	30
<b>Figura 9.</b> Esquema de preparo de diluições decimais para determinação de coliformes termotolerantes por meio da técnica de tubos múltiplos .....	32
<b>Figura 10.</b> Esquema do procedimento para determinação de coliformes termotolerantes por meio da técnica de tubos múltiplos com o meio A1.....	33
<b>Figura 11.</b> Precipitação diária média (mm) local na área experimental durante 52 semanas após a instalação do experimento .....	36
<b>Figura 12.</b> Umidade média ( $m^3$ água . $m^{-3}$ solo/lodo) diária na superfície, a 0,10 m e a 0,20 m de profundidade no solo e na superfície do lodo de esgoto de Jundiaí e do lodo de esgoto de Taubaté durante 52 semanas após a instalação do experimento, com representação da umidade	

ideal (acima $0,7 \text{ m}^3 \text{ água} \cdot \text{m}^{-3} \text{ solo/lodo}$ ou 70%) para a sobrevivência dos agentes patogênicos avaliados .....	37
<b>Figura 13.</b> Temperatura média (°C) diária na superfície, a 0,10 m e a 0,20 m de profundidade no solo e na superfície do lodo de esgoto de Jundiaí e do lodo de esgoto de Taubaté durante 52 semanas após a instalação do experimento, com representação da faixa de temperatura ideal (entre 18°C e 28°C) para a sobrevivência dos agentes patogênicos avaliados .....	38
<b>Figura 14.</b> Curva de decaimento de coliformes termotolerantes (UFP $\text{gST}^{-1}$ ) em função do tempo em 52 semanas de análise do lodo de esgoto de Jundiaí .....	40
<b>Figura 15.</b> Curva de decaimento de coliformes termotolerantes (UFP $\text{gST}^{-1}$ ) em função do tempo em 52 semanas de análise do lodo de esgoto de Taubaté .....	41
<b>Figura 16.</b> Curva de decaimento de <i>Salmonella</i> spp (UFP $\text{gST}^{-1}$ ) em função do tempo em 52 semanas de análise do lodo de esgoto de Jundiaí .....	44
<b>Figura 17.</b> Curva de decaimento de <i>Salmonella</i> spp (UFP $\text{gST}^{-1}$ ) em função do tempo em 52 semanas de análise do lodo de esgoto de Taubaté .....	45
<b>Figura 18.</b> Curva de decaimento de ovos viáveis de <i>Ascaris</i> spp em função do tempo em 52 semanas de análise do lodo de esgoto de Taubaté .....	47

**AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS EM SOLO CULTIVADO COM EUCALIPTO E FERTILIZADO COM LODO DE ESGOTO SANITÁRIO.** Botucatu, 2015. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agrômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Autora: MARIANNE FIDALGO DE FARIA

Orientador: PROF. DR. ROBERT BOYD HARRISON

Co-orientador: PROF. DR. IRAÊ AMARAL GUERRINI

## **RESUMO**

Dentro do contexto agrícola, o setor florestal se destaca como candidato potencial para a utilização de resíduos orgânicos urbanos devido a diversas particularidades que têm a incorporação de matéria orgânica como uma fonte de benefícios. O lodo de esgoto sanitário pode conter diversos agentes patogênicos, como ovos de helmintos, bactérias, vírus, protozoários e fungos, o que passou a restringir sua aplicação no solo em alguns países. No Brasil, a Resolução CONAMA nº 375 de 30 de agosto de 2006 surgiu após vários anos de discussão envolvendo os riscos aceitáveis quanto ao uso do lodo de esgoto na agricultura e estabelece limites máximos para concentração de patógenos em lodos a serem aplicados no solo. Os principais estudos envolvendo o tempo de sobrevivência de agentes patogênicos em solos fertilizados com lodo de esgoto foram realizados na América do Norte e Europa, o que deixa as regiões tropicais em posição desfavorável devido à escassez de informações específicas. No presente estudo, foi avaliado o tempo de persistência de ovos viáveis de *Ascaris* spp, coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp e enterovírus em solo cultivado com *Eucalyptus* e fertilizado com lodo de esgoto sanitário em área localizada no município de Avaré - SP, seguindo-se o método de análise desenvolvido pela Agência Ambiental Americana (USEPA) e adotado pela Resolução CONAMA nº375/2006. Foram aplicados na superfície do solo dois tipos de lodo de esgoto, sendo o primeiro proveniente da Estação de Tratamento de Esgotos de Jundiaí, com baixo índice patogênico, e o segundo proveniente da Estação de Tratamento de Esgotos de Taubaté, com alto índice patogênico. Os tempos médios estimados para a sobrevivência de coliformes termotolerantes foram, 54 e 93 semanas para o lodo de Jundiaí e o de Taubaté, respectivamente. Devido aos picos de aumento e diminuição observados na população de *Salmonella* spp, não foi possível ajustar um modelo em nenhum

dos tratamentos. Para enterovírus, os resultados foram negativos desde o início do experimento, sendo possível afirmar que a taxa de sobrevivência deste tipo de microrganismo decai rapidamente logo nas primeiras horas após a aplicação do lodo no solo. O tempo médio estimado para a viabilidade de ovos de *Ascaris* spp foi de 8,5 semanas para o lodo proveniente de Taubaté, não sendo possível ajustar o modelo para o lodo de Jundiaí, já que este, desde o início, apresentou valores próximos ao encontrado no solo.

Palavras-chave: Biossólidos; ovos viáveis de *Ascaris* spp; *Salmonella* spp; coliformes termotolerantes; enterovírus.

**EVALUATION OF PATHOGENS PERSISTENCE IN SOIL CULTIVATED WITH EUCALYPTUS AND FERTILIZED WITH SEWAGE SLUDGE.** Botucatu, 2014. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Author: MARIANNE FIDALGO DE FARIA

Advisor: ROBERT BOYD HARRISON

Co-advisor: IRAÊ AMARAL GUERRINI

## **SUMMARY**

The application of sewage sludge on agricultural land has been considered the most suitable practice for final disposal of this organic waste daily generated in large quantities in urban areas. Within the agriculture context, the forestry sector stands out as potential candidate for the use of organic waste due to several peculiarities that have the incorporation of organic matter as a source of benefits. The sewage sludge contains many pathogens such as helminth ova, bacteria, viruses, protozoa and fungi, which restrict your application on soil in some countries. In Brazil, the CONAMA Resolution nº. 375/2006, came out after several years of discussion involving acceptable risks for the use of sewage sludge in agriculture and established maximum limits for pathogens concentration in sludge to be applied on soil. The main studies involving the survival time of pathogens in soils fertilized with sewage sludge were conducted in North America and Europe, making the tropical regions at a disadvantage due to the lack of specific information. The present study evaluated the persistence of viable *Ascaris* spp ova, fecal coliforms, *Salmonella* spp and enteroviruses in soil cultivated with Eucalyptus and fertilized with sewage sludge in an area located in the city of Avare, State of Sao Paulo, Brazil, following the method developed by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) and adopted by CONAMA Resolution nº 375/2006. Two different sewage sludge were applied on soil surface, one from Sewage Treatment Plant of Jundiai and other from Sewage Treatment Plant of Taubate. The average time estimated for fecal coliform's survival were 54 and 93 weeks for Jundiai and Taubate sludge, respectively. Because of the ascending and descending slopes at *Salmonella* spp population, it was not possible adjusting a model for treatments at all. For enteroviruses, since the beginning the result were negatives, but it is possible affirming that the survival rate of this microorganism decays rapidly on the first hours after the sludge application. The average time estimated for

viable *Ascaris* spp ova's survival was 8.5 weeks for Taubate sludge and it was not possible adjusting the model for the sludge from Jundiai because, since the beginning, this sludge presented similar values to that found in soil.

Keywords: Biosolids; viable *Ascaris* spp ova; *Salmonella* spp; fecal coliforms; enteroviruses.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as alternativas para disposição final do lodo de esgoto, proveniente tanto de regiões metropolitanas quanto do interior dos estados, o uso agrícola é considerado uma das práticas mais recomendadas, sendo que, sob o ponto de vista ambiental, a reciclagem agrícola do lodo proporciona menores impactos ambientais por meio da economia de recursos naturais e energia.

A aplicação agrícola do lodo de esgoto no solo se destaca não só pelos aspectos ambientais e econômicos, mas também pelas vantagens obtidas por ser uma fonte de matéria orgânica e nutrientes, conferindo ao solo maior capacidade de retenção de água e resistência à erosão, além de reduzir o uso de fertilizantes comerciais.

Harrison et al. (2003) apontam diversas razões para se considerar áreas florestais como candidatas em potencial para a utilização de resíduos orgânicos. Por exemplo, deficiências nutricionais em florestas, principalmente de nitrogênio e fósforo, podem ser controladas com o fornecimento destes nutrientes por resíduos orgânicos.

No Brasil, a reciclagem do lodo proveniente de estações de tratamento de esgoto sanitário para uso agrícola é regulamentada pelo Ministério do Meio Ambiente por meio da Resolução nº 375/2006 do Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA

(BRASIL, 2006). Esta norma surgiu após vários anos de discussão envolvendo os riscos aceitáveis quanto ao uso do lodo de esgoto na agricultura (THOMAS-SOCCOL et al., 2010) uma vez que o solo, assim como a água, pode agir como vetor de doenças (BRENNAN et al., 2014).

Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a utilização do lodo de esgoto ainda é questionada devido à má qualidade, ou até mesmo inexistência, de infraestruturas de saneamento básico e aos elevados índices de parasitismo da população. Sendo assim, o resíduo sólido produzido diariamente em grandes quantidades nas estações de tratamento de esgoto se tornou motivo de grande preocupação (THOMAS-SOCCOL et al., 2010). O principal empecilho para a aplicação do lodo de esgoto no país tem sido a carga de organismos patogênicos presentes no mesmo, tais como bactérias, protozoários, vírus, leveduras, fungos e helmintos.

O artigo 11 da Resolução nº 375/2006 do CONAMA determina que os lotes do lodo de esgoto a serem aplicados no solo devem respeitar os limites máximos de concentração de patógenos como coliformes termotolerantes, *Salmonella spp*, ovos viáveis de helmintos e enterovírus. Tais limites também são utilizados para classificar o lodo em duas classes, A e B (BRASIL, 2006). A partir de agosto de 2011 o uso agrícola de lodos Classe B passou a ser proibido no país, o que levou ao decréscimo na quase totalidade do uso do lodo como fertilizante, já que muitos produtores rurais passaram a optar por fertilizantes comerciais.

No exterior, estudos envolvendo a aplicação de biossólidos municipais em solos florestais vêm sendo realizados há mais de 30 anos e comprovam a capacidade condicionante e fertilizante destes resíduos de acordo com as condições de solo e clima de países da América do Norte, Europa e Ásia, o que impulsionou tal prática (HARRISON et al., 2003; VAN DER HOEK, 2002; WANG, 1997), fazendo com que mais da metade do lodo de esgoto gerado nos Estados Unidos e oeste europeu fossem destinados à aplicação no campo (LEWIS; GATTIE, 2002).

Nestes mesmos países, estudos sobre a persistência de agentes patogênicos em solos fertilizados com lodo de esgoto mostraram que o tempo de viabilidade de ovos de *Ascaris* pode variar de 15 meses a até 15 anos em alguns solos, sob condições específicas (CARRINGTON, 2001; KOWAL, 1986; MUNGER, 1983 apud EDMONDS, 2000), sendo possível persistirem a até 43 anos quando incubados a -23 °C e a semanas quando expostos a temperaturas acima de 37 °C (SMITH et al., 1999).

A sobrevivência de organismos patogênicos é diretamente influenciada pelas condições ambientais. Quanto maior a temperatura do ambiente, menos resistentes estes organismos se tornam (EDMONDS, 2000; KELLEY et al., 1984). Há também grande sensibilidade destes organismos quanto a exposição à irradiação ultravioleta, umidade e quanto a valores extremos de pH (THOMAS-SOCCOL et al., 2010). Além disso, o solo em si pode ser considerado um ambiente hostil para a sobrevivência de organismos como vírus e algumas bactérias patogênicas (KELLEY et al., 1984).

Tomando-se por referência os estudos realizados na América do Norte e Europa, onde o uso agrícola do lodo de esgoto sanitário não encontra restrições apesar do longo tempo de permanência de agentes patogênicos no solo, e considerando-se a escassez de estudos realizados em países de clima tropical, surge o grande questionamento acerca da real necessidade de restrições quando à aplicação do lodo em solos no Brasil.

Há muitos debates e questionamentos sobre a norma adotada no Brasil devido à sua elevada rigidez referente à contaminação do solo por organismos patogênicos quando comparada com as legislações americana e europeia. Além disso, as condições de clima, temperatura, solo e saneamento de um país tropical em desenvolvimento como o Brasil devem ser analisadas a parte, devido às suas peculiaridades.

Berton e Nogueira (2010) e Bettioli et al. (2006) reforçam a necessidade de estudos que avaliem, a longo prazo, o efeito do lodo de esgoto na agricultura e seus impactos nas condições de solos tropicais, uma vez que são escassos os trabalhos que contemplem esta realidade.

O presente estudo justifica-se pela necessidade de pesquisas que determinem o real tempo de permanência de organismos patogênicos em solos tropicais fertilizados com lodo de esgoto sanitário, elucidando algumas informações pendentes para as particularidades do Brasil.

Sendo assim, objetiva-se avaliar, durante o período de 12 meses, a persistência da viabilidade de ovos de *Ascaris* spp e a sobrevivência de coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp e enterovírus em solo fertilizado com lodo de esgoto sanitário e cultivado com eucalipto.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 O lodo de esgoto sanitário**

Entende-se por lodo de esgoto sanitário o resíduo semissólido com composição predominantemente orgânica resultante do sistema de tratamento de efluentes sanitários (PEPPER et al., 2006; SANEPAR, 1997).

Os tratamentos aos quais o esgoto é submetido são divididos em primário, secundário, terciário ou avançado. Durante o tratamento primário ocorre a remoção dos resíduos sólidos grossos e de outras matérias em suspensão de forma mecânica como, por exemplo, gradeamento e decantação. Já no tratamento secundário, a matéria orgânica é eliminada através processos biológicos. Porém, muitos contaminantes e elementos como nitrogênio e fósforo não são eliminados nos dois primeiros tratamentos, sendo então necessária a aplicação de outros processos e operações no tratamento terciário (BERTON; NOGUEIRA, 2010, KELLEY et al., 1984).

O lodo de esgoto é predominantemente um resíduo do processo de tratamento primário, resultante da decantação da matéria sólida presente no efluente sanitário, e do tratamento secundário, resultante da separação das partículas sólidas após a ação biológica (BERTON; NOGUEIRA, 2010).

Em geral, após retirado do sistema de tratamento de efluentes, o lodo é submetido a diversos processos para diminuição de agentes patogênicos e odor e aumento do teor de sólidos, uma vez que, ao sair do sistema, o lodo possui umidade relativa em torno de 99% e através de processos como adensamento, condicionamento e desidratação atinge normalmente índices de umidade por volta de 20 % (BERTON; NOGUEIRA, 2010).

Além de ser uma importante fonte de macro e micronutrientes, a reciclagem do lodo de esgoto traz inúmeros benefícios ao meio ambiente com a economia de recursos não renováveis, como combustíveis fósseis e minerais utilizados na produção de fertilizantes comerciais, e a considerável redução no volume deste tipo de resíduo orgânico enviado diariamente a aterros sanitários (ANDRADE; BOEIRA; PIRES, 2010)

### **2.1.1 Os nutrientes presentes no lodo de esgoto**

A composição nutricional do lodo de esgoto depende diretamente do esgoto a ser tratado e, sendo assim, há variações significativas de acordo com a origem do esgoto, que pode ser proveniente de áreas residenciais ou industriais, ou até mesmo de acordo com a época do ano. (BETTIOL; CAMARGO, 2006).

Berton e Nogueira (2010) e Melo e Marques (2000) afirmam que as águas residuárias, chamadas popularmente de esgoto, são compostas por 99,99% de água e apenas 0,01% de partículas sólidas, destas sendo 30% partículas inorgânicas (areia, sais e metais) e 70% orgânicas (proteínas, carboidratos e lipídeos), o que caracterizaria apenas 0,007% do volume total de esgoto como potencial fonte de nutrientes.

Considerando-se que os nutrientes presentes no lodo apresentam níveis inconstantes quanto à sua disponibilidade a curto prazo para as plantas, há a necessidade da realização de análises detalhadas para se determinar as características químicas do solo e do lodo a ser aplicado, bem como a dinâmica nutricional dos mesmos, para que se possa aproveitar ao máximo os benefícios agrônômicos deste resíduo (BETTIOL; CAMARGO, 2006).

Estudos realizados por Berton e Nogueira (2010) apontam que no primeiro ano de aplicação do lodo de esgoto no solo apenas 1/3 do nitrogênio total é mineralizado, e para o segundo ano supõe-se que ficam disponíveis no solo apenas 5 a 10% do nitrogênio remanescente.

De acordo com o manual técnico publicado pela Sanepar (1997), “o nitrogênio é normalmente o mais valioso constituinte do lodo, sendo também o elemento ao

qual as culturas apresentam maiores respostas”. Além disso, ao se definir a dosagem máxima de lodo ao ser aplicado no solo, o nitrogênio é um fator limitante, levando-se em consideração sua disponibilidade no solo e a necessidade da cultura, uma vez que pode ocorrer lixiviação na forma de nitratos e conseqüente contaminação do lençol freático (BOEIRA; MAXIMILIANO, 2006; NAP, 2002).

As fontes de nitrogênio (orgânica ou na forma de nitratos e amônio) no lodo estão nos dejetos presentes no esgoto e na biomassa de microrganismos, sendo o nitrogênio amoniacal ( $\text{NH}_4$ ) e nítrico ( $\text{NO}_3$ ) “totalmente disponíveis para a planta enquanto o nitrogênio orgânico deve passar por mineralização microbiológica antes de ser absorvido” (SANEPAR, 1997).

Segundo Andrade, Boeira e Pires (2010), grande parte da matéria-prima de fertilizantes nitrogenados utilizados no Brasil é de origem estrangeira, o que torna o país dependente da importação destes produtos. Sendo assim, o uso agrícola de resíduos orgânicos como o lodo de esgoto, que possuem elevado potencial para o fornecimento de nitrogênio, mostram-se como uma alternativa promissora para diminuição de tal dependência do mercado externo.

No primeiro ano após a aplicação do lodo no solo, a fitodisponibilidade do fósforo varia de 16 a 64%, de acordo com Berton e Nogueira (2010). Porém, a SANEPAR, em Manual Técnico publicado em 1997, diz que a disponibilidade deste macronutriente é alta, entre 40 e 80% do fósforo total, sendo em média 50% disponível no primeiro ano. Detergentes e sabões que utilizam o fósforo em sua composição são a principal fonte do mineral, que também está presente nos dejetos e corpos microbianos (SANEPAR, 1997).

Por ser um elemento altamente solúvel em água, baixos teores de potássio ficam retidos no lodo de esgoto, sendo necessária a adição deste elemento no solo através de adubação complementar de acordo com a necessidade da cultura, sendo 100% deste macronutriente assimilado pela planta no primeiro ano após a aplicação (BETTIOL; CAMARGO, 2006; SANEPAR, 1997).

A necessidade de micronutrientes pelas plantas, principalmente zinco e cobre, geralmente é suprida pelos elementos presentes no lodo (BERTON; NOGUEIRA, 2010; SANEPAR, 1997), dispensando-se complementação dos mesmos. Porém ressalta-se o alerta quanto à quantidade aplicada destes elementos, uma vez que em elevadas concentrações podem provocar intoxicação nas plantas e conseqüente diminuição do desenvolvimento e produtividade das mesmas (BERTON; NOGUEIRA, 2010).

### 2.1.2 O lodo de esgoto como fertilizante no setor florestal

Muitos solos utilizados em plantios florestais são de textura arenosa, de qualidade inferior aos solos destinados a áreas agrícolas e, sendo assim, o acréscimo de matéria orgânica provê melhorias na retenção de umidade e nutrientes no solo. Além disso, áreas florestais apresentam propriedades que interagem positivamente com a aplicação de biossólidos, como a presença de serapilheira, que imobiliza o nitrogênio disponível, e um sistema de raízes perenes, que permitem a absorção de nutrientes por um longo período (HARRISON et al., 2003).

Diversos estudos, no Brasil e no exterior, indicam que plantações florestais respondem positivamente à adubação, tanto mineral quanto orgânica, e pesquisas em que foram utilizados os biossólidos e efluentes provenientes do tratamento de efluentes domésticos como fonte de nutrientes e água para espécimes do gênero *Eucalyptus* mostraram resultados promissores tanto para o plantio quanto para a produção de mudas (SILVA et al., 2008; BARREIROS et al., 2007; AUGUSTO et al., 2007; GUEDES et al., 2006; ROCHA et al., 2004; PHILIPPI JR., 2003; TRIGUEIRO; GUERRINI, 2003; POLGLASE; TUNNINGLEY, 1996; POLGLASE; MYERS, 1995; HENRY; COLE; HARRISON, 1994).

Porém, diversos fatores influenciam o real efeito da aplicação do lodo de esgoto no solo, dentre eles a forma de aplicação e o tipo do lodo, as características físico-químicas do solo, os fatores ambientais e as necessidades da cultura a ser fertilizada com o lodo (BERTON; NOGUEIRA, 2010).

A quantidade e a frequência de aplicação do lodo influenciam diretamente o teor de carbono orgânico no solo, podendo o incremento ser negativo, devido ao efeito *priming*, quando a quantidade aplicada é inferior à necessidade da cultura e não são realizadas novas aplicações (BERTON; NOGUEIRA, 2010). As características físicas do solo são alteradas com a incorporação do lodo, uma vez que as partículas deste se agregam às partículas de solo, aumentando seu diâmetro, além de diminuir a densidade e aumentar a capacidade de retenção da água no solo (BERTON; NOGUEIRA, 2010; SANEPAR, 1997). Devido a isso, nota-se a resposta direta da fitomassa aérea das plantas fertilizadas com lodo devido ao aumento de sua biomassa radicular (BERTON; NOGUEIRA, 2010).

O teor de carbono orgânico do lodo é a principal fonte de interesse para o setor florestal, representando melhorias significativas quanto à resistência à erosão e à falta de água (SANEPAR, 1997), já que os solos destinados ao plantio florestal são geralmente de qualidade inferior aos destinados às culturas agrícolas em geral (HARRISON

et al., 2003). Além disso, o aumento da disponibilidade de macro e micronutrientes, a ativação microbiológica do solo e o possível aumento da resistência a pragas, são fatores positivos na aplicação do lodo de esgoto que merecem ser ressaltados (SANEPAR, 1997).

Berton e Nogueira (2010) reforçam que não só a produtividade, mas também a qualidade das espécies florestais podem receber importante incremento por meio do uso racional do lodo de esgoto, sempre “amparado por legislação ou normas específicas, programas de controle de qualidade e pesquisas pertinentes” para o setor.

### **2.1.3 Aspectos sanitários do lodo de esgoto**

O lodo de esgoto sanitário pode conter diversos agentes patogênicos, como bactérias, protozoários, vírus, leveduras, fungos e helmintos (PEPPER et al., 2006). Estes últimos são representados, por exemplo, pelas espécies *Taenia Saginata*, *Taenia Solium*, *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Toxocara Canis*, *Toxocara cati*, *Trichuris trichiura*, *Trichuris vulpis*, *Hymenolepis nana* e *Hymenolepis diminuta* (BETTIOL; SANTOS, 2006).

A saúde da população contribuinte do sistema se reflete diretamente na concentração destes organismos no esgoto (PEPPER et al., 2006). Até mesmo em países desenvolvidos, que possuem população considerada mais saudável, com menor número de casos de verminoses, por exemplo, possuem considerável concentração de agentes patogênicos em seu lodo produzido, o que não impede que este seja usado amplamente no setor agrícola há décadas (THOMAZ-SOCCOL, 2010; SANEPAR, 1997).

O uso agrícola do lodo de esgoto Classe B requer especial atenção por se tratar de um material com elevadas concentrações de agentes infecciosos com implicações na saúde pública, sendo prudente supor que qualquer organismo comumente encontrado em resíduos ou efluentes urbanos são suscetíveis a estar presentes também no lodo de esgoto Classe B (LEWIS; GATTIE, 2002).

Todo e qualquer indivíduo exposto, por inalação, ingestão ou absorção cutânea, a unidades infecciosas, tais como células bacterianas ou partículas virais, são considerados como suscetíveis a infecção (LEWIS; GATTIE, 2002).

Um dos principais e fundamentais objetivos do tratamento de esgoto sanitário é a eliminação de organismos patogênicos à saúde humana. Porém, a fase de decantação do tratamento de esgoto propicia a precipitação de muitos destes organismos, que

se concentram no lodo, fazendo com que a eliminação destes não seja completa (SANEPAR, 1997).

Uma vez fora do organismo hospedeiro, os microrganismos presentes no lodo se comportam de maneiras diferentes quando expostos a fatores ambientais como radiação solar, temperatura, umidade e pH, conforme se pode observar no Quadro 1 e na Tabela 1. Dentre eles, os parasitas, representados por protozoários e principalmente helmintos, são os mais resistentes, pois podem ficar encistados e seus ovos apresentam maior resistência (THOMAZ-SOCCOL et al., 2010; PEPPER et al., 2006). Já as bactérias intestinais, tanto no lodo *in natura* quanto no incorporado ao solo, tendem a desaparecer mais rapidamente, pois são menos resistentes a meios considerados inóspitos para sua sobrevivência (THOMAZ-SOCCOL et al., 2010).

Tabela 1. Interferência de fatores ambientais na viabilidade de ovos de helmintos e na sobrevivência de microrganismos presentes no lodo de esgoto.

Fator Ambiental	Características
Luz solar	Todos os organismos são sensíveis a irradiação ultra-violeta a 265nm.
Temperatura	Temperatura ideal é de 18 a 28°C. Bactérias podem se reproduzir no verão. Para inviabilizar ovos de helmintos deve-se atingir temperaturas acima de 65°C por mais de cinco minutos.
Umidade	Muitos organismos são sensíveis à dessecação, e a umidade ideal é acima de 70%.
pH	Valores extremos de pH desfavorecem a sobrevivência de organismos patogênicos.

Fonte: Adaptado de Thomaz-Soccol et al. (2010).

Além disso, é importante ressaltar que, do ponto de vista epidemiológico, a presença de organismos patogênicos em efluentes sanitários, solos, ou até mesmo em culturas, não representa, necessariamente, a transmissão de doenças (HESPANHOL, 2003; BERNARDE, 1973 apud KELLEY et al., 1984).

Tabela 2. Influência de fatores ambientais no tempo de sobrevivência de microrganismos patogênicos.

Parâmetro	Tempo de sobrevivência		
	Virus	Bactérias	Protozoários
Aumento de Temperatura	-	-	-
Diminuição da umidade do solo	-	-	-
Aumento da taxa de dissecação	-	-	-
Aumento do teor de argila	+	+	Não conhecido
pH entre 6 e 8	+	+	+

- Diminuição do tempo de sobrevivência; + Aumento do tempo de sobrevivência

Fonte: Pepper et al. (2006).

## 2.2 A Resolução CONAMA nº 375 de 29 de agosto de 2006

A Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) nº 375, promulgada pelo Ministério do Meio Ambiente no dia 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” (BRASIL, 2006).

Em outras palavras, a referida resolução preconiza critérios e procedimentos para o uso de lodos de esgoto sanitário e seus produtos derivados, em áreas agrícolas, abrangendo temas envolvendo os benefícios do uso agrícola deste tipo de resíduo e também os potenciais problemas acerca dos riscos à saúde pública e ao meio ambiente (TABACZENSKI, 2010).

De acordo com o Anexo I do art. 3º da referida Resolução, os lodos gerados em sistemas de tratamento de esgoto só poderão ser destinados para uso agrícola se submetidos a processo de redução de patógenos (BRASIL, 2006).

Uma norma internacional, estabelecida pela United States Environmental Protection Agency (USEPA, 1993), CFR Part 503 – Appendix B, Federal Register, de 19 de fevereiro de 1993, foi utilizada como base pela Resolução do CONAMA para descrever os processos de redução significativa e adicional de patógenos, o que divide o lodo em Classe A ou B, conforme apresentado pela Tabela 2. Porém, apesar de restringir o uso do lodo de esgoto, a Resolução 375/2006 deixou abertura para propostas de novos projetos e estudos, desde que comprovada sua eficiência e obtida a aprovação por parte do órgão ambiental competente (TABACZENSKI, 2010).

Art. 14. A utilização de lodo de esgoto ou produto derivado enquadrado como classe B é restrita ao cultivo de café, silvicultura, culturas para produção de fibras e óleos, com a aplicação mecanizada, em sulcos ou covas, seguida de incorporação, respeitadas as restrições previstas no art. 15 e no inciso XI, do art. 18 desta resolução (BRASIL, 2006).

São vetados pela Resolução, de acordo com o art. 1º, inciso VII, a utilização agrícola de lodo de esgoto não estabilizado (BRASIL, 2006).

Tabela 3. Classificação do lodo de esgoto de acordo com a concentração de agentes patogênicos.

Tipo de lodo de esgoto	Concentração de patógenos
A	Coliformes Termotolerantes < 10 <sup>3</sup> NMP / g de ST Ovos viáveis de helmintos < 0,25 ovo / g de ST <i>Salmonella</i> ausência em 10 g de ST Vírus < 0,25 UFP ou UFF / g de ST
B	Coliformes Termotolerantes < 10 <sup>6</sup> NMP / g de ST Ovos viáveis de helmintos < 10 ovos / g de ST

ST = Sólidos totais; NMP = Número Mais Provável; UFF = Unidade Formadora de Foco; UFP = Unidade Formadora de Placa.

Fonte: Brasil (2006).

No Brasil, a implantação desta Resolução reacendeu a preocupação e os debates acerca dos riscos referentes à saúde humana e animal, bem como ao meio ambiente, quanto à adoção da reciclagem no lodo de esgoto sanitário para o benefício agrícola. Com o estabelecimento de parâmetros para se definir os riscos aceitáveis resultantes da aplicação do lodo em campo, se pode avaliar com maior segurança a possibilidade de contaminação por patógenos ligados à cadeia alimentar (THOMAZ-SOCCOL et al., 2010).

Porém, muitos consideram que a referida norma trata com alta rigidez os critérios para o uso agrícola do lodo, o que tem levantado inúmeras discussões entre especialistas, empresas, profissionais e órgão ambientais quanto à sua flexibilização. O principal embasamento deste questionamento está nas legislações estrangeiras, principalmente a americana e a europeia, que são muito menos restritivas quanto à aplicação do lodo de esgoto no solo (THOMAZ-SOCCOL et al., 2010).

Thomaz-Soccol et al. (2010) afirmam, ainda, que para se criar normas como esta em países em desenvolvimento deve-se observar com devida atenção as peculiaridades do país, tais como o índice de parasitismo por helmintos da população; a falta de notificação compulsória das infecções parasitárias; as condições socioeconômicas, educacionais, nutricionais e de saúde da população; a diversidade de espécies de parasitos no país; as condições higiênico-sanitárias e infraestrutura de saneamento básico; e, por fim, as condições ambientais como clima, temperatura e tipo de solo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado e conduzido no município de Avaré-SP, em área de plantio florestal de clone híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* pertencente à empresa Suzano Papel e Celulose S/A. O plantio das mudas foi realizado na primeira semana de fevereiro/2014 e ao final dos 12 meses de experimento as plantas se encontravam com altura superior a 4 m.

De acordo com a classificação de Köppen e Geiger (1928), o clima do município de Avaré é classificado como temperado úmido com verões quentes, possui pluviosidade significativa ao longo do ano (1282 mm) e temperatura média anual de 20,3 °C (CLIMATE-DATA, 2015).

Foram utilizados dois diferentes lodos de esgoto sanitário, sendo um fornecido pela Companhia Saneamento de Jundiaí (CSJ) e o outro fornecido pela Estação de Tratamento de Esgotos de Taubaté/Tremembé, pertencente à Sabesp.

O sistema de tratamento de esgoto da CSJ, com capacidade de tratamento de 1530 L s<sup>-1</sup>, possui modelo convencional com lagoas de aeração de mistura completa seguidas de lagoas de decantação. O lodo de esgoto desta ETE é digerido por um período médio de seis meses antes de ser dragado e desaguado, contendo por isso uma menor densidade de organismos indicadores de patogenicidade.

Já a ETE Taubaté/Tremembé, com capacidade de tratamento de 1540 L s<sup>-1</sup>, possui sistema de lodo ativado convencional em tanques aerados com oxigênio puro, onde parte do lodo de esgoto volta ao sistema de tratamento e o excedente é descartado poucas horas após sua decantação. Trata-se de um lodo menos digerido e com elevado teor de sólidos voláteis. O lodo utilizado neste experimento foi proveniente de tal excedente descartado.

### 3.1 Delineamento experimental e tratamentos

O experimento possuiu delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições e parcelas de dimensão 10m x 9m (Figura 1) e dois tratamentos, descritos a seguir.

- Tratamento A: Aplicação mecânica do lodo de esgoto proveniente de Jundiaí, em taxa agronômica, na superfície do solo da linha de plantio.
- Tratamento B: Aplicação mecânica do lodo de esgoto proveniente de Taubaté, em taxa agronômica, na superfície do solo da linha de plantio.

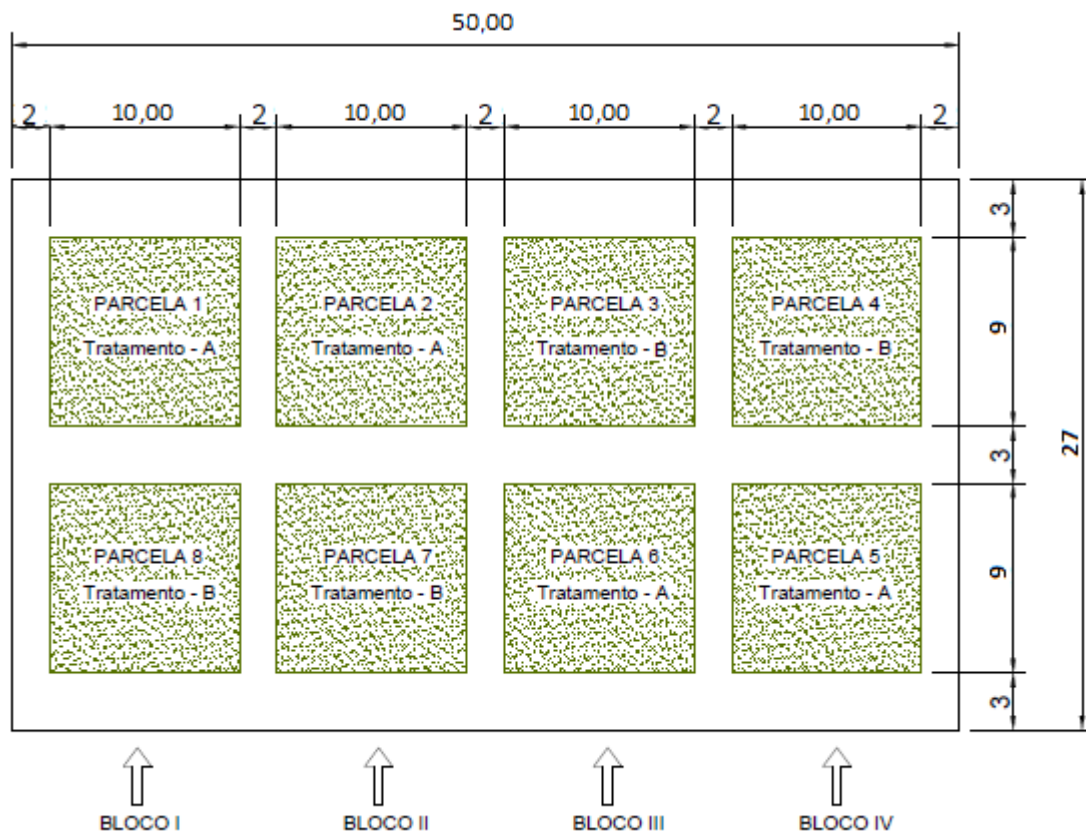


Figura 1. Esquema de disposição dos blocos e suas parcelas com os tratamentos aplicados em campo.

A utilização de lodos provenientes de duas localidades diferentes justifica-se pela tentativa de se abranger diferentes qualidades de lodo do ponto de vista patogênico, uma vez que os Sistemas de Tratamento de Esgoto do Brasil não apresentam uma uniformidade que permita similaridade microbiológica entre si. Sendo assim, optou-se por aplicar e analisar dois lodos de esgoto distintos para que se possa abordar diferentes realidades.

Conforme já mencionado anteriormente, o lodo proveniente de Jundiá é considerado estabilizado por permanecer por um longo período na lagoa de tratamento antes de ser desaguado e, conseqüentemente, sua carga microbiana é reduzida. Já o lodo proveniente de Taubaté permanece nas lagoas de tratamento por apenas algumas horas antes de ser desaguado, concentrando um número muito maior de microrganismos.

A instalação do experimento foi dividida em duas etapas. Na primeira etapa, realizada no dia 10 de fevereiro de 2014, foram instaladas as parcelas que receberam o Tratamento A. Já na segunda etapa, realizada no dia 17 de março de 2014, foram instaladas as parcelas que receberam o Tratamento B.

Para posterior resgate da amostra integral do lodo, o mesmo foi acondicionado em sacos de dimensões 0,2m x 1,0m confeccionados em tecido “vazado” do tipo tule, conforme ilustrado pela Figura 2, para permitir a interação do lodo com o solo. A massa de lodo (12 kg) acondicionada em cada *bag* foi compatível com a quantidade de lodo distribuída por metro linear da faixa de aplicação e na taxa previamente definida.

Considerando-se o espaçamento 3m x 2m, foram plantadas 1667 plantas por hectare. Para o cálculo da taxa de aplicação do lodo de esgoto, foi utilizada a recomendação de nitrogênio de 60 kg ha<sup>-1</sup> para a cultura de eucalipto (GONÇALVES et al., 1996). Tendo em vista que apenas 30% do nitrogênio total presente no lodo é mineralizado no primeiro ano, na realidade seriam necessários 200 kg de N ha<sup>-1</sup> presentes no lodo para atender à recomendação. De acordo com as análises químicas realizadas nos lodos utilizados nos tratamentos, 2,5% (25g N kg<sup>-1</sup> massa seca) da massa seca de lodo corresponde ao nitrogênio total, sendo então necessários 8 ton ha<sup>-1</sup> de lodo de esgoto em massa seca, ou seja, 40 ton ha<sup>-1</sup> em massa total (umidade 80%) e 12 kg por metro linear.

Como as amostragens foram destrutivas, cada parcela (repetição) recebeu 14 sacos com amostras do lodo para realização das análises ao longo das 52 semanas de coleta de dados. A disposição dos sacos de lodo em cada parcela está representada na Figura 3.



Figura 2. Acondicionamento do lodo de esgoto em sacos de tecido tipo tule de dimensões 0,2m x 1,0m. Disposição na superfície do solo na linha de plantio.

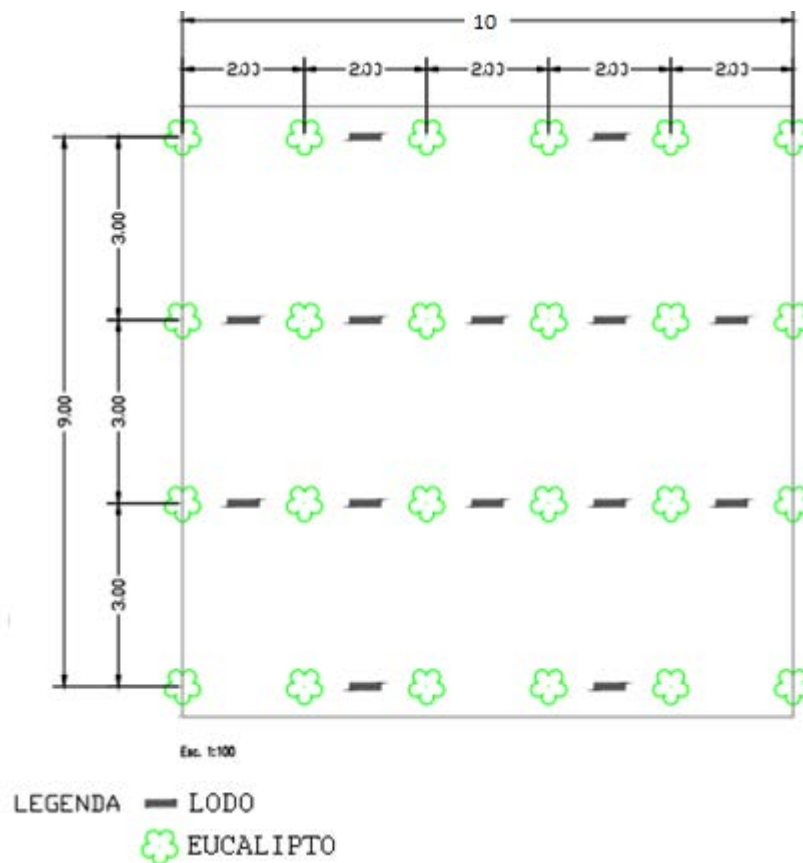


Figura 3. Detalhe da parcela experimental com esquema de disposição do lodo nas linhas de plantio do eucalipto.

### 3.2 Caracterização dos lodos utilizados

Antes da implantação do experimento, amostras dos dois lodos utilizados foram enviadas para o Laboratório de Análises Ambientais da CETESB/São Paulo para caracterização segundo as concentrações de coliformes termotolerantes, ovos viáveis de *Ascaris* spp, *Salmonella* spp e enterovírus estabelecidas pela Resolução nº 375/2006 do CONAMA (BRASIL, 2006).

De acordo com os resultados analíticos obtidos (Tabela 3), e adotando-se os parâmetros estabelecidos pela referida Resolução para classificação de lodo de esgoto de acordo com a concentração de agentes patogênicos (Item 2.2, Tabela 2), ambos os lodos foram classificados como Classe B.

Tabela 4. Indicadores patogênicos para caracterização dos lodos de esgoto sanitário utilizados no experimento.

Lodo de esgoto	Grupo patogênico	Intervalo
Jundiaí	Coliformes termotolerantes	$1,6 \cdot 10^4$ a $1,6 \cdot 10^5$ NMP gST <sup>-1</sup>
	<i>Salmonella</i> spp	0,31 a 5,48 NMP gST <sup>-1</sup>
	Ovos de <i>Ascaris</i> spp	0,1 ovo gST <sup>-1</sup>
	Enterovírus	0,22 a 0,42 UFP gST <sup>-1</sup>
Taubaté	Coliformes termotolerantes	$8,5 \cdot 10^5$ a $2,6 \cdot 10^6$ NMP gST <sup>-1</sup>
	<i>Salmonella</i> spp	1,51 a 9,37 NMP gST <sup>-1</sup>
	Ovos de <i>Ascaris</i> spp	3,8 a 6,1 ovos gST <sup>-1</sup>
	Enterovírus	0,54 a 10,89 UFP gST <sup>-1</sup>

Ainda assim, é importante ressaltar que, do ponto de vista epidemiológico, o lodo proveniente de Jundiaí apresentou melhores resultados do que o lodo proveniente de Taubaté, estando, inclusive, o índice de ovos viáveis de *Ascaris* compatível com o limite estabelecido pela referida Resolução para lodos de esgoto Classe A.

Esses resultados demonstram que o lodo de Jundiaí pode ser considerado bem menos patogênico que o de Taubaté, o que reforça o objetivo deste experimento em testar duas qualidades diferentes de lodo de esgoto para abranger da melhor forma possível a realidade brasileira.

### 3.3 Caracterização do solo

Antes do início do estudo, amostras compostas do solo em pontos aleatórios no local do experimento foram coletadas, a 0,20 m de profundidade, e enviadas para o Laboratório de Análises de Solo do Departamento de Solos e Recursos Ambientais da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP/Botucatu, onde foram realizadas análises química (Tabela 4) e física (Tabela 5) para se determinar o pH, a condutividade elétrica e as concentrações de macro e micronutrientes, tais como nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn), ferro (Fe) e boro (B).

Tabela 5. Características químicas do solo na área experimental.

pH	M.O. CaCl <sup>2</sup>	P resina mg dm <sup>-3</sup>	Al <sup>3+</sup>	H <sup>+</sup> Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%
	g dm <sup>-3</sup>		----- mmolc dm <sup>-3</sup> -----							
4,9	16,0	9,5	---	22,2	6,5	34,8	7,5	43,8	66,3	63,8
	S	B	Cu		Fe		Mn		Zn	
	----- mg dm <sup>-3</sup> -----									
	---	0,7	0,6		57,0		5,9		0,7	

Tabela 6. Características físicas do solo na área experimental.

Areia			Argila	Silte	Textura do solo	Condutividade elétrica ( $\mu\text{s cm}^{-1}$ )
Grossa	Fina	Total				
----- (g Kg <sup>-1</sup> ) -----						
382,0	549,0	931,0	61,0	9,0	Arenosa	182,1

Análises microbiológicas do solo, coletado antes e ao final do experimento, foram realizadas pelo Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da CETESB/São Paulo, onde foi determinado o número de ovos de *Ascaris* spp viáveis, coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp e enterovírus, seguindo-se os mesmos métodos utilizados para análise do lodo de esgoto. Os resultados estão apresentados na Tabela 6 e na Tabela 7.

Dentre os microrganismos patogênicos analisados, apenas os coliformes termotolerantes apresentaram resultados positivos, o que pode ser resultado da eventual presença de bovinos e animais silvestres na área experimental.

Os demais grupos de patógenos apresentaram números em normalidade para condições naturais, não caracterizando nenhum tipo de contaminação microbiológica no solo a receber aplicação do lodo de esgoto.

Tabela 7. Resultados analíticos iniciais de indicadores patogênicos presentes no solo da área experimental (por bloco).

Bloco	Grupo patogênico	Resultados
I	Coliformes termotolerantes	25,00 NMP gST <sup>-1</sup>
	<i>Salmonella</i> spp	< 0,07 NMP gST <sup>-1</sup>
	Ovos de <i>Ascaris</i> spp	< 0,10 ovo gST <sup>-1</sup>
	Enterovírus	< 0,33 UFP gST <sup>-1</sup>
II	Coliformes termotolerantes	2,40 NMP gST <sup>-1</sup>
	<i>Salmonella</i> spp	< 0,07 NMP gST <sup>-1</sup>
	Ovos de <i>Ascaris</i> spp	< 0,10 ovo gST <sup>-1</sup>
	Enterovírus	< 0,51 UFP gST <sup>-1</sup>
III	Coliformes termotolerantes	0,82 NMP gST <sup>-1</sup>
	<i>Salmonella</i> spp	< 0,07 NMP gST <sup>-1</sup>
	Ovos de <i>Ascaris</i> spp	< 0,10 ovo gST <sup>-1</sup>
	Enterovírus	< 0,32 UFP gST <sup>-1</sup>
IV	Coliformes termotolerantes	0,47 NMP gST <sup>-1</sup>
	<i>Salmonella</i> spp	< 0,07 NMP gST <sup>-1</sup>
	Ovos de <i>Ascaris</i> spp	< 0,10 ovo gST <sup>-1</sup>
	Enterovírus	< 0,29 UFP gST <sup>-1</sup>

Ao término do experimento, como pode ser observado na Tabela 7, nenhum dos microrganismos patogênicos analisados apresentaram incremento relevante em seus índices no solo.

Tabela 8. Resultados analíticos finais de indicadores patogênicos presentes no solo da área experimental (por bloco).

Bloco	Grupo patogênico	Resultados
I	Coliformes termotolerantes	54,00 NMP gST <sup>-1</sup>
	<i>Salmonella</i> spp	< 0,07 NMP gST <sup>-1</sup>
	Ovos de <i>Ascaris</i> spp	< 0,10 ovo gST <sup>-1</sup>
II	Coliformes termotolerantes	51,00NMP gST <sup>-1</sup>
	<i>Salmonella</i> spp	< 0,07 NMP gST <sup>-1</sup>
	Ovos de <i>Ascaris</i> spp	< 0,10 ovo gST <sup>-1</sup>
III	Coliformes termotolerantes	9,00 NMP gST <sup>-1</sup>
	<i>Salmonella</i> spp	< 0,07 NMP gST <sup>-1</sup>
	Ovos de <i>Ascaris</i> spp	< 0,10 ovo gST <sup>-1</sup>
IV	Coliformes termotolerantes	10,00 NMP gST <sup>-1</sup>
	<i>Salmonella</i> spp	< 0,07 NMP gST <sup>-1</sup>
	Ovos de <i>Ascaris</i> spp	< 0,10 ovo gST <sup>-1</sup>

### 3.4 Coleta de dados

#### 3.4.1 Índice pluviométrico e temperatura e umidade do solo e dos lodos

O índice pluviométrico foi monitorado diariamente por pluviômetro Decagon ECH<sub>2</sub>O Rain Model ECRN-50 conectado a um data logger Decagon Em5b.

A temperatura e a umidade do solo também foram monitoradas de hora em hora por sensores Decagon 5 TM – Moisture Temperature instalados na superfície do solo, a 0,10 m e a 0,20 m de profundidade, sendo os dados armazenados em data logger Decagon Em 50.

A umidade das amostras de lodo de esgoto foi aferida em laboratório, antes do início das análises para determinação dos microrganismos patogênicos estudados, utilizando-se balança determinadora de umidade.

#### 3.4.2 Amostragem do lodo de esgoto

Após a instalação do experimento, uma equipe foi a campo realizar a coleta das amostras de lodo, de forma aleatória, de acordo com a frequência apresentada na Tabela 8, em um período de 52 semanas.

Tabela 9. Frequência de coleta de amostras em campo para análises.

Tipo de análise	Coleta de amostra (semanas)
Enterovírus	0, 1, 2
Ovos viáveis de <i>Ascaris</i> spp	0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 28, 36, 44, 52
Coliformes termotolerantes	0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 28, 36, 44, 52
<i>Salmonella</i> sp	0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 28, 36, 44, 52

#### 3.4.3 Métodos para determinação de indicadores patogênicos

Após coletadas em campo, as amostras de lodo foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados e encaminhadas, em um intervalo máximo de quatro horas, para o Laboratório de Análises Ambientais da CETESB/São Paulo, onde foi realizada a determinação dos indicadores patogênicos presentes no material, de acordo com os métodos descritos adiante.

### 3.4.3.1 Ovos viáveis de *Ascaris spp*

Os ovos viáveis de *Ascaris spp* foram detectados e quantificados segundo método da Agência Ambiental Americana (USEPA, 2003b), modificado.

Inicialmente determinou-se o teor estimado de sólidos totais da amostra de lodo de esgoto. Com base no resultado obtido, foi pesada uma massa de amostra equivalente a 10 g de sólidos totais.

Em seguida, a amostra foi suspensa em água destilada até completado o volume de 400 mL e incubada a temperatura entre 4°C e 10°C em período *over night*. Após a hidratação, a amostra foi homogeneizada em homogeneizador *blender* (Figura 4) e dividida em quatro béqueres, onde foi adicionada solução 7X 1% até completar o volume de 900 mL.

Os béqueres foram novamente incubados a temperatura entre 4°C e 10°C em período *over night* e então o sobrenadante foi aspirado por bomba de vácuo/pressão (Figura 4).

Novamente as amostras foram homogeneizadas e o volume de 900 mL com solução 7X 1% foi completado, para posterior incubação a temperatura entre 4°C e 10°C em período *over night*.

Após a incubação e sedimentação, o sobrenadante foi aspirado por bomba vácuo/pressão e foi adicionado o volume de 300 mL de solução 7X 1%, sendo a amostra então homogeneizada por 5 minutos em agitador magnético.

Feito o processo de hidratação e sedimentação inicial, iniciou-se o processo de peneiramento e separação de partículas sólidas. Inicialmente utilizou-se uma peneira de malha 50 *mesh* (Figura 4) para separar as partículas sólidas maiores, unindo as amostras divididas anteriormente em quatro béqueres em apenas um.

Quando necessário, completou-se o volume da amostra para 900 mL adicionando-se solução 7X 1%. A amostra foi então incubada a temperatura entre 4°C e 10°C em período *over night* para sedimentação e em seguida foi realizada a aspiração do sobrenadante.

O material sedimentado foi igualmente distribuído em tubos cônicos graduados para centrífuga com capacidade de 50 mL. As amostras foram então centrifugadas (Figura 4) a 1000g por 10 minutos em centrífuga de bancada com rotores *swinging-bucket* e capacidade de acomodação de tubos cônicos de 50 mL. O sobrenadante foi aspirado e descartado.

Em seguida, deu-se início ao processo de flotação, onde foram adicionados de 10 a 15 mL de solução de  $MgSO_4$  com gravidade específica 1,20 em cada tubo, homogeneizando-se as amostras por 15 a 20 segundos em vortex.

Após a homogeneização, completou-se o volume de cada tubo para 40 mL adicionando-se solução de  $MgSO_4$ . Os tubos foram então centrifugados a 1000g por período de cinco a 10 minutos.



Figura 4. **A** - Homogeneização de amostra em homogeneizador *blender*. **B** - Aspiração do sobrenadante por bomba vácuo/pressão. **C** - Processo de peneiramento da amostra com peneira de malha 50 *mesh*. **D** - Centrifugação de amostras em centrífuga de bancada com rotores *swinging-bucket*.

Dando continuidade ao processo de separação de partículas, utilizou-se uma peneira de 400 *mesh* para coletar o sedimento do fluido de flotação, que foi então transferido para tubos cônicos graduados com capacidade para 50 mL a serem centrifugados a 100 g por cinco minutos.

O sobrenadante foi aspirado por bomba vácuo/pressão e o sedimento foi ressuspensão em 4 mL de solução de formalina 0,5% e colocado em frascos de cintilação com capacidade para 25 mL.

Foram preparados, então, os controles positivo e negativo de acordo com as descrições a seguir:

- Controle positivo: 50µl de ovos viáveis de *Ascaris suum* em 4 mL de solução de formalina 0,5%.

- Controle negativo: 50µl de ovos viáveis de *Ascaris suum* aquecidos a 60°C durante 15 minutos e então suspensos em 4 mL de solução de formalina 0,5%.

Todos os frascos, tanto das amostras quanto dos controles, foram incubados a  $\pm 26^{\circ}\text{C}$  durante o período de três a quatro semanas.

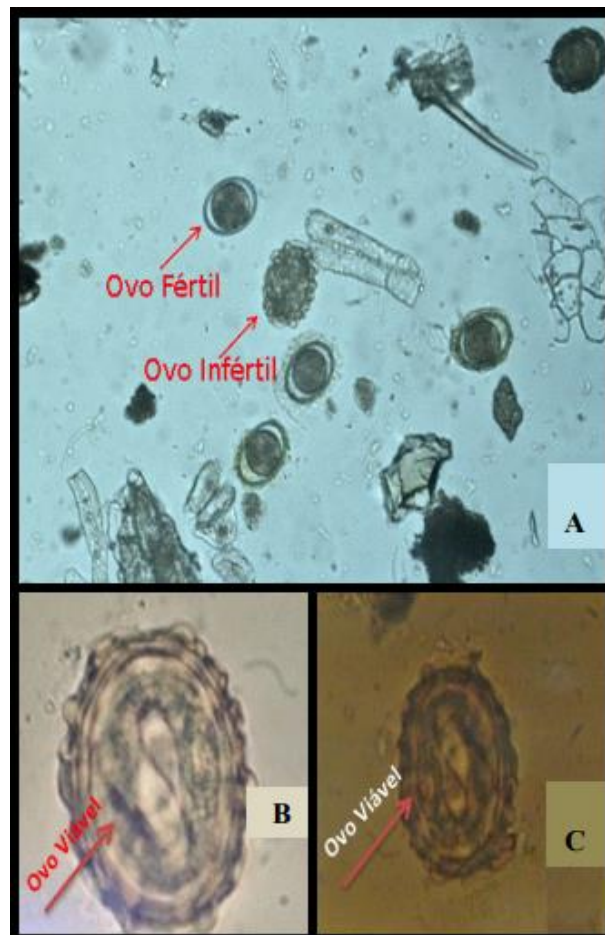


Figura 5. **A** - Ovos de *Ascaris* spp fértil e infértil. **B e C** - Ovos viáveis (embrionados) de *Ascaris* spp (CETESB, 2013).

A partir da terceira semana, o sedimento do frasco de controle positivo foi suspenso, sendo então retirada uma pequena amostra do líquido para análise microscópica.

Quando a maior parte dos ovos de *Ascaris* do frasco controle positivo estavam completamente embrionados, conforme apresentado na Figura 5, as amostras foram consideradas prontas para leitura.

Os concentrados foram examinados em microscópio óptico de campo claro e lentes objetivas de 10x a 45x, utilizando uma câmara de “Sedgwick-Rafter” para contar os ovos detectados que foram classificados como embrionados (viáveis) ou não. Os resultados foram expressos em nº de ovos viáveis/g de sólidos totais.

#### 3.4.3.2 *Salmonella* spp

A determinação de *Salmonella* spp foi realizada de acordo com o método 1682 proposto pela Agência Ambiental Americana (USEPA, 2006), um método semi-quantitativo pelo qual o Número Mais Provável (NMP) de *Salmonella* spp é determinado.

Inicialmente 30g da amostra foram pesados e diluídos em 270 mL de água de diluição e então homogeneizados em homogeneizador *blender* em alta velocidade durante dois minutos.

O pH foi verificado e, quando necessário, foi realizado o ajuste para 7,0 – 7,5 adicionando-se ácido clorídrico 1,0 N ou hidróxido de sódio 0,1 N de acordo com a alcalinidade ou acidez, respectivamente.

Foi realizado, então, o enriquecimento das amostras em meio TSB de acordo com o seguinte esquema:

- Primeira série de tubos: 20 mL (equivalente a 2,0 g da amostra original) em cada um dos cinco tubos contendo 10 mL de TSB 3X concentrado;
- Segunda série de tubos: 10 mL (equivalente a 1,0 g da amostra original) em cada um dos cinco tubos contendo 5 mL de TSB 3X concentrado;
- Terceira série de tubos: 01 mL (equivalente a 0,1 g da amostra original) em cada um dos cinco tubos contendo 10 mL de TSB 1X concentrado.

As amostras foram então incubadas a  $36\pm 1,5^{\circ}\text{C}$  por  $24\pm 2\text{h}$ . Os tubos de TSB que apresentaram turbidez ao fim do período de incubação foram selecionados para a próxima fase do processo.

Seis gotas (30  $\mu\text{L}$ ) de cada tubo TSB com turbidez devidamente homogeneizado foram aplicadas em uma placa de meio de cultura MSR.V. Em seguida, as

placas foram incubadas a  $42 \pm 0,5^\circ \text{C}$  durante 16 a 18 horas em incubadora com umidade controlada.

Após finalizado o período de incubação, foi observado o aparecimento de motilidade em torno da inoculação, que é evidenciado por um halo esbranquiçado de crescimento de aproximadamente 2 cm do centro da mancha (Figura 6).

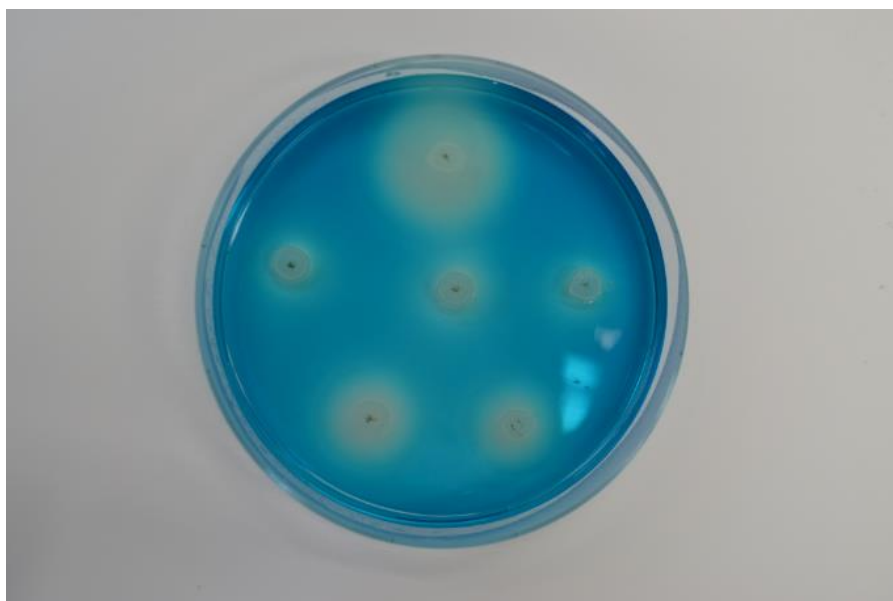


Figura 6. Placa MSRV após incubação a  $42 \pm 0,5^\circ \text{C}$  por 16 a 18 horas, com presença de halos esbranquiçados em torno da inoculação, representando sinais de motilidade. Resultado presuntivo positivo para presença de *Salmonella* spp.

Utilizando-se uma alça de inoculação estéril *loop*, retirou-se um inóculo do halo da borda externa da colônia-alvo até a metade da colônia e então estriou-se em uma placa de meio de cultura seletivo XLD. Este passo foi repetido em todas as colônias onde foram identificados os halos brancos.

As placas XLD foram incubadas a  $36 \pm 1,5^\circ \text{C}$  durante um período de 18 a 24 horas. As colônias com coloração cor-de-rosa ao vermelho com centros pretos e também algumas colônias vermelhas a cor-de-rosa foram consideradas presuntivas positivas para *Salmonella* sp, conforme ilustrado pela Figura 7.

As colônias com resultado presuntivo positivo foram inoculadas em tubos de IAL (Figura 8) com o auxílio de uma alça de inoculação. A inoculação foi feita através da picada em profundidade e de estrias na superfície. Após a inoculação os tubos foram submetidos à incubação a  $36 \pm 1,5^\circ \text{C}$  durante um período de 18 a 24 horas.

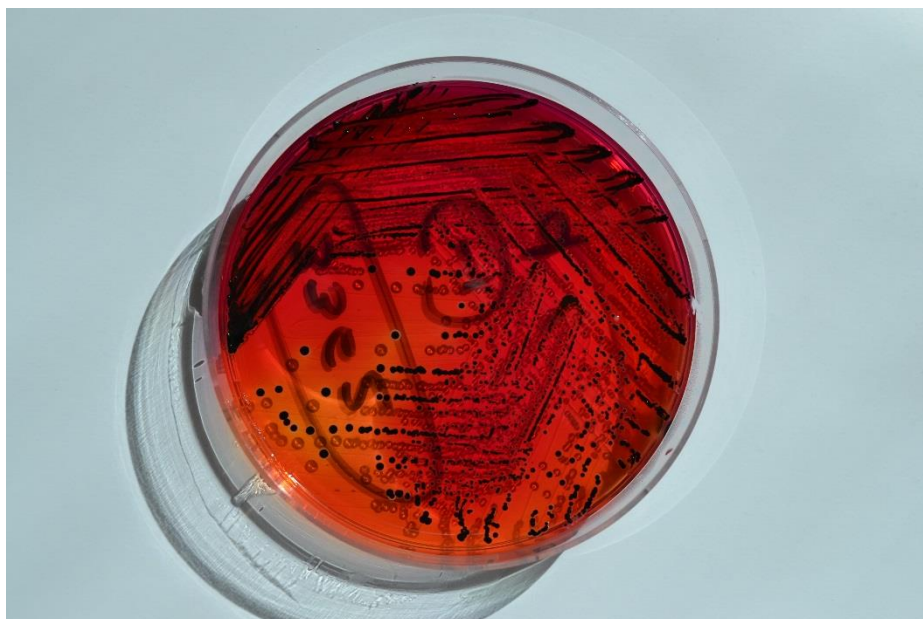


Figura 7. Placa XLD após incubação a  $36 \pm 1,5^\circ \text{C}$  por 18 a 24 horas com resultado presuntivo positivo para presença de *Salmonella* spp, com colônias rosa-avermelhadas com centro negro, característica de bactérias gram-negativas.

Após o período determinado para incubação, foi efetuada a leitura dos tubos de IAL de acordo com as características bioquímicas determinadas para *Salmonella* e descritas a seguir.

- Fase inferior:
  - Motilidade positiva: crescimento difuso a partir da picada (exceções: *S.gallinarum* e *S.pullorum*);
  - lisina-descarboxilase positiva: cor violeta (exceções: *S. paratyphi A* e algumas culturas de *S. Typhimurium*).
- Fase superior:
  - triptofano desaminase negativa: não se verifica a coloração verde-acastanhada na superfície inclinada;
  - sacarose negativa: coloração azul na superfície da fase superior;
  - glicose positiva: coloração amarela na profundidade da fase superior;
  - sulfeto de hidrogênio positivo: coloração negra na profundidade da fase superior (exceções: *S. paratyphi A* e *S. choleraesuis*, sendo que a *S. typhi* só produz sulfeto de hidrogênio após 48 horas);

- Urease negativa: não se verifica coloração azul na profundidade da fase superior;
- Gás positivo: presença de bolhas na profundidade da fase superior (exceção *S. typhi*).



Figura 8. Tubos de IAL para observação de características bioquímicas determinadas para *Salmonella* spp.

A confirmação de cada tubo de IAL com resultado presuntivo positivo para *Salmonella* spp foi realizada através de testes sorológicos utilizando-se soros anti-*Salmonella* polivalente somático e anti-*Salmonella* polivalente flagelar.

Em cada tubo de IAL com resultado presuntivo positivo para *Salmonella* spp foi introduzida uma pequena quantidade de algodão hidrófilo e utilizando-se uma pipeta Pasteur adicionou-se ao tubo cerca de cinco gotas de solução fisiológica 0,85% NaCl.

Com a ponta da pipeta Pasteur e auxílio do algodão hidrófilo, todo o crescimento bacteriano da superfície do IAL foi ressuspenso até se obter uma suspensão densa da cultura em solução fisiológica. Ainda com auxílio da pipeta Pasteur, um inóculo da suspensão da cultura foi coletado e uma gota foi distribuída em cada um dos três quadrados de uma placa de vidro (com quadriculados em sua superfície de 20x20mm), adaptada a uma caixa de Huddleson.

A cada uma das gotas da suspensão da cultura, foram adicionadas uma gota de soro anti-*Salmonella* polivalente somático, uma gota de soro anti-*Salmonella* polivalente flagelar e uma gota de solução salina 2%.

Foi então observada a reação de aglutinação nos soros somático e/ou flagelar, o que indica resultado positivo. Os resultados positivos dos tubos de IAL foram correlacionados com as respectivas placas de XLD/MRSV e tubos de TSB para determinar o NMP.

A densidade estimada de *Salmonella* spp (NMP/g de sólidos totais) foi calculada de acordo com a Equação 01.

$$\text{NMP/g de ST} = \frac{\text{NMP} / \text{mL de peso úmido} / 0,1}{\% \text{ ST expresso em decimal}} \quad (\text{Equação 01})$$

#### 3.4.3.3 Enterovírus

A determinação de enterovírus no lodo de esgoto foi realizada segundo os procedimentos estabelecidos por metodologia da *United States Environmental Protection Agency* (USEPA, 2003a), modificado por USEPA (2007b).

Inicialmente determinou-se o teor estimado de sólidos totais da amostra de lodo de esgoto. Com base no resultado obtido, foi pesada uma massa de amostra equivalente a 12 g de sólidos totais, que foi então diluída em suspensão de extrato de carne 3%, ajustando-se o pH para 7,0 com ácido clorídrico 6N ou hidróxido de sódio 6N.

Os sólidos foram separados por centrifugação utilizando-se centrífuga refrigerada estéril com rotação 2500 rpm por 30 minutos e o sobrenadante foi então concentrado por floculação orgânica, baixando-se o pH para 3,5 para que ocorresse a floculação.

Após evaporação do clorofórmio a amostra foi tratada com antibióticos para descontaminação.

Testes de esterilidade foram realizados para comprovar-se a ausência de fungos e bactérias. As amostras assim concentradas foram inoculadas em cultura de células RD (rabdiosarcoma humano) segundo a técnica de plaqueamento em meio gelificado (APHA 2012). As placas de lise foram contadas durante 14 dias. Os resultados finais foram expressos em UFP (Unidades Formadoras de Placa) por grama de sólidos totais analisados.

#### 3.4.3.4 Coliformes termotolerantes

Os coliformes termotolerantes foram analisados pela técnica de tubos múltiplos com o meio de cultura A1, segundo metodologia descrita no “Standard Methods” (APHA, 2012).

Inicialmente 30g de cada amostra foram pesados e diluídos em 270 mL de água de diluição e então homogeneizados em homogeneizador *blender* em baixa velocidade durante um a dois minutos.

Em seguida, volumes decimais (10 mL) da amostra foram inoculados com pipeta esterilizada em séries de cinco tubos de meio de cultura A1 em diferentes concentrações, conforme ilustrado pela Figura 9. Os tubos inoculados foram então pré-incubados durante 3 horas a  $35^{\circ} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ , e em seguida incubados a  $44,5^{\circ} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$  durante  $24 \pm 2\text{h}$ .

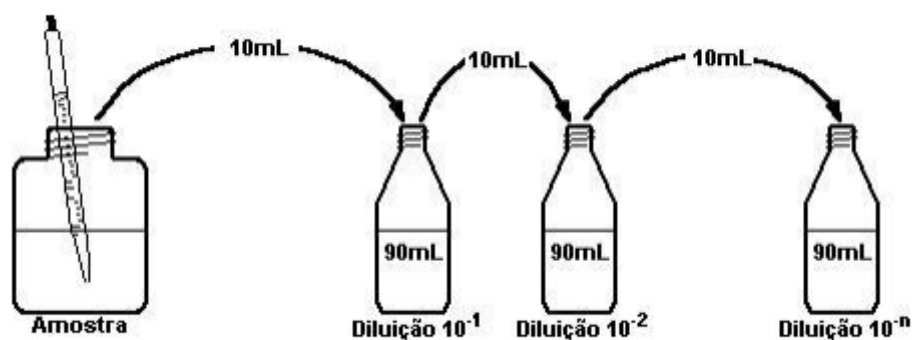


Figura 9. Esquema de preparo de diluições decimais para determinação de coliformes termotolerantes por meio da técnica de tubos múltiplos (CETESB, 2007).

Após a incubação foi realizada a leitura, verificando-se o número de tubos positivos (com formação de gás) e negativos (sem formação de gás) em cada série. A Figura 10 ilustra o esquema de análises para a determinação do NMP de coliformes termotolerantes. O número mais provável foi estimado utilizando-se a Tabela de Tubos Múltiplos (APHA, 2012). Os resultados foram expressos em 100g de sólidos totais.

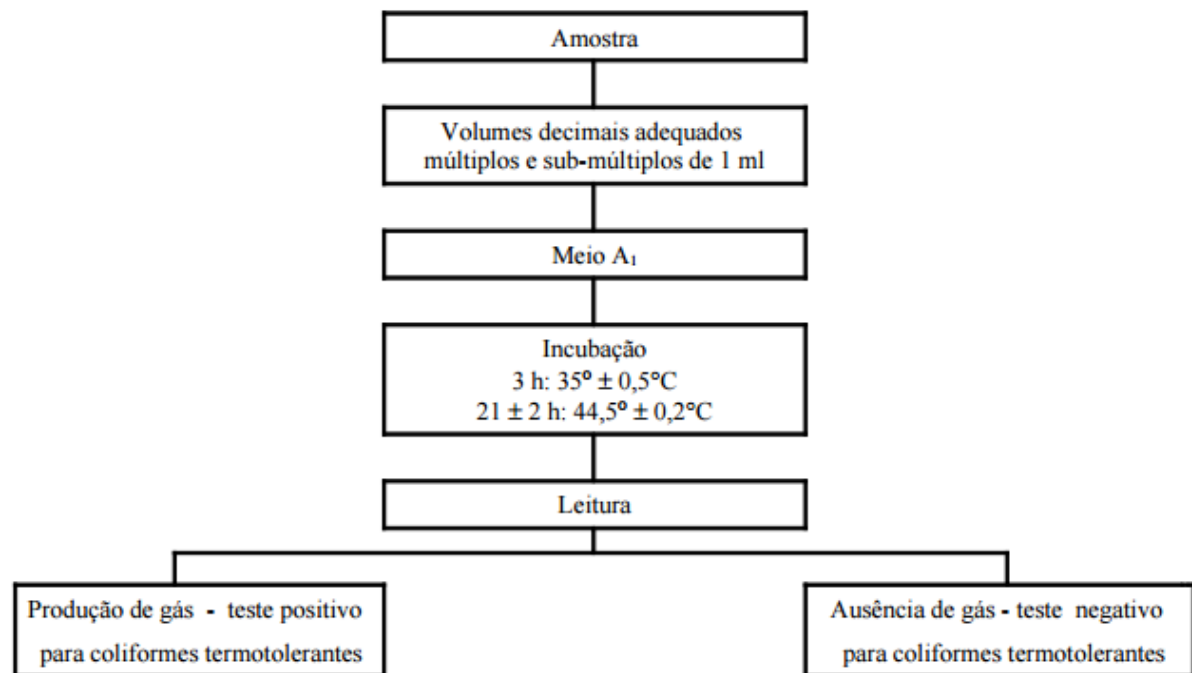


Figura 10. Esquema do procedimento para determinação de coliformes termotolerantes por meio da técnica de tubos múltiplos com o meio A1 (CETESB, 2007).

### 3.5 Análise de dados

Após obtidos os resultados analíticos parciais, foram ajustados modelos de regressão não-linear (SEBER; WILD, 2003) específicos para cada grupo de patógenos.

Para os coliformes termotolerantes foram tomados logaritmos neperianos para os valores de densidade, sendo ajustado o seguinte modelo:

$y = \ln(\text{densidade}) = \alpha e^{(-\beta \text{Tempo})} + u_i$ , em que  $u_i$  é o componente aleatório;  $\alpha$  e  $\beta$  são os parâmetros do modelo e responsáveis pelo decaimento da curva.

Para cada um dos demais patógenos, *Salmonella*, enterovírus e ovos viáveis de *Ascaris*, foi ajustado o seguinte modelo:

$y = \text{densidade} = \alpha e^{(-\beta \text{Tempo})} + u_i$ , em que  $u_i$  é o componente aleatório;  $\alpha$  e  $\beta$  são os parâmetros do modelo e responsáveis pelo decaimento da curva.

Após o ajuste dos modelos, foram obtidas as expressões para determinação do tempo médio para o qual o valor de  $y$  seja igual ao valor da densidade de

patógenos no solo, ou seja, para  $\hat{y} = y_{solo}$ . Assim, obteve-se os respectivos tempos, invertendo as equações estimadas considerando o valor  $\hat{y} = y_{solo}$ .

Finalmente, as expressões utilizadas para os grupos de patógenos, considerando-se o tempo necessário para a densidade de patógenos presentes no lodo atingir a densidade de patógenos encontrados inicialmente no solo, foram as seguintes:

a) Coliformes termotolerantes:

$$t_{\min} = (1/\beta) \ln (\alpha/y_{solo}) \quad (\text{Equação 2})$$

b) *Salmonella*, enterovírus e ovos viáveis de *Ascaris*:

$$t_{\min} = (1/\beta) (\alpha/y_{solo}) \quad (\text{Equação 3})$$

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Índice pluviométrico e temperatura e umidade do solo e dos lodos**

O índice pluviométrico, monitorado diariamente por pluviômetro, e as umidades dos lodos, monitoradas antes do início das análises por balança determinadora de umidade, estão representados na Figura 11. Já a temperatura e a umidade do solo, monitoradas de hora em hora por sensores instalados na superfície, a 0,10 m e a 0,20 m de profundidade, apresentaram as variações dispostas nas Figuras 12 e 13 no período de amostragem de 52 semanas.

Os cinco últimos meses de estudo (novembro/2014 a março/2015) foram os que apresentaram maior concentração pluviométrica, com elevados índices, sendo que a maior parte do período de estudo foi marcada por chuvas fracas ou moderadas e períodos de estiagem.

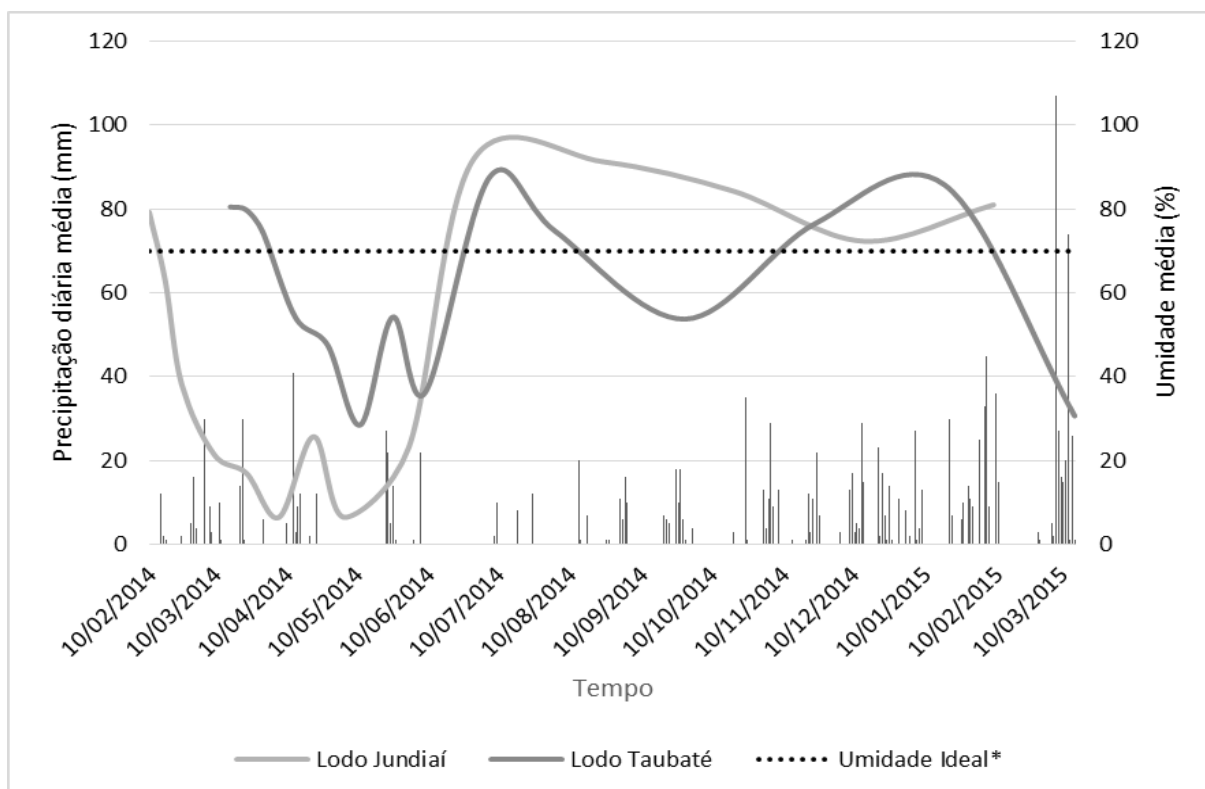


Figura 11. Precipitação diária média (mm) local na área experimental e umidade média do lodo proveniente de Jundiaí e do lodo proveniente de Taubaté durante 52 semanas após a instalação do experimento.

\*Umidade ideal do lodo para sobrevivência e reprodução de microrganismos, de acordo com Thomaz-Soccol et al. (2010).

Os lodos de esgoto monitorados no experimento apresentaram algumas particularidades em relação com os índices pluviométricos. Nos primeiros meses, onde houve pouca intensidade de chuvas, ambos os lodos apresentaram queda na umidade. Após o aumento dos índices pluviométricos é possível notar o aumento na umidade dos lodos, que se mantiveram úmidos até o final do período experimental. Porém, conforme é possível perceber em comparação com a Figura 12, os lodos absorvem e retêm a umidade em intensidade diferente do solo.

Do ponto de vista microbiológico, Thomaz-Soccol et al. (2010) afirmam que, por possuírem sensibilidade à dessecação, muitos microrganismos presentes no lodo de esgoto sanitário não sobrevivem por longos períodos em ambientes com baixa umidade, sendo a umidade ideal para a sobrevivência e reprodução destes organismos aquela que possui valores acima de 70%, índice este que foi utilizado como parâmetro na Figura 11 e na Figura 12.

Os valores de umidade observados nos lodos do experimento apresentaram-se, em muitos momentos, adequados ao valor considerado como ideal, o que

demonstra que, em termos de umidade, o lodo de esgoto pode ser considerado um ambiente ideal para os microrganismos patogênicos analisados.

A coleta e o armazenamento dos dados diários de umidade do solo e de temperatura do solo e dos lodos foram prejudicados em duas ocasiões. No período entre o final de abril e o início de agosto de 2014, o sensor instalado no saco contendo o lodo de esgoto de Jundiaí, por motivos não conhecidos, se soltou da entrada do armazenador de dados, o que fez com que os dados de temperatura e umidade referentes ao tratamento de Jundiaí não fossem armazenados no referido período. A segunda ocasião ocorreu entre os meses de outubro e novembro e depois, novamente, na segunda metade do mês de dezembro até o final do experimento, quando o *data logger* que armazenava os dados de todos os sensores de temperatura e umidade passou por problemas técnicos, não armazenando os dados corretamente e comprometendo a série de dados coletada.

Mesmo com os problemas ocorridos em relação à coleta de informações de temperatura e umidade do solo e dos lodos, optou-se por analisar, conforme as possibilidades, os dados disponíveis.

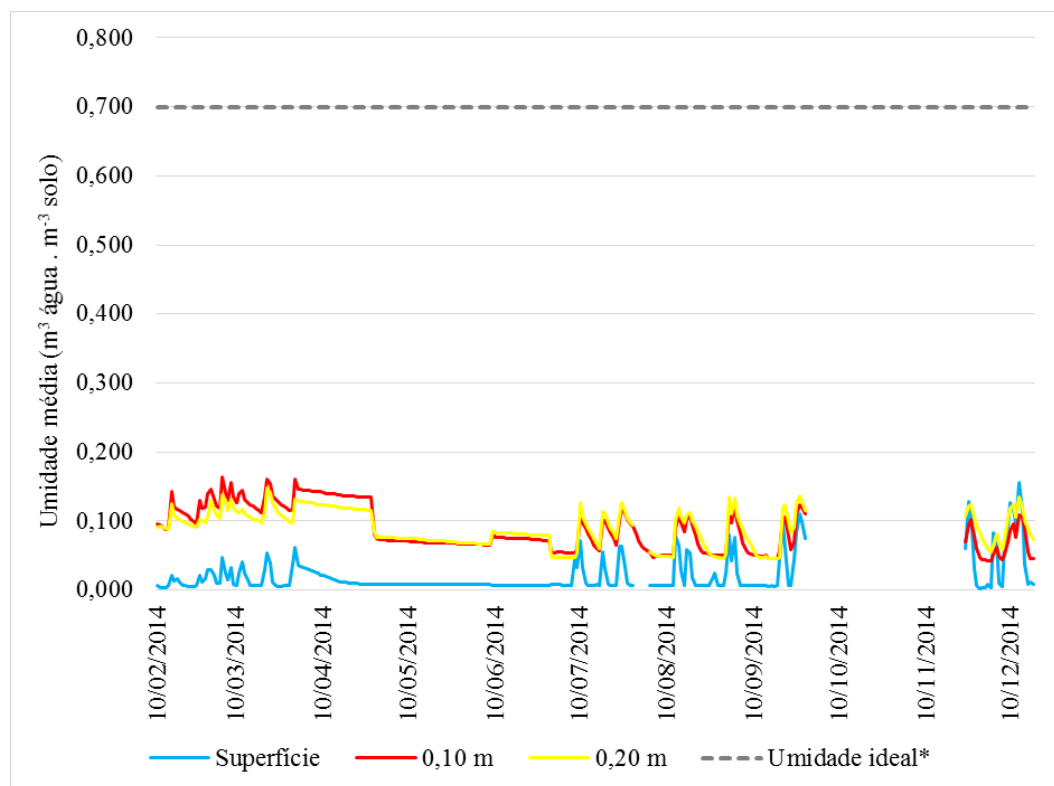


Figura 12. Umidade média ( $\text{m}^3 \text{ água} \cdot \text{m}^{-3} \text{ solo}$ ) diária na superfície, a 0,10 m e a 0,20 m de profundidade no solo durante 52 semanas após a instalação do experimento, com representação da umidade ideal (acima  $0,7 \text{ m}^3 \text{ água} \cdot \text{m}^{-3} \text{ solo/lodo}$  ou 70%) para a sobrevivência dos agentes patogênicos avaliados.

\* De acordo com Thomaz-Soccol et al. (2010).

Comparando-se os gráficos de precipitação e umidade, é possível notar que as curvas de umidade média diária estão diretamente relacionadas com os índices pluviométricos para o período, sendo que nos períodos com elevados índices pluviométricos nota-se maior uniformidade na umidade no solo, e nos períodos de escassez de chuva há maior variabilidade na umidade das diferentes profundidades do solo.

Os valores de umidade observados no solo quanto apresentaram-se bem inferiores em relação ao valor considerado como ideal, o que demonstra que o ambiente a que os agentes patogênicos analisados foram submetidos é extremamente hostil para os mesmos, em termos de umidade.

A temperatura média, conforme pode-se observar na Figura 13, mostrou maior irregularidade ao início do experimento, quando comparados os dois tipos de lodo e as diferentes profundidades do solo. Com o passar do tempo e com o aumento nos índices pluviométricos, nota-se que a temperatura se torna mais regular, com valores mantendo-se entre 15°C e 30°C em todos os sensores analisados.

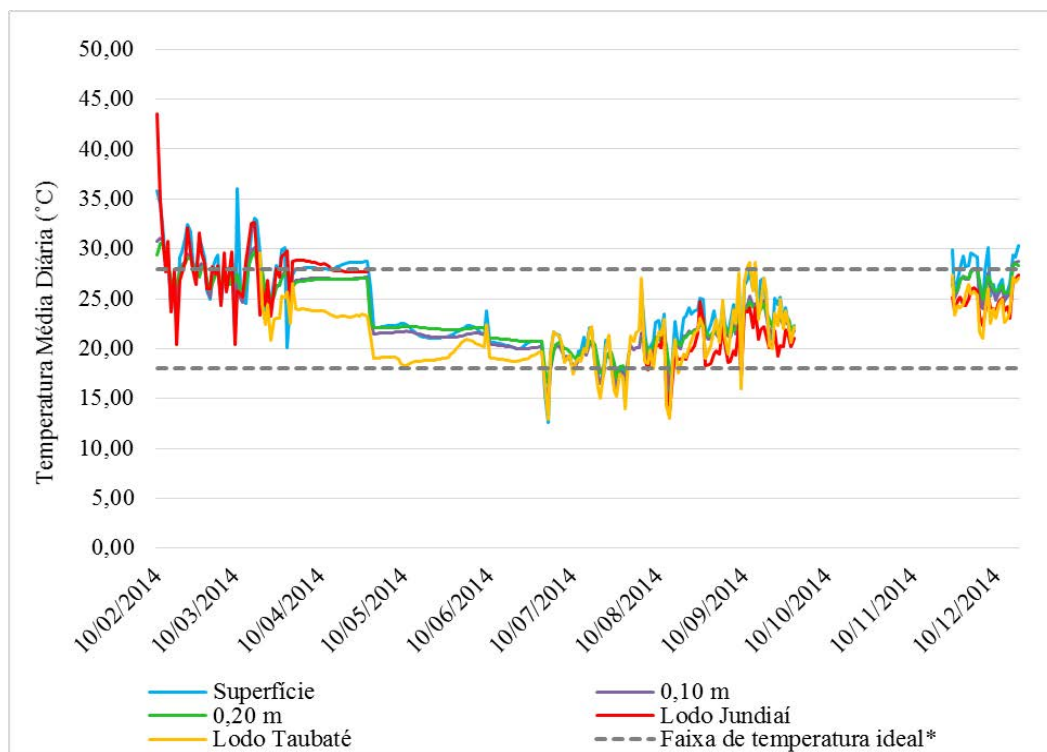


Figura 13. Temperatura média (°C) diária na superfície, a 0,10 m e a 0,20 m de profundidade no solo e na superfície do lodo de esgoto de Jundiaí e do lodo de esgoto de Taubaté durante 52 semanas após a instalação do experimento, com representação da faixa de temperatura ideal (entre 18°C e 28°C) para a sobrevivência dos agentes patogênicos avaliados.

\* De acordo com Thomaz-Soccol et al. (2010), com exceção de ovos de helmintos.

Dentre todos os fatores ambientais que interferem negativamente no desenvolvimento de organismos patogênicos presentes no lodo de esgoto sanitário, a temperatura é considerada um dos mais limitantes, uma vez que esta é determinante na reprodução microbológica e na dissecação de microrganismos (THOMAZ-SOCCOL et al., 2010).

Thomaz-Soccol et al. (2010) também afirmam que a temperatura ideal para a sobrevivência de grande parte dos microrganismos presentes no lodo varia entre 18°C e 28°C, temperaturas estas utilizadas como parâmetro na Figura 13. Os autores alertam ainda que estas temperaturas não se aplicam aos ovos de helmintos, já que estes apresentam maior resistência, sendo inviabilizados apenas quando expostos a temperaturas maiores de 65°C por mais de cinco minutos.

No início do experimento, nota-se que a faixa de temperatura foi maior do que a apresentada nos meses seguintes. Tal fato pode ser justificado pelo crescimento das plantas e conseqüente sombreamento do solo e das amostras ao longo do tempo. Sendo assim, ao final do experimento o sombreamento era muito maior ao do início, quando o solo estava totalmente exposto à incidência de luz solar, e, logo, as temperaturas eram mais amenas.

Por fim, pode-se dizer que, de maneira geral, as temperaturas observadas nos sensores instalados no solo e nos lodos mantiveram-se dentro da faixa estabelecida como ideal para a sobrevivência das bactérias analisadas (coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp), sendo então o ambiente considerado adequado para o desenvolvimento das mesmas, quanto à temperatura.

#### **4.2 Persistência dos agentes patogênicos**

Após a realização das análises microbológicas no lodo de esgoto proveniente de Jundiaí e no lodo de esgoto proveniente de Taubaté, foram estabelecidos ajustes de modelos de regressão não-linear (SEBER; WILD, 2003) específicos para cada grupo de patógenos em estudo e então estimado o tempo de sobrevivência de cada microrganismo após a aplicação do lodo no solo.

#### 4.2.1 Coliformes termotolerantes

O tempo médio estimado para a sobrevivência de coliformes termotolerantes após a aplicação do lodo foi de 54 semanas para o lodo de esgoto de Jundiaí, tratamento A (Figura 14), com intervalos de confiança  $\alpha$  (13,5339 – 16,1883) e  $\beta$  (0,0287 – 0,0463) e  $p < 0,0001$ , e 93 semanas para o lodo de esgoto de Taubaté, tratamento B (Figura 15), com intervalos de confiança  $\alpha$  (13,5998 – 16,0412) e  $\beta$  (0,0158 – 0,0275) e  $p < 0,0001$ .

Sendo assim, estima-se que após a aplicação no campo, sob as condições de temperatura e umidade analisadas, o nível de coliformes termotolerantes presentes no lodo levaria, em média, aproximadamente 54 semanas, ou 378 dias, para atingir o índice encontrado no solo previamente à aplicação, no tratamento A, e 93 semanas, ou 651 dias, no tratamento B.

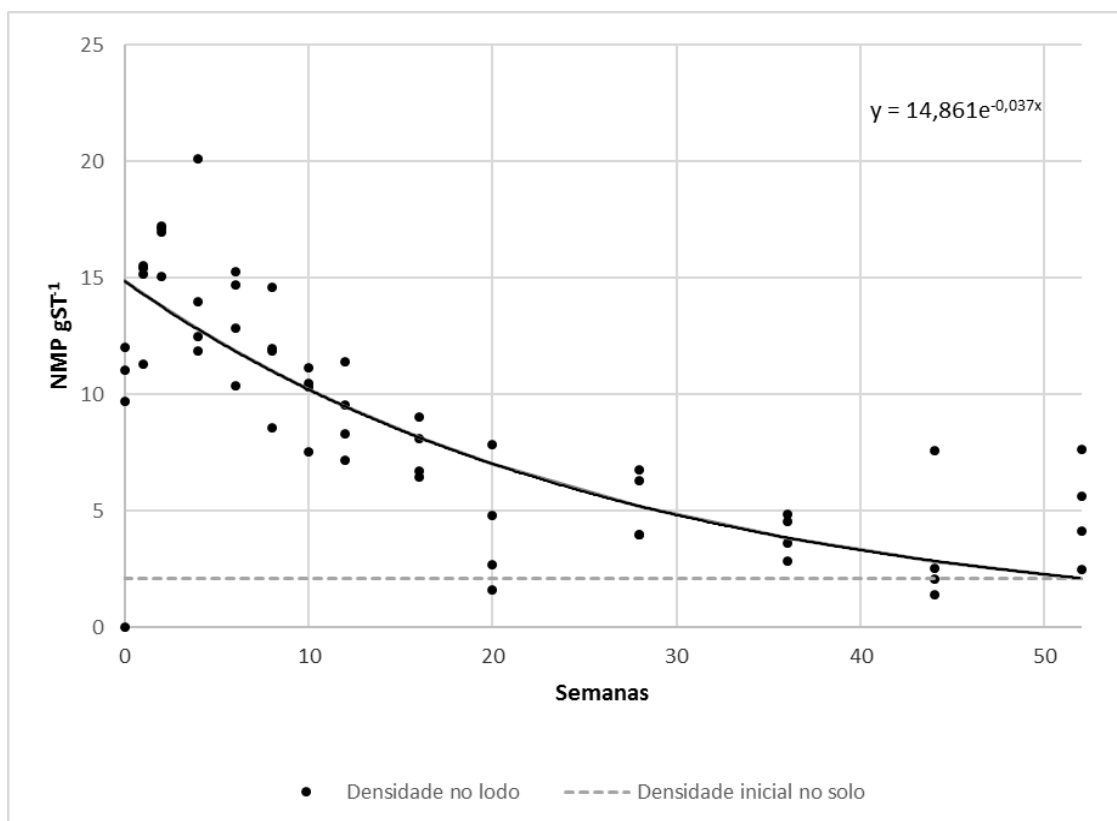


Figura 14. Curva de decaimento de coliformes termotolerantes (NMP gST<sup>-1</sup>) em função do tempo em 52 semanas de análise do lodo de esgoto de Jundiaí.

Tal diferença entre os dois lodos em relação ao tempo de sobrevivência já era esperada, uma vez que as análises iniciais (item 3.2, Tabela 3) mostraram que os índices de coliformes termotolerantes eram expressivamente maiores no tratamento B,

o que, conseqüentemente, demandaria mais tempo para que os níveis observados no solo fossem alcançados.

A literatura acerca do tempo de sobrevivência deste tipo de bactéria no solo é bastante escassa, principalmente para a realidade brasileira.

Kowal (1986) afirma que a sobrevivência de coliformes no solo varia muito de acordo com a espécie e com as condições ambientais e cita o período máximo de 77 dias para a sobrevivência destes microrganismos nos solos da América do Norte, tempo semelhante do definido por Estrada et al. (2004) para a sobrevivência de coliformes fecais, *E. coli* e enterobactérias em solo de área aberta na Espanha (80 dias) e por Ngole et al. (2006) para a sobrevivência de coliformes fecais em quatro diferentes solos de Botswana (90 dias).

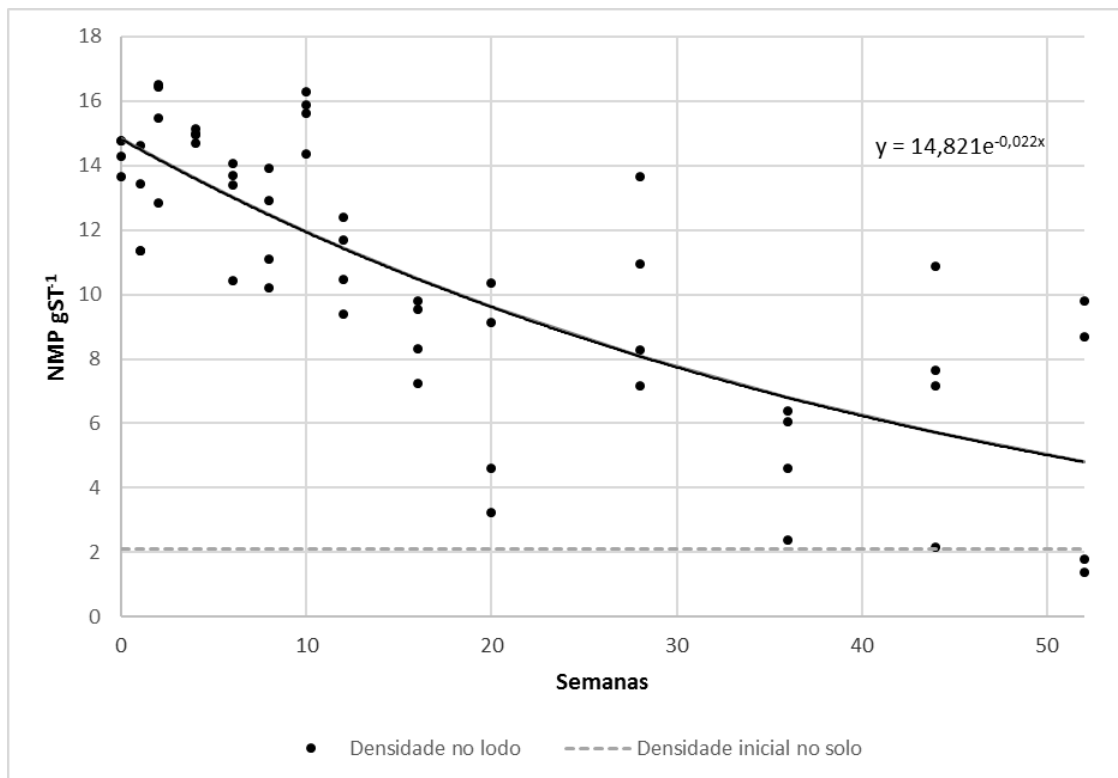


Figura 15. Curva de decaimento de coliformes termotolerantes (NMP gST<sup>-1</sup>) em função do tempo em 52 semanas de análise do lodo de esgoto de Taubaté.

Entretanto, Edmonds (1976) realizou estudo sobre a sobrevivência de coliformes fecais em lodo de esgoto aplicado em área florestal ao norte do Estado de Washington/EUA em diferentes estações do ano. O autor observou que no lodo aplicado durante o verão, os coliformes fecais atingiram o nível zero após 267 dias, enquanto no lodo aplicado durante o inverno, o tempo de sobrevivência abaixou para 162 dias, o que fez com que o autor concluísse que as taxas de mortalidade destes microrganismos estão diretamente

relacionadas com condições como temperatura, pH, composição física tanto do lodo quanto do solo e também competição microbiana.

Quando comparados aos estudos citados, os tempos de sobrevivência observados neste estudo são bastante superiores em ambos os tratamentos. Tal fato pode ser explicado pela temperatura do solo e do lodo, conforme observado na Figura 13 do item 4.1, ter se apresentado, na maior parte do tempo, ideal para o crescimento e a reprodução de bactérias, conforme mencionado por Thomaz-Soccol et al. (2010).

Cools et al. (2001), afirmam que em seu estudo sobre a sobrevivência de *E. coli* em solos de diferentes texturas, o solo arenoso foi o que se apresentou mais propício para a sobrevivência destes microrganismos. Sendo assim, conforme se constata pela análise física disposta na Tabela 5, a textura arenosa do solo do presente estudo pode ter sido um fator importante para o tempo de sobrevivência dos microrganismos em questão.

Enfim, pode-se dizer que após a aplicação dos lodos de esgoto no solo, as condições ambientais, como temperatura e textura do solo, foram favoráveis para a sobrevivência de coliformes termotolerantes, que apresentaram resistência consideravelmente maior que as citadas em estudos realizados, até então, em condições de clima mais frio.

#### **4.2.2 Enterovírus**

A princípio, a coleta e as análises de amostras de lodo para determinação de enterovírus presentes no material foram realizadas semanalmente, frequência esta que ficou comprovada, através dos resultados obtidos, não ser suficiente para este patógeno, sendo que não foi possível ajustar um modelo em nenhum dos tratamentos para a determinação do tempo médio de sobrevivência de enterovírus após a aplicação do lodo, uma vez que os resultados encontrados nas análises tanto do lodo quanto do solo foram negativos para enterovírus.

Sendo assim, admite-se que estudos futuros abrangendo um intervalo de tempo menor (dias ou horas) são necessários para se determinar com precisão o tempo de sobrevivência de enterovírus após a aplicação do lodo de esgoto no solo, sob as condições ambientais estudadas.

O parágrafo 5º do artigo 7º da Resolução CONAMA 375/2006 determina que para a caracterização do lodo de esgoto, a presença de agentes patogênicos, dentre eles vírus entéricos, deve ser analisada e determinada. No caso deste estudo, não foi detectada a presença de enterovírus já desde a aplicação do lodo no solo. Este fato levanta o

questionamento acerca da real necessidade de abordagem deste grupo de microrganismos pela referida resolução, uma vez que ausentes não apresentam risco algum à saúde pública.

Pepper et al. (2006) afirmam que dentre todos os microrganismos presentes no lodo de esgoto, os enterovírus são os menores e menos complexos, sendo, assim, mais sensíveis, tendo geralmente um curto tempo de sobrevivência.

Bagdasaryan (1964 *apud* KOWAL, 1985), em seu estudo sobre a relação da textura, da temperatura e da umidade do solo na sobrevivência de enterovírus, estimou que este grupo de microrganismos, em solos arenosos ou argilosos podzólicos, sobrevive de 70 a 170 dias com umidade entre 10 e 20% e temperatura entre 3 e 10 °C; de 25 a 110 dias com umidade entre 10 e 20% e temperatura entre 18 e 23 °C; e de 15 a 25 dias em solos secos, com temperatura entre 18 e 23 °C.

De acordo com Sorber e Moore (1987), vírus podem ser detectados em biossólidos aplicados em solos dentro de quatro a até 100 dias após o início da aplicação em áreas da América do Norte. Já Straub et al. (1993a e 1993b) afirmam que, dependendo do tipo de exposição a que são submetidos, enterovírus sobrevivem apenas entre três a 10 dias no solo.

Kowal (1985) afirma que a exposição à radiação solar, a altas temperaturas e à dessecação, reduz drasticamente o tempo de sobrevivência destes microrganismos quando dispostos no solo, informações também confirmadas por Straub et al. (1993a e 1993b) ao constatarem que os enterovírus são dependentes da temperatura, diminuindo conforme esta aumenta, além de sofrerem drásticas limitações quando expostos a rápidas quedas na umidade do solo.

Em estudo realizado por Goyal et al. (1984), que analisou o tempo de sobrevivência de vírus patogênicos a humanos em lodo de esgoto disposto em diferentes áreas do Oceano Atlântico, os autores puderam concluir que na água este grupo de patógenos pode sobreviver a até 3 anos. Sendo assim, reforça-se que quanto menos úmido o ambiente, menor o tempo de sobrevivência destes microrganismos, que são extremamente sensíveis à dessecação.

Os resultados negativos para a presença de enterovírus nos dois lodos analisados neste estudo mostram que o tempo de sobrevivência destes microrganismos sob as condições climáticas analisadas foi de zero dias. Isto reafirma a sensibilidade deste grupo de patógenos a fatores ambientais considerados hostis para os mesmos, tais como elevadas temperaturas e baixa umidade.

### 4.2.3 *Salmonella* spp

Os resultados analíticos para *Salmonella* spp mostram-se atípicos para a espécie, uma vez que a contagem do número mais provável por grama de sólidos totais (NMP gST<sup>-1</sup>) não apresentou curvas de decaimento em nenhum dos lodos, mas sim, picos de acréscimo e decréscimo na contagem ao longo do tempo, como é possível observar nas Figuras 16 e 17. Sendo assim, não foi possível ajustar um modelo para este patógeno em nenhum dos tratamentos.

Tal comportamento já foi observado anteriormente em estudo similar realizado por empresas parceiras deste projeto em plantio de cana-de-açúcar fertilizado também com lodo de esgoto sanitário no município de Piracicaba-SP<sup>1</sup>.

Além disso, o lodo proveniente de Jundiaí (Tratamento A) apresentou valores extremamente altos a partir da segunda coleta, representando um significativo incremento na população de *Salmonella* spp sem motivo aparente.

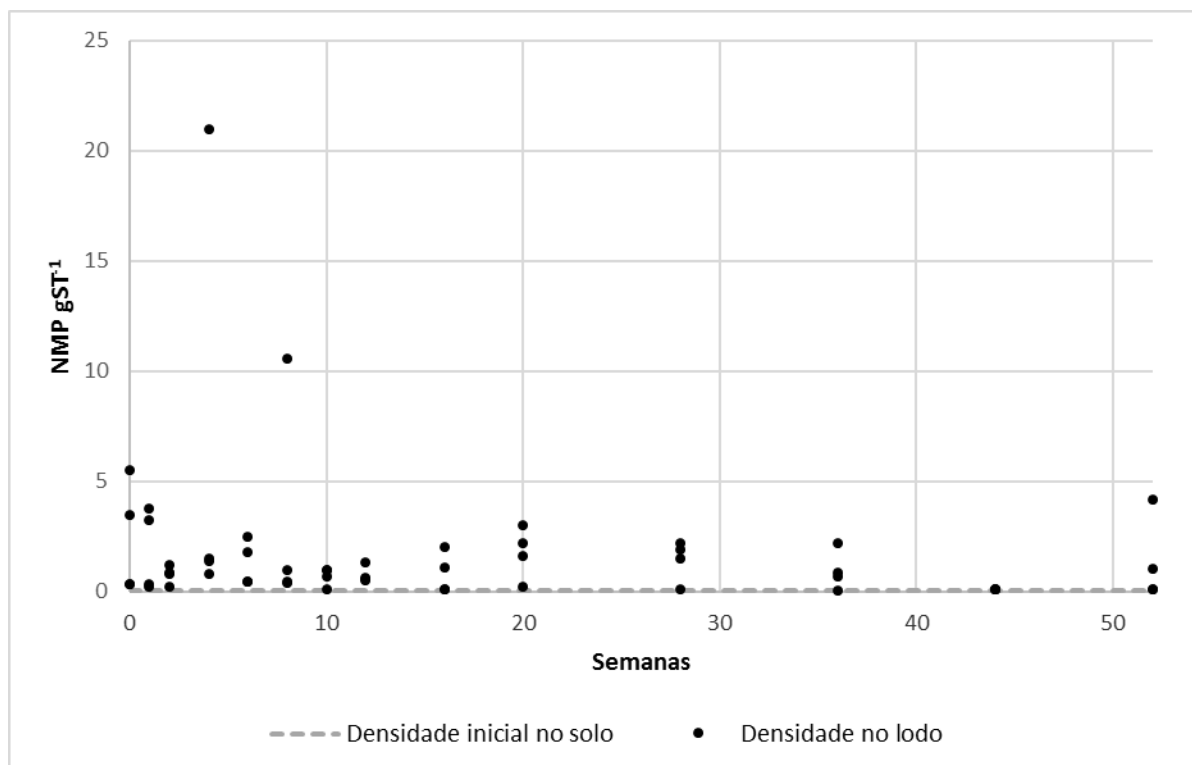


Figura 16. Curva de decaimento de *Salmonella* spp (NMP gST<sup>-1</sup>) em função do tempo em 52 semanas de análise do lodo de esgoto de Jundiaí.

<sup>1</sup>Comunicação pessoal: Fernando C. Oliveira, Maria Inês Z. Sato e Elayse M. Hachich (novembro de 2013).

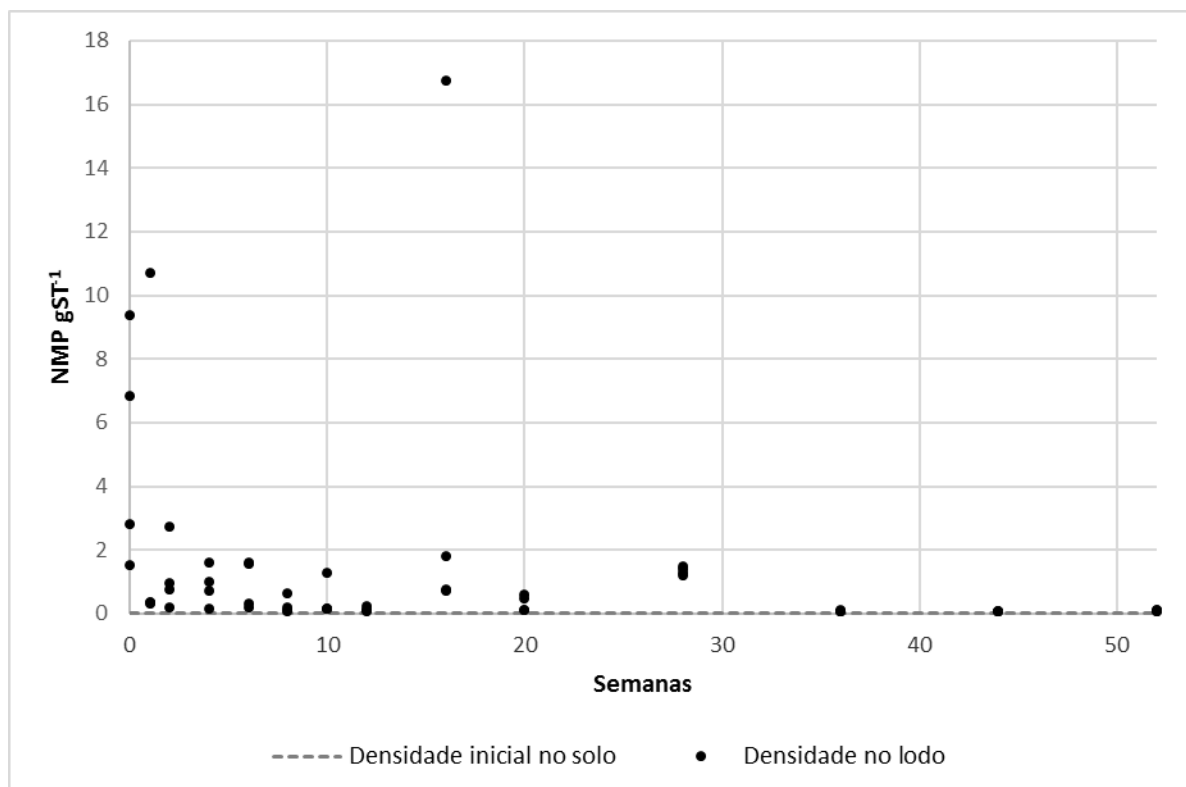


Figura 17. Curva de decaimento de *Salmonella* spp (NMP gST<sup>-1</sup>) em função do tempo em 52 semanas de análise do lodo de esgoto de Taubaté.

Dentre as possíveis razões para os picos de aumento populacional de *Salmonella* spp nas amostras analisadas está a possibilidade de contaminação externa proveniente de fezes de animais silvestres, especificamente porcos selvagens ou gado, uma vez que estas já foram observadas diversas vezes na área experimental. Porém, esta hipótese só pode ser comprovada com a realização de análises de sorotipagem da espécie para que se determine se o hospedeiro é animal, o que confirmaria a contaminação, ou humano. Devido ao estudo citado anteriormente já ter constatado tal comportamento, cepas foram separadas e incubadas desde o início do experimento para futura verificação através de exame de sorotipagem.

Por outro lado, caso a hipótese de contaminação por fezes de porcos selvagens ou gado fosse verdadeira a ponto de aumentar significativamente a população de *Salmonella*, o mesmo ocorreria com a população de coliformes termotolerantes e com o número de ovos viáveis de helmintos, uma vez que estes também estão contidos nas fezes deste tipo de animais.

Outra possível hipótese seria a mudança de comportamento do gênero quando exposto aos fatores ambientais impostos pela aplicação no solo, o que necessitaria maiores estudos em ambientes controlados, como estufas ou casas de vegetação, para melhor

esclarecimento da relação entre a *Salmonella* spp e fatores ambientais como temperatura, umidade e radiação solar.

Zaleski et al. (2005b), Sidhu et al. (2001), Hussong et al. (1985) e Yeager e Ward (1981) afirmam ser possível o recrescimento de *Salmonella* no solo e em compostos bio sólidos.

Thomaz-Soccol et al. (2010) afirmam que o tempo de sobrevivência da *Salmonella* no solo pode variar de menos de uma semana a até seis meses, dependendo das condições de umidade e temperatura a que este microrganismo está exposto.

Edmonds (2000) reforça a influência das condições ambientais e das características de cada espécie no tempo de sobrevivência do gênero e menciona que espécimes de *Salmonella typhi* podem sobreviver no solo por mais de 280 dias. Já Kowal (1985) cita um tempo de sobrevivência entre 11 e 280 dias para *Salmonella* spp e Zaleski et al. (2005a) um tempo entre duas e três semanas em lodo incorporado no solo.

Como não foi possível ajustar uma curva de decaimento para *Salmonella* em nenhum dos tratamentos, também não foi possível determinar ou estimar o tempo de persistência da mesma nos lodos aplicados no solo para as condições ambientais deste estudo. Até o fim do período de coleta de dados, observou-se um ciclo de crescimento e decréscimo da população deste microrganismo em ambos os tratamentos.

Sendo assim, admite-se a necessidade de estudos futuros realizados em ambientes controlados, isolados de potenciais fontes de contaminação, para que se possa esclarecer as causas deste tipo de comportamento da *Salmonella* spp no lodo de esgoto.

#### **4.2.4 Ovos viáveis de *Ascaris* spp**

O tempo médio estimado para o limiar de ovos viáveis de *Ascaris* spp foi de 8,5 semanas para o lodo de esgoto proveniente de Taubaté, tratamento B (Figura 18), com intervalos de confiança  $\alpha$  (3,2626 – 5,8289) e  $\beta$  (0,1779 – 0,7205) e  $p < 0,0001$ , não sendo possível ajustar o modelo para o lodo proveniente de Jundiaí (tratamento A).

Sendo assim, estima-se que após a aplicação no campo, sob as condições de temperatura e umidade analisadas, o nível de ovos viáveis de *Ascaris* spp presentes no lodo levou, em média, 8,5 semanas para atingir o índice encontrado no solo previamente à aplicação, no tratamento B.



das duas regiões estudadas reflete-se claramente nos resultados obtidos, sendo a região mais quente, mais hostil para os ovos de helmintos.

O estudo realizado por Souza et al. (2008) foi discutido na criação da metodologia do experimento objeto deste trabalho, uma vez que os resultados obtidos no citado estudo, antes mesmo de sua publicação, foram contestados na época de discussão e elaboração da Resolução CONAMA 375/2006 pelo fato de o lodo de esgoto utilizado ter sido incorporado no solo, o que, supostamente, diminuiria a densidade de ovos de *Ascaris* por grama de sólidos totais. Tendo conhecimento destas críticas, a equipe idealizadora do presente estudo optou por acondicionar o lodo em sacos de tecido vazado tipo “tule”, para que a amostra fosse analisada da maneira mais integral possível, obtendo-se maior concentração de ovos de *Ascaris*, e, ao mesmo tempo, para que a amostra pudesse interagir com o solo e as condições ambientais impostas.

A região do município de Avaré, onde foi instalado o experimento, possui clima subtropical (Cfa) e temperatura média de 19,8 °C (BRASIL, 2015), o que coloca este estudo entre as duas situações estudadas por Thomaz-Soccol et al. (1999) e Souza (2008) e, sendo assim, o resultado obtido de 8,5 semanas para a persistência da viabilidade de ovos de *Ascaris* em lodo de esgoto aplicado na superfície solo, sem incorporação, estaria condizente com os resultados obtidos nos demais estudos realizados no Brasil.

Em estudos realizados no exterior, Munger (1983 *apud* EDMONDS, 2000) afirmou ser possível, em casos extremos, encontrar ovos viáveis de *Ascaris* após 15 anos, em determinados solos, sob condições específicas. Já Kowal (1985) afirma que, sob condições favoráveis de umidade, temperatura e radiação solar, a viabilidade de ovos de helmintos pode perdurar de seis meses a vários anos. Weischer e Brown (2001) afirmam que podem ser necessários cinco anos para que ovos de *Ascaris* se tornem inviáveis. Carrington (2001) cita o período de 15 meses para a inviabilização de ovos de *Ascaris* em áreas com cobertura vegetativa e temperatura abaixo de 10 °C. Little et al. (1991), em seu estudo com lodo de esgoto aplicado nos estados de Ohio, Louisiana e Texas, nos Estados Unidos afirmaram que a viabilidade dos ovos dura cerca de 3 anos sob as condições analisadas.

Smith et al. (1999) afirmam que, em regiões de clima temperado, após sete anos é possível encontrar no solo resquícios de ovos de *Ascaris* ainda viáveis. Os autores vão além e dizem que a temperatura é o fator ambiental que mais afeta a viabilidade dos ovos destes organismos, que podem manter-se viáveis por até 43 anos quando incubados a – 23 °C e ainda continuarem se desenvolvendo após este período se impostas a temperaturas mais elevadas. Na vegetação tundra no Ártico, afirmam ser possível que a persistência dos ovos

ultrapasse 100 anos. Por outro lado, quando expostos a temperatura acima de 37 °C, mesmo que por curtos períodos de tempo, os embriões em desenvolvimento começam a morrer, tornando os ovos inviáveis.

De acordo com Pepper et al. (2006), quando o lodo não é incorporado no solo, o tempo de viabilidade de ovos de *Ascaris spp* reduz drasticamente, sendo que no intervalo de três a dez meses após a aplicação no solo, 90% dos ovos já estariam inviabilizados. Mizgajska (1994) afirma que, não importando o tipo de solo, os ovos se mantêm nos primeiros 10cm de profundidade e em diferentes amostras coletadas em seu estudo o tempo máximo de viabilidade dos ovos foi de 17 meses.

De qualquer forma, a variabilidade de tempo apresentada em diferentes trabalhos reforça que a afirmativa de que este grupo de patógenos é inegavelmente influenciado por condições externas. Sendo assim, o resultado obtido neste estudo e as informações apresentadas pelos demais trabalhos, tanto no Brasil quanto no exterior, revelam a importância e a interferência das condições climáticas, principalmente a temperatura, na viabilidade de ovos de helmintos.

Ainda, considerando-se a pouca informação encontrada na literatura brasileira acerca da resistência deste tipo de patógeno, comumente presente no lodo de esgoto e no solo fertilizado com este, reforça-se a necessidade da realização de maiores estudos em diferentes regiões do país, a modo de se esclarecer as dúvidas e os questionamentos quanto à segurança do uso agrícola do lodo de esgoto em termos de saúde pública.

## 5. CONCLUSÕES

Estima-se um tempo médio de 54 semanas para a sobrevivência de coliformes termotolerantes no lodo de esgoto proveniente de Jundiaí e de 93 semanas no lodo de esgoto de Taubaté.

Para enterovírus não foi possível ajustar um modelo em nenhum dos tratamentos, pois os resultados deram negativos logo nas primeiras análises. Tal fato coloca em dúvida a necessidade da realização da análise destes microrganismos em lodo de esgoto.

Os resultados analíticos para *Salmonella* spp mostram-se atípicos para a espécie uma vez que não apresentaram, em nenhum dos lodos, curvas de decaimento, mas sim picos de acréscimo e decréscimo na contagem ao longo do tempo. Sendo assim, não foi possível ajustar um modelo para este patógeno em nenhum dos tratamentos.

O tempo médio estimado para a persistência da viabilidade de ovos de *Ascaris* spp foi de 8,5 semanas para o lodo de esgoto proveniente de Taubaté, não sendo possível ajustar o modelo para o lodo proveniente de Jundiaí, uma vez que, durante todo o experimento, este apresentou valores similares ao encontrado no solo antes da aplicação do lodo, não caracterizando, assim, contaminação ou riscos à saúde pública.

Os resultados obtidos para todos os grupos de patógenos analisados reafirmam a necessidade da realização de estudos abrangendo as realidades climáticas das

diversas regiões do Brasil, uma vez que o clima se mostrou um fator determinante na persistência de organismos patogênicos no solo com o uso agrícola do lodo de esgoto sanitário.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, C. A. de; BOEIRA, R. C. ; PIRES, A. M. M. Nitrogênio presente em lodo de esgoto e a Resolução CONAMA 375/2006. In: COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. **Uso agrícola do lodo de esgoto: avaliação após a Resolução nº 375 do CONAMA**. Botucatu: FEPAF, 2010. p. 157-169.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. APHA, AWWA, WPCF, 21 st ed. Washington, DC, 2005.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Section 9221. Multiple tube fermentation technique for members of the coliform group. APHA, AWWA, WEF, 22 st ed., Washington DC, 2012.

AUGUSTO, D. C. C. et al. Utilização de águas residuárias provenientes do tratamento biológico de esgotos domésticos na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill. Ex. Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, Mg, v. 31, n. 4, p. 745-751, 2007.

BARREIROS, R. M. et al. Modificações na produtividade e nas características físicas e químicas da madeira de *Eucalyptus grandis* causadas pela adubação com lodo de esgoto tratado. **Revista Árvore**, Viçosa, Mg, v. 31, n. 1, p.103-111, 2007.

BERTON, R. S.; NOGUEIRA, T. A. R. Uso do lodo de esgoto na agricultura. In: COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R. (Org.). **Uso agrícola de lodo de esgoto: avaliação após a Resolução nº 375 do CONAMA**. 21. ed. Botucatu: FEPAF, 2010. Cap. 2. p. 31-50.

BETTIOL, W. et al. Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto: Descrição do estudo. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. de. **Lodo de esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. p. 17-24.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. de. A disposição do lodo de esgoto em solo agrícola. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. de. **Lodo de esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. p. 25-36.

BETTIOL, W.; SANTOS, I. dos. Efeito do lodo de esgoto sobre fitopatógenos veiculados pelo solo: Estudos de casos. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. de. **Lodo de esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. p. 315-347.

BIGHAM, J. M. **Methods of Soils Analysis**. Part 3. Chemical Methods. Madison, WI. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy. Book Series nº 5, 1996.

BOEIRA, R. C.; MAXIMILIANO, V. C. B. Dinâmica da mineralização de nitrogênio de lodos de esgoto. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. de. **Lodo de esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. p. 25-36.

BRASIL. Instituto Nacional de Meteorologia – INMET. Normais climatológicas do Brasil 1961 - 1990. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Brasília, DF. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/normaisClimatologicas>. Acesso em 12 de mai. 2015.

BRASIL. 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. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n.167, p. 141-146, 30 ago. 2006. Seção 1.

BRENNAN, F. P. et al. Clay mineral type effect on bacterial enteropathogen survival in soil. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 468-469, p.302-305, jan. 2014. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.037. Disponível em:

<<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0048969713009510?httpAccept=text/xml>>.

Acesso em: 10 jun. 2015.

CAMARGO, O. A. de; BETTIOL, W. De resíduo a fertilizante: Uma análise prospectiva do meio ambiente. In: COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. (Org.). **Uso agrícola de lodo de esgoto: Avaliação após a Resolução nº 375 do CONAMA**. 21. ed. Botucatu: FEPAF, 2010. Cap. 1. p. 13-30.

CARRINGTON, E. G. **Evaluation of sludge treatments for pathogen reduction**: Final report. Luxembourg: European Commission Directorate-general Environment, 2001.

Disponível em: [http://ec.europa.eu/environment/archives/waste/sludge/pdf/sludge\\_eval.pdf](http://ec.europa.eu/environment/archives/waste/sludge/pdf/sludge_eval.pdf).

Acesso em: 05 ago. 2013.

CETESB – COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **L5.551**: Ovos viáveis de *Ascaris* spp – Determinação pela técnica de centrífugo-flutuação em amostras de lodo de esgoto. São Paulo: Cetesb, 2013. 15 p. Disponível em:

<<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/servicos/normas/vigentes/>. Acesso em: 12 mai. 2015.

CETESB – COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **L5.406**:

Coliformes termotolerantes: Determinação em amostras ambientais pela técnica de tubos múltiplos com meio A1 - método de ensaio. São Paulo: Cetesb, 2007. 16 p. Disponível em:

<<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/servicos/normas/vigentes/>. Acesso em: 12 maio 2015.

COOLS, D. et al. Survival of *E. coli* and *Enterococcus* spp. derived from pig slurry in soils of different texture. **Applied Soil Ecology**, v. 17, p.53-62, jan. 2001.

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. Elementos requeridos à nutrição de plantas. In: NOVAIS, R. F. et al. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, 2007. Cap. III. p. 91-132.

EDMONDS, R. L. Microbial aspects of residuals use in forest ecosystems. In: HENRY, C. L.; HARRISON, R. B.; BASTIAN, R. K. **The forest alternative**: Principles and practice of residuals use. Seattle: University of Washington, 2000. p. 39-44.

EDMONDS, R. L. Survival of Coliform Bacteria in Sewage Sludge Applied to a Forest Clearcut and Potential Movement into Groundwater. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 32, n. 4, p.537-546, out. 1976.

ESTRADA, I. B. et al. The survival of Escherichia coli, faecal coliforms, and enterobacteriaceae in general in soil treated with sludge from wastewater treatment plants. **Bioresource Technology**, v. 93, p.191-198, 2004.

GONÇALVES, J.L.M.; RAIJ, B. van.; GONÇALVES, J.C. Florestais. In: RAIJ, B.van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Eds). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. Ed. rev. Campinas: IAC. 1997. p.247-259. (Boletim Técnico, 100).

GOYAL, S. M. et al. Human Pathogenic Viruses at Sewage Sludge Disposal Sites in the Middle Atlantic Region. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington Dc, v. 48, n. 4, p.758-763, out. 1984.

GUEDES, M. C. et al. Propriedades químicas do solo e nutrição do eucalipto em função da aplicação de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** [online]. Vol.30, n.2, pp. 267-280, 2006.

HARRISON, R. B. et al. **Reciclagem de resíduos industriais e urbanos em áreas de reflorestamento**. Piracicaba: IPEF, 2003. n.198, 20 p. Circular Técnica.

HENRY, C. L.; COLE, D.W.; HARRISON, R. B. Use of municipal sludge to restore and improve site productivity in forestry: the Pack Forest Sludge Research Program. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.66, p.137-149, 1994.

HESPANHOL, I. Potencial de reuso de água no Brasil: agricultura, indústria, municípios, recarga de aquíferos. In: MANCUSO, P.C.S.; SANTOS, H. F. dos (Ed.). **Reúso de água**. Barueri: Manole, 2003. p. 37-95.

HUSSONG, D.; BURGE, W. D.; ENKIRI, N. K.. Occurrence, Growth, and Suppression of Salmonellae in Composted Sewage Sludge. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 50, n. 4, p.887-893, out. 1985.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS - IAC (Campinas). **Informação sobre interpretação de análise de solo.** Disponível em:

<<http://www.iac.sp.gov.br/produtoseservicos/analisedosolo/interpretacaoanalise.php>>. Acesso em: 08 maio 2015.

KELLEY, W. D. et al. **Agricultural use of sewage sludge.** Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute And State University, 1984. 50 p.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde Gotha:** Verlag Justus Perthes. Wall-map 150cmx200cm, 1928.

KOWAL, N. E. Health considerations in applying minimum treated wastewater to land. In: BROWN, K. W. **Utilization, treatment, and disposal of waste on land.** Madison: Soil Science Society of America, 1986. p. 27-51.

LEWIS, D. L.; GATTIE, D. K. Pathogen risks from applying sewage sludge to land: Despite complaints of related illnesses, little is known about the dangers of spreading biosolids on land. **Environmental Science & Technology**, [S. I.], p.287-293, jul. 2002.

LITTLE, D.A.; RENEAU, R.B.; MARTENS, D.C. Lime-stabilized and chemically-fixed sewage sludges as lime amendments. **Bioresource Technology**, v. 37, n. 1, p.93-102, jan. 1991. Elsevier BV. DOI: 10.1016/0960-8524(91)90116-2.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O. Potencial do lodo de esgoto como fonte de nutrientes para plantas. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p. 143-152.

MIZGAJSKA, H.. The distribution and survival of eggs of *Ascaris suum* in six different natural soil profiles. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v. 38, n. 4, p.170-174, 1994.

NAP - THE NATIONAL ACADEMIES PRESS. **Biossolids applied to land:** Advancing Standards and Practices. National Research Council, Washington DC. 2002.

NGOLE, V.; MPUCHANE, S.; TOTOLO, O. Survival of faecal coliforms in four different types of sludge-amended soils in Botswana. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p.208-218, abr. 2006.

NOVAIS, R. F. et al (Ed.). **Fertilidade do solo.** Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007a. 1017 p.

NOVAIS, R. F. et al. Fósforo. In: NOVAIS, R. F. et al. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007b. Cap. VIII. p. 471-550.

PEPPER, I. L.; BROOKS, J. P.; GERBA, C. P. Pathogens in Biosolids. **Advances In Agronomy**, v. 90, p.1-41, 2006. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0065-2113(06)90001-7.

PEPPER, I. L. et al. Survival of indicator organisms in Sonoran desert soil amended with sewage sludge. **Journal of Environmental Science and Health**, Part A, v. 28., p. 1287-1302, 1993.

POLGLASE, P. J.; MYERS, B. J. Tree plantation for recycling effluent and biosolids in Australia. In: ELDRIDGE, K. G.; CROWE, M. P.; OLD, K. M. (Eds.) Environmental management: The role of Eucalypts and other fast growing species. **Proceedings of the Joint Australian- Japanese Workshop**. Canberra, CSIRO, 1995.p.100-109.

POLGLASE, P. J.; TUNNINGLEY, W. M. (Eds.) Land application of wastes in Australia and New Zealand: Research and practice. In: LAND TREATMENT COLLECTIVE – AUSTRALIAN CONFERENCE, 14, 2006, Canberra. **Proceedings..** Canberra, CSIRO, 1996.

PHILIPPI JR, A. Reúso de água: uma tendência que se firma. In: MANCUSO, P.C.S.; SANTOS, H. F. dos (Ed.). **Reúso de água**. Barueri: Manole, 2003. p. XIII-XVII.

ROCHA, G. N.; GONÇALVES, J. L. M.; MOURA, I. M. Mudanças da fertilidade do solo e crescimento de um povoamento de *Eucayptus grandis*, fertilizado com biossólido. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.28, n. 4, p. 623-639, 2004.

SANEPAR - COMPANHIA DE SANEAMENTO DO PARANÁ (Paraná). **Manual Técnico para utilização agrícola do lodo de esgoto no Paraná**. Curitiba: Sanepar, 1997. 96 p.

SEBER, G.A.F.; WILD, C.J. **Nonlinear regression**. New York: John Wiley & Sons, 2003. 768p.

SIDHU, J. et al. The role of indigenous microorganisms in suppression of Salmonella regrowth in composted biosolids. **Water Resource**, v. 35, n. 4, p.913-920, 2001.

SILVA, P. H. M. da et al. Volume de madeira e concentração foliar de nutrientes em parcelas experimentais de *Eucalyptus grandis* fertilizadas com lodos de esgoto úmido e seco. **Revista Árvore**, Viçosa, Mg, v. 32, n. 5, p.845-854, 2008.

SMITH, H. V.; GRIMASON, T. M.; HOLLAND, C. *Ascaris lumbricoides*. In: AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (Denver). **Waterborne Pathogens**. 1999. Cap. 24. p. 171-180.

SORBER, C. A.; MOORE, B. E. **Survival and transport of pathogens in sludge-amended soil: A critical literature review**. Washington DC: NTIS, 1987.

SOUZA, C. A. et al. Sobrevivência de ovos de helmintos na reciclagem agrícola do lodo de esgoto no Distrito Federal. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANA TROPICAL, 2., 2008, **Anais...**

STRAUB, T. M.; PEPPER I. L.; GERBA C. P. Virus survival in sewage sludge amended desert soil. **Water Science and Technology**, v. 27, p. 39-51, 1993a.

STRAUB, T. M.; PEPPER I. L.; GERBA C. P. Hazards from pathogenic microorganisms in land-disposed sewage sludge. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 132, p. 55-91, 1993b.

TABACZENSKI, R. R. Visão geral da Resolução CONAMA 375/2006. In: COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. **Uso agrícola do lodo de esgoto: avaliação após a Resolução nº 375 do CONAMA**. Botucatu: FEPAF, 2010. p. 51-70.

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Organismos patogênicos presentes em lodo de esgoto a ser aplicado no solo e a Resolução nº 375 do CONAMA. In: COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. **Uso agrícola do lodo de esgoto: avaliação após a Resolução nº 375 do CONAMA**. Botucatu: FEPAF, 2010. p. 83-111.

THOMAZ-SOCCOL, V.; PAULINO, R. C.; CASTRO, E. A. Aspectos sanitários: agentes patogênicos: helmintos e protozoários. In: ANDREOLI, C. V.; LARA, A. I.; FERNANDES, F. **Reciclagem de biossólidos: transformando problemas em soluções**. Curitiba: SANEPAR, 1999. p. 156-179.

TRIGUEIRO, R.M.; GUERRINI, I. A. Uso de biossólido como substrato para produção de mudas de eucalipto. **Sciencia Florestalis**, Piracicaba, v.64, p.150-162, dez. 2003.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 2007. **SW-846: Test Methods do Evaluating Solid Waste, Physical Chemical Methods**. Feb 2007a.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 2007.

**Preliminary comparative study of methods to extract virus from raw and processed sewage sludge.** EPA/600/R-07/118/Sept 2007b.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 1682:** Salmonella in Sewage Sludge (Biosolids) by Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium. EPA 821-R-016-14. Jul 2006.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method for the recovery and assay of total culturable viruses from sludge. In: USEPA. **Environmental Regulations and Technology.** Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge. EPA/625/R-092/013. Jul. 2003a.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Environmental Regulations and Technology:** Control of pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. EPA/625/r-92/013. Cincinnati, 2003b.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Preparing sewage sludge for land application or surface disposal:** A guide for preparers of sewage sludge on the monitoring, record keeping, and reporting requirements of the Federal Standards for use or disposal of sewage sludge. 40 CFR Part. 503. EPA 813-B-93-002a. Set. 1993.

VAN DER HOEK, W. et al. **Urban wastewater:** a valuable resource for agriculture. A case study from Horoonabad, Pakistan. Colombo, Sri Lanka: International Water Management Institute, 2002. 29 p.

WANG, M. -J. Land application of sewage sludge in China. **The Science of the Total Environment**, [S. I.], v. 32, n. 5, p.149-160, 1997.

WEISCHER, B.; BROWN, D. J. F. **Conhecendo os Nematóides:** Nematologia Geral. Sofia - Bulgária: Pensoft, 2001. 209 p.

YEAGER, J. G.; WARD, R. L. Effects of Moisture Content on Long-Term Survival and Regrowth. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 4, n. 5, p.1117-1122, mai. 1981.

ZALESKI, K. J. et al. Potential regrowth and recolonization of *Salmonella* and indicators in biosolids and biosolid amended soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 3701-3708, 2005a.

ZALESKI, K. J. et al. Survival, growth, and regrowth of enteric indicator and pathogenic bacteria in biosolids, compost, soil, and land applied biosolids. **Journal of Residuals Science & Technology**, v. 2, p. 49-63, 2005b.